

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ООМИЦЕТОВ *SAPROLEGNIA PARASITICA* К ФУКООЛИГОСАХАРИДАМ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ

А. А. Толкачева, Н. А. Пряхина, Е. П. Анохина, О. С. Корнеева

ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий

Поступила в редакцию 06.12.2021 г.

Аннотация. В работе представлены результаты исследования биоцидных свойств фукоолигосахаридов, полученных в результате ферментативного гидролиза фукоидана, выделенного из морских бурых водорослей, по отношению к оомицетам *Saprolegnia parasitica*, вызывающим паразитарные болезни рыб, широко распространенные в аквакультуре. Сапролегниоз икры наносит большой урон и характеризуется поражением ее сапролегниевыми грибами во время заводской инкубации. После запрета на применение красителя малахитового зеленого в борьбе с *Saprolegnia ssp.* отсутствуют эффективные меры контроля и борьбы с этой инфекцией в аквакультуре. При этом известно о широкой биоцидной активности фукоидана, но практически не изучены его антимикотические свойства. Изученные фукоолигосахариды представляют собой смесь полисахаридов с молекулярными массами от 20 до 80 кДа, построенные из 1→3- и 1→4-связанных остатков α-L-фукопиранозы, частично сульфатированных во 2 положении (гидролизат 1) и смесь ди-, пента- и тетрасахаридов, имеющих в своем составе 1→3- и 1→4-связанные остатки α-L-фукопиранозы, частично сульфатированные во 2 положении (гидролизат 2). Определена концентрация фукоолигосахаридов, при которой степень ингибирования линейных размеров колоний в сравнении с контролем составила 50% (концентрация полумаксимального ингибирования), для гидролизата 1 – 0.805 г/л, а для гидролизата 2 – 0.017 г/л. Таким образом, было выявлено, что фунгицидная активность фукоолигосахаридов коррелирует с их молекулярной массой. Для гидролизата 2 концентрация фукоолигосахаридов, при которой рост культуры *Saprolegnia parasitica* в течение 7 суток полностью отсутствовал (минимальная ингибирующая концентрация), для гидролизата 2 составила 0.103 г/л. Установлено, что зооспоры более чувствительны к фукоолигосахаридам по сравнению с мицелием, о чем свидетельствует концентрация полумаксимального ингибирования прорастания зооспор (0.009 г/л), для гидролизата 2. Полученные данные служат основой для дальнейшего исследования фунгицидной активности фукоолигосахаридов *in vivo* с целью разработки фармацевтических препаратов антимикробного действия.

Ключевые слова: фукоидан, фукоолигосахариды, сульфатированные биополимеры, антимикотическая активность, фунгицидная активность, сапролегниоз, ооциты, осетровые рыбы, аквакультура

В последние десятилетия значительно возрос интерес к биоцидным свойствам фукоидана, которые, наряду с нетоксичностью, гипоаллергенностью, биodeградируемостью и биосовместимостью, позволяют использовать его в биомедицинских целях в качестве альтернативы или вспомогательного вещества в антимикробной терапии [1-5]. Кроме того, у сульфатированных полисахаридов водорослей – фукоиданов обнаружен целый спектр биологических активностей, в том числе и противоопухолевая [6-9]. Фукоиданы бурых водорослей привлекают к себе внимание также в качестве антибактериальных препаратов. При этом фунгицидная активность фукоиданов и их гидролизатов практически не изучена.

Сапролегниоз считается одним из наиболее распространенных грибковых заболеваний в пресноводной аквакультуре. *Saprolegnia parasitica* наносит значительный экономический ущерб, поражая лососевые и осетровые рыбopитомники и фермы, вызывая микозы у рыб на всех стадиях развития [10-13]. У рыб, зараженных сапролегниозом, на жабрах и поврежденной коже образуется ватный мицелий, а зараженная икра обычно погибает в результате разрыва гифами хорионической оболочки и последующего осмотического шока [14-17]. После запрета на применение красителя малахитового зеленого в борьбе с *Saprolegnia ssp.* отсутствуют эффективные меры контроля и борьбы с этой инфекцией в аквакультуре, поэтому разработка эффективных фунгицидных препаратов является актуальной задачей.

© Толкачева А. А., Пряхина Н. А., Анохина Е. П., Корнеева О. С., 2022

В связи с выше изложенным, целью настоящей работы явилось исследование влияния фукоолигосахаридов различной степени полимеризации на рост мицелия и прорастание зооспор оомицета *Saprolegnia parasitica*.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служил образец водной плесени, выделенный авторами из инфицированной икры гибрида русского осетра (*Acipenser gueldenstaedtii*) с калугой (*Huso dauricus*) с характерными признаками заболевания. Для идентификации выделенного патогена использовали ПЦР и секвенирование участка ДНК, включающего 18S рРНК, ITS1, 5.8S рРНК, ITS2 и 28S рРНК, позволяющие отличить разные виды водных плесневых грибов. Анализ полученной нуклеотидной последовательности показал более 99 % идентичности с ранее известными последовательностями ДНК *S. parasitica*.

Коллективом авторов из водоросли *Fucus vesiculosus* были получены фукоолигосахариды: смесь полисахаридов с молекулярными массами от 20 до 80 кДа, построенные из 1→3- и 1→4-связанных остатков α-L-фукопиранозы, частично сульфатированных во 2 положении (гидролизат 1) и смесь ди-, пента- и тетрасахаридов, имеющих в своем составе 1→3- и 1→4-связанные остатки α-L-фукопиранозы, частично сульфатированные во 2 положении (гидролизат 2) [18, 19].

Фунгицидное действие фукоолигосахаридов определяли по степени ингибирования роста культуры *S. parasitica*. Для определения концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀), культуру грибов инкубировали при 25 °С на чашках Петри в течение 7 суток на агаризованной среде Сабуро с добавлением возрастающих концентраций гидролизата 1 и гидролизата 2. IC₅₀ определяли как концентрацию, при которой степень ингибирования линейных размеров колоний в сравнении с контролем составляла 50%. Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) культивирование проводили аналогичным образом. При этом МИК считали концентрацию фукоолигосахаридов, при которой рост культуры *Saprolegnia parasitica* в течение 7 суток полностью отсутствовал. В качестве положительного контроля использовали известный ингибитор оомицетов малахитовый зеленый (исходный раствор 512 мкг/мл в дистиллированной воде). В качестве отрицательного контроля использовали чашки с немодифицированной стерильной питательной средой. Каждую чашку

инокулировали, помещая в центр агаровую пробку диаметром 2 мм, содержащую мицелий, взятый с края активно растущей колонии. Анализ прекращали после того, как мицелий в чашках с отрицательным контролем достигал конца чашки Петри – через 7 суток. Затем были сделаны два перпендикулярных измерения радиуса мицелия для каждой чашки и усреднены, а размер агаровой пробки был вычтен для получения окончательных измерений радиального роста. Измерения на чашках с отрицательным контролем и опытами были преобразованы в процент ингибирования.

Для гидролизата 2 также была определена концентрация полумаксимального ингибирования прорастания зооспор. Проводили культивирование на жидкой среде Сабуро с добавлением возрастающих концентраций гидролизата 2 в течение 16 часов при 25 °С. Среду инокулировали смывом со спорносящей культуры *Saprolegnia parasitica* с конечной концентрацией спор 10⁵ КОЕ/мл. Подсчет покоящихся и прорастающих спор вели в камере Горяева по стандартной методике. Процент проросших спор определяли относительно контроля (среда Сабуро без добавления гидролизатов). Процент прорастающих спор определяли путем подсчета не менее 200 спор в трех случайно выбранных полях зрения, при этом спору с ростовой трубкой длиной не менее одного диаметра цисты считали проросшей. Проценты прорастания были преобразованы в процентные значения ингибирования прорастания.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ чувствительности *Saprolegnia parasitica* к фукоолигосахаридам показал, что полученные фракции фукоолигосахаридов – гидролизат 1 и гидролизат 2, ингибировали рост мицелия, что ярко проявлялось визуально (рисунок 1). При этом оба гидролизата проявили микостатическое действие (рисунок 1 б, в), в то время как микоцидное – лишь гидролизат 2 (рисунок 1 г).

В результате установлено, что IC₅₀ для гидролизата 1 составляла 0.805 г/л, а IC₅₀ для гидролизата 2 составляла 0.017 г/л. Гидролизат 1 при повышении концентрации в среде вплоть до 10 г/л не показал полного ингибирования роста культуры, дальнейшее повышение концентрации было признано нецелесообразным. Для гидролизата 2 МИК составляла 0.103 г/л (рисунок 2). Такая разница в результатах может быть объяснена значительно более низкой молекулярной массой

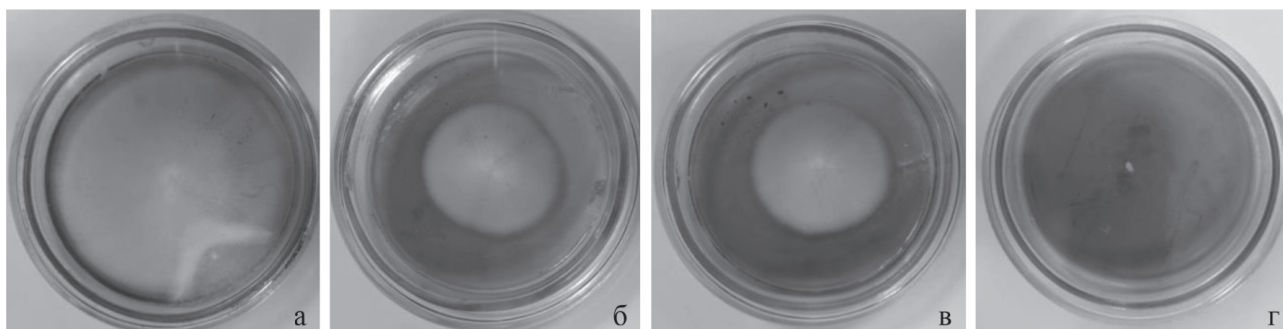


Рис. 1. Ингибирование роста колоний *Saprolegnia parasitica* в сравнении с контролем: а) контроль – 100 % рост; б) ингибитор – гидролизат 1, 0.805 г/л – 50 % ингибирование роста; в) ингибитор – гидролизат 2, 0.017 г/л – 50 % ингибирование роста; г) ингибитор – гидролизат 2, 0.103 г/л – 100 % ингибирование роста

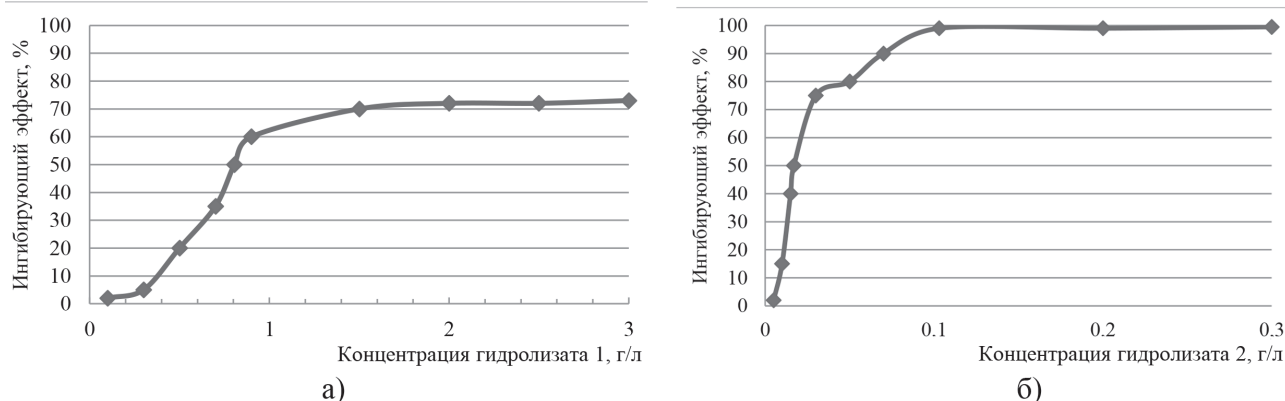


Рис. 2. Ингибирующий эффект фукоолигосахаридов (отношение среднего диаметра колоний опытных проб к среднему диаметру колоний контрольных проб) в отношении роста мицелия *Saprolegnia parasitica*: а – гидролизат 1, б – гидролизат 2

фукоолигосахаридов, входящих в состав гидролизата 2, механизм действия которых подлежит дальнейшему исследованию.

Учитывая, что гидролизат 2 проявил более высокую фунгицидную активность, для него также была определена концентрации полумаксимального ингибирования прорастания зооспор (рисунок 3). IC50 прорастания зооспор для гидролизата 2 составляет 0.009 г/л. Таким образом, зооспоры оказались более чувствительны, чем мицелий.

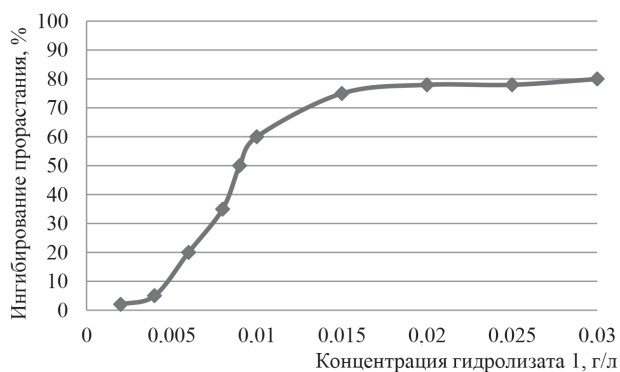


Рис. 3. Ингибирование прорастания зооспор *Saprolegnia parasitica* фукоолигосахаридами гидролизата 2

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы установлено, что фукоолигосахариды, полученные в результате ферментативного гидролиза фукоидана, выделенного из морских бурых водорослей, подавляют рост как мицелия, так и зооспор оомицета *Saprolegnia parasitica*, вызывающего паразитарные болезни рыб, что подтверждает их фунгицидное действие. Установлена взаимосвязь между ингибирующим эффектом фукоолигосахаридов и их молекулярной массой и степенью полимеризации. Установлено, что концентрация фукоолигосахаридов 0.017–0.805 г/л способствовала полумаксимальному ингибированию (IC50) прорастания мицелия *Saprolegnia parasitica*. Минимальная ингибирующая концентрация фукоолигосахаридов, при которой рост культуры *Saprolegnia parasitica* в течение 7 суток полностью отсутствовал, составила 0.103 г/л. Установлено, что зооспоры более чувствительны к фукоолигосахаридам, чем мицелий. Показано, что фукоолигосахариды в концентрации 0.009 г/л способствовали полумаксимальному ингибированию прорастания зооспор *Saprolegnia parasitica*.

Полученные данные лягут в основу дальнейшего исследования фунгицидной активности фукоолигосахаридов *in vivo* с целью разработки фармацевтических препаратов антимикробного действия.

Работа поддержана грантом РФФИ в рамках проекта 20-08-01149 А

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

- 1 Luthuli S., Wu S., Cheng Y., Zheng X., Wu M., Tong H. // *Mar Drugs*. 2019 Vol. 17(9), pp. 487.
- 2 Cabral E.M., Mondala J.R.M., Oliveira M., Przyborska J., Fitzpatrick S., Rai D.K., Sivagnanam S.P., Garcia-Vaquero M., O'Shea D., Devereux M., Tiwari B.K., Curtin J. // *Int J Biol Macromol*. 2021. Vol. 186, pp. 994-1002.
- 3 Venkatesan J., Murugan S.S., Seong G.H. // *Int J Biol Macromol*. 2022. Vol. 217, pp. 652-667.
- 4 Pomin V.H. // *Curr Top Med Chem*. 2017. Vol. 17(3), pp. 319-330.
- 5 Zhu Y., Liu L., Sun Z., Ji Y., Wang D., Mei L., Shen P., Li Z., Tang S., Zhang H., Zhou Q., Deng J. // *Int J Biol Macromol*. 2021. Vol. 180, pp. 599-607.
- 6 van Weelden G., Bobiński M., Okła K., van Weelden W.J., Romano A., Pijnenborg J.M.A. // *Mar Drugs*. 2019. Vol. 17(1), pp. 32.
- 7 Lin Y., Qi X., Liu H., Xue K., Xu S., Tian Z. // *Cancer Cell Int*. 2020. Vol. 20, pp. 154.
- 8 Atashrazm F., Lowenthal R.M., Woods G.M., Holloway A.F., Dickinson J.L. // *Mar Drugs*. 2015. Vol. 13(4), pp. 2327-46. doi: 10.3390/md13042327.
- 9 Reyes M.E., Riquelme I., Salvo T., Zanella L., Letelier P., Brebi P. // *Mar Drugs*. 2020. Vol. 18(5), pp. 232.
- 10 Matthews E., Ellison A., Cable J. // *Fungal Biol*. 2021. Vol. 125(4), pp. 260-268.
- 11 Shin S., Kulatunga D.C.M., Dananjaya S.H.S., Nikapitiya C., Lee J., De Zoysa M. // *Mycobiology*. 2017. Vol. 45(4), pp. 297-311.
- 12 Tedesco P., Saraiva M., Sandoval-Sierra J.V., Fioravanti M.L., Morandi B., Dieguez-Uribeondo J., van West P., Galuppi R. // *Pathogens*. 2021. Vol. 10(8), pp. 926.
- 13 Pavić D., Grbin D., Hudina S., Prosenec Zmrzljak U., Miljanović A., Košir R., Varga F., Čurko J., Marčić Z., Bielen A. // *Sci Rep*. 2022. Vol. 12(1), pp. 16646.
- 14 Zahran E., Hafez E.E., Mohd Altaf Hossain F., Elhadidy M., Shaheen A.A. // *J Aquat Anim Health*. 2017. Vol. 29(1), pp. 43-49.
- 15 Hussein M.M., Hatai K., Nomura T. // *J Wildl Dis*. 2001. Vol. 37(1), pp. 204-7.
- 16 Peyghan R., Rahnama R., Tulaby Dezfuly Z., Shokoohmand M. // *Vet Res Forum*. 2019. Vol. 10(1), pp. 89-92.
- 17 González-Palacios C., Fregeneda-Grandes J.M., Aller-Gancedo J.M. // *Animals (Basel)*. 2020. Vol. 10(9), pp. 1507.
- 18 Anokhina E. P., Isuva M. M., Savchenko S. E., Korneeva, O. S., Startseva S. V. // *J. of Biotech*. 2018. Vol. 280, Supplement, pp. S19.
- 19 Anokhina E., Isuva M., Korneeva O., Bakhareva A., Vladimirov V. // *J. of Biotech*. 2019. Vol. 305. Supplement, pp. S21-S21.

Воронежский государственный университет инженерных технологий

*Толкачева А. А., младший научный сотрудник, Лаборатория метагеномики и пищевых биотехнологий
E-mail: anna-biotech@yandex.ru*

*Пряхина Н. А., младший научный сотрудник, Лаборатория метагеномики и пищевых биотехнологий
E-mail: nekrasovaninelya@yandex.ru*

*Анохина Е.П., старший научный сотрудник, Лаборатория метагеномики и пищевых биотехнологий
E-mail: katya_anoh@mail.ru*

*Корнеева О.С., проректор по научной и инновационной деятельности
E-mail: korneeva-olgas@yandex.ru*

Voronezh State University of Engineering Technologies

*Tolkacheva A. A., Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies
E-mail: anna-biotech@yandex.ru*

*Pryakhina N. A., Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies
E-mail: nekrasovaninelya@yandex.ru*

*Anokhina E.P., Senior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnologies
E-mail: katya_anoh@mail.ru*

*Korneeva O.S., Vice-Rector for Research and Innovation
E-mail: korneeva-olgas@yandex.ru*

SENSITIVITY OF OOMYCETES SAPROLEGNIA PARASITICA TO FUCOOLIGOSACCHARIDES WITH DIFFERENT DEGREE OF POLYMERIZATION

A. A. Tolkacheva, N. A. Pryakhina, E. P. Anokhina, O. S. Korneeva

Voronezh State University of Engineering Technologies

Abstract. The paper presents the results of a study the biocidal properties of fucooligosaccharides obtained as a result of enzymatic hydrolysis of fucoidan isolated from sea brown algae in relation to *Saprolegnia parasitica* oomycetes, which cause parasitic fish diseases that are widespread in aquaculture. Saprolegnia caviar causes great damage. Saprolegniosis is characterized by the defeat of fish by fungi during factory incubation. After the ban on the use of malachite green dye in the fight against *Saprolegnia ssp.* there are no effective measures to control and combat this infection in aquaculture. At the same time, it is known about the wide biocidal activity of fucoidan, but its antimycotic properties are practically not studied. The studied fucooligosaccharides are a mixture of polysaccharides with molecular weights from 20 to 80 kDa, consisting of 1→3- and 1→4-linked α -L-fucopyranose residues, partially sulfated in the 2 position (hydrolyzate 1) and a mixture of di-, penta- and tetrasaccharides containing 1→3- and 1→4-linked α -L-fucopyranose residues, partially sulfated in position 2 (hydrolyzate 2). The authors determined the concentration of fucooligosaccharides at which the degree of inhibition of the linear dimensions of the colonies in comparison with the control was 50% (the concentration of half-maximal inhibition), which was 0.805 g/l for hydrolyzate 1, and 0.017 g/l for hydrolyzate 2. Thus, it was found that the fungicidal activity of fucooligosaccharides correlates with their molecular weight. The authors also determined the concentration of fucooligosaccharides, at which the growth of the *Saprolegnia parasitica* culture was completely absent for 7 days (the minimum inhibitory concentration), which for hydrolyzate 2 was 0.103 g/l. It has been established that zoospores are more sensitive to fucooligosaccharides compared to mycelium, as evidenced by the concentration of half-maximal inhibition of zoospore germination (0.009 g/l), which was determined for hydrolyzate 2. The data presented in the article are the basis for further study of the fungicidal activity of fucooligosaccharides in vivo with the aim of developing antimicrobial pharmaceuticals.

Keywords: fucoidan, fucooligosaccharides, sulfated biopolymers, antimycotic activity, fungicidal activity, saprolegniosis, oocytes, sturgeons, aquaculture