

DZIAŁANIE RÓŻNYCH FORM CHITOSANU NA GRZYBNIĘ *Aspergillus giganteus* mut. *alba* ZURZ.

Janina Fiema¹, Bernadetta Piskorz-Bińczycka²

¹Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN w Krakowie

²Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet Rzeszowski w Rzeszowie

Wstęp

Niektóre polisacharydy, będące głównymi częściami składowymi ścian komórkowych grzybów – glukany β -(1-3), β -(1-3) (1-6) – polimery glukozy, chityna, chitosan – polimery β -glukozoaminy [BARTNICKI-GARCIA 1970; FIEMA 1983; ROUTHIER i in. 1994], mają równocześnie cenne właściwości pozwalające chronić rośliny i zwierzęta przed zainfekowaniem przez inne patogeny grzybowe i wirusy lub też hamować rozwój komórek nowotworowych u człowieka [ALLAN, HADWIGER 1979; BRUNETEAU 1988; IGNACAK i in. 1998].

Spośród wymienionych składowych – szczególnie chitosan – częściowo odacetylowana pochodna chityny – jest najbardziej aktywnym składnikiem w oddziaływaniu gospodarz – patogen podczas infekcji. Wywołuje on wówczas przemiany metaboliczne związane między innymi z indukcją syntezy fitoaleksyn, które są biologicznym monitoringiem reakcji gospodarza rośliny, z lignifikacją [HADWIGER, BECKMAN 1980] oraz hamuje kiełkowanie zarodników grzybowych i wzrost grzybów w szerokim zakresie gatunkowym [ALLAN, HADWIGER 1979].

Postawiono pytanie, czy chitosan o różnym stopniu deacetylacji, a zatem o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych wpływa w różnym stopniu na wzrost grzybni *Aspergillus giganteus* mut. *alba*.

Materiał i metody

Przedmiotem badań był *Aspergillus giganteus* mut. *alba* ZURZ. otrzymany w Zakładzie Fizjologii Roślin PAN jako naturalny spontaniczny mutant *Aspergillus giganteus* [ZURZYCKA 1963].

Grzybnie hodowano na dwóch rodzajach pożywek:

- 1) na pożywce zestalonej agarą w 10 cm szalkach Petriego,
- 2) na pożywce płynnej w 200 cm³ kolbach Erlenmayera.

Pomijając obecność agaru, w obu przypadkach skład pożywki był identyczny: 12,5 mmol(NH₄NO₃)·dm⁻³, 5,7 mmol(K₂HPO₄)·dm⁻³, 4 mmol(MgSO₄)·dm⁻³, 10 μmol(FeSO₄)·dm⁻³, 34,8 μmol(ZnSO₄)·dm⁻³, glukozy 50 g·dm⁻³, ekstraktu drożdżowego (Difco) 10 g·dm⁻³.

Przygotowanie podłoża:

Ad 1) 5 cm³ sterylnej pożywki w szalkach Petriego powlekano 2 cm³ rozpuszczonego chitosanu, po czym nakładano krążki o średnicy 0,5 cm młodej, 36-godzinnej niezarodnikującej grzybni. Krążki grzybni przygotowywano wg procedury przedstawionej uprzednio [PISKORZ-BIŃCZYCKA 1995].

Do powlekania pożywki oraz do pożywki płynnej zastosowano trzy rodzaje chitosanu o różnym stopniu deacetylacji i różnej lepkości:

- chitosan 67% deacetylacji i lepkości 1940 mPaxs,
- chitosan 74% deacetylacji i lepkości 411 mPaxs,
- chitosan 93% deacetylacji i lepkości 18 mPaxs.

Do powlekania pożywki stałej każda z frakcji była stosowana w trzech stężeniach: 10, 7,5, 5 g·dm⁻³.

Ad 2) Do sterylnej pożywki płynnej dodawano odpowiednią ilość bardziej stężonego chitosanu tak, aby jego stężenie w 25 cm³ pożywki wynosiło wybiórczo 10 g·dm⁻³, pH pożywki 5. Pożywkę tę szczepiono zawiesiną zarodników badanego organizmu.

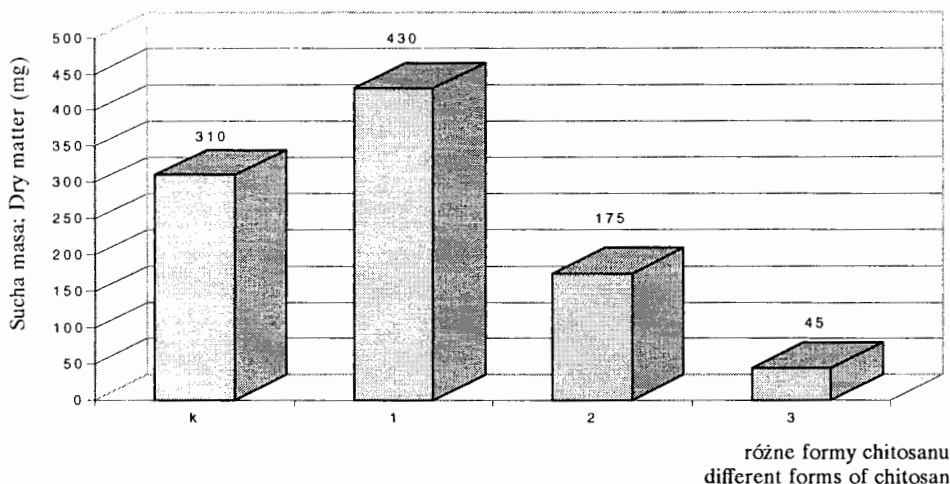
Równolegle prowadzono doświadczenia kontrolne bez dodatku chitosanu. Kultury hodowano w termostacie o temp. 25°C, w świetle białym o intensywności 10,6 W·m⁻³.

Po 7 i 10 dniach mierzono średnicę wyrośniętych krążków grzybni na szalkach Petriego, a po 10 dniach zbierano wyrośnięte grzybnie z pożywki płynnej, płukano destylowaną wodą i suszono przy 105°C do uzyskania stałej masy.

Wyniki i dyskusja

Z badań przeprowadzonych na różnym materiale roślinnym [HADWIGER, BECKMAN 1980; KOPP i in. 1989; POSPIESZNY i in. 1991] wynika, że preparaty pochodzenia grzybowego uzyskane ze ścian komórkowych (preparaty chitosanowe i niektórych β-glukanów), zastosowane poprzez iniekcję lub inokulację, mogą działać jako elicytory wywołujące naturalną odporność roślin lub też zastosowane zewnętrznie przez spryskiwanie tworzą powłokę ochronną przed zakażeniem grzybami patogennymi czy wirusami, lecz w mniejszym stopniu wykazują działanie ochronne i wymagają większego stężenia chitosanu [POSPIESZNY i in. 1991].

Wprowadzenie chitosanu do pożywki na której hodowano *Aspergillus giganteus* mut. *alba* może być również jednym ze sposobów ułatwiających „wejście” tego składnika do metabolizmu badanego organizmu, ale równocześnie może też zapobiegać kiełkowaniu zarodników i dalszemu rozwojowi grzybni. Skuteczność hamującego działania chitosanu oceniano na podstawie wzrostu grzyba; kryterium tej oceny była uzyskana jego masa. Natomiast odmianą zewnętrznego zastosowania chitosanu było powlekanie nim powierzchni pożywki zestalonej, na którą nakładano krążek grzybni. W tym przypadku kryterium oceny wzrostu był pomiar średnicy nowo powstałej grzybni. Wyniki doświadczeń przedstawia rys. 1 i rys. 2, tylko dla stężenia chitosanów 10 g·dm⁻³, ponieważ zbyt małe ich stężenia (0,75, 0,5 g·dm⁻³) zastosowane przy powlekanii powierzchni pożywki zestalonej są niewystarczające do zahamowania wzrostu grzybni; szczególnie dotyczy to chitosanów 67 i 74, bowiem przy tych niższych stężeniach jedynie chitosan 93 hamuje wzrost grzybni o około 40–60%.

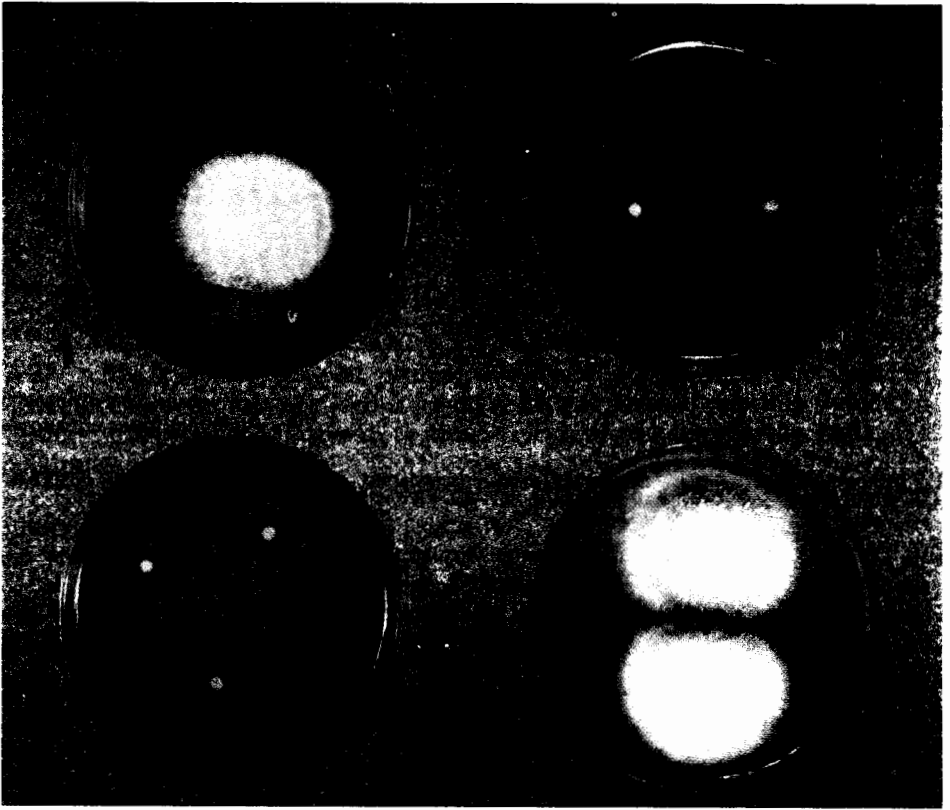


k – kontrola; control, 1 – 67% deacetylacji; 67% deacetylation, 2 – 74% deacetylacji; 74% deacetylation, 3 – 93% deacetylacji; 93% deacetylation

Rys. 1. Wpływ różnych form chitosanu przy stężeniu $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ na wzrost grzybni *Aspergillus giganteus* mut. *alba* (kultury ze światła)

Fig. 1. The effect of different forms of chitosan at $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ concentration on the growth of the mycelium of *Aspergillus giganteus* mut. *alba* (cultures from light)

Porównując dane z rys. 1 i rys. 2 można zauważyć pewne analogie w skuteczności działania badanych form chitosanu o różnym stopniu deacetylacji (67%, 74%, 93%) niezależnie od sposobu ich testowania. W obu przypadkach obserwuje się mianowicie, iż najsilniejsze grzybostatyczne oddziaływanie wykazuje chitosan o najwyższym stopniu deacetylacji, tj 93%. Jeśli jednocześnie dane liczbowe z rys. 1 przedstawimy w ujęciu procentowym, to można stwierdzić, iż chitosan 93 hamuje wzrost grzybni aż w 85%, natomiast chitosan 74 w 43%, a chitosan 67 nie hamuje wzrostu grzybni, a nawet obserwuje się 38% przyrost masy w porównaniu do kontroli (rys. 1). Zwiększenie masy może być wynikiem częściowego wykorzystania tego polisacharydu przez badany gatunek. Znany jest bowiem fakt [FIEMA 1987], że pod koniec okresu wzrostu, jeśli nie ma już w pożywce substancji odżywczych, grzyb ten uruchamia enzymy autolityczne, w tym wydzielane z grzybni do pożywki, pozwalające wykorzystywać tego typu związki chemiczne będące składnikami ścian komórkowych. W tym przypadku (dot. chitosanu 67) przypuszczenie to może być wysoce prawdopodobne, bo potwierdzone również „rozmiarem” wyrosniętej grzybni na szalce Petriego, która jest równorzędna z grzybnią kontrolną (rys. 2). Także przy hodowli grzybni w krążkach (przy stężeniu $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) najsilniej działa chitosan 93% deacetylacji – bowiem przez 7 i 10-dniowy okres wzrostu grzybni ta w ogóle nie powiększyła swoich rozmiarów. Niewielka rozbieżność skuteczności działania zaznaczana jest przy chitosanie 74, który bardziej hamuje wzrost grzybni na pożywce stałej niż na pożywce płynnej. Otrzymane wyniki są zgodne z wynikami otrzymanymi przez IGNACAKA i in. [1998] dla komórek nowotworowych. Tłumaczą oni, że formy chitosanu z większym stopniem deacetylacji, jako silniej naładowane polikationy, były bardziej aktywne niż słabiej naładowane polikationy z mniejszym stopniem deacetylacji. Odminną interpretację natomiast



k – kontrola; control, 1 – 67% deacetylacji; 67% deacetylation, 2 – 74% deacetylacji; 74% deacetylation, 3 – 93% deacetylacji; 93% deacetylation

Rys. 2. Wzrost krążka niezarodnikującej grzybni *Aspergillus giganteus* mut. *alba* na pożywce zestalonej agarem pokrytej różnymi formami chitosanu przy stężeniu $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (kultury ze światła). Pomniejszenie około $2\times$

Fig. 2. Increase of the disc of non-germinating mycelium of *Aspergillus giganteus* mut. *alba* on agar nutrient covered with different forms of chitosan at $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ concentration (cultures from light). Reduced about $2\times$

podaje HADWIGER i BECKMAN [1980], według których bardziej skutecznie działa chitosan o niższym stopniu deacetylacji. Dalsze badania biochemiczne dla gatunku *Aspergillus giganteus* mut. *alba* pozwolą, być może dodatkowo, wytłumaczyć tę rozbieżność. W naszych bieżących badaniach zastosowane trzy rodzaje chitosanów różniły się nie tylko stopniem deacetylacji, lecz również zróżnicowanymi innymi właściwościami fizykochemicznymi, w tym szczególnie dużą rozbieżnością w ich lepkości. Zwraca uwagę fakt, że chitosan 93, który najskuteczniej hamował wzrost *Aspergillus giganteus* mut. *alba*, posiadał najmniejszą lepkość (18 m Paxis). Była ona ponad $100 \times$ mniejsza od lepkości chitosanu 67 (1940 m Paxis), który w tych warunkach doświadczalnych nie hamował wzrostu grzybni. Zatem można przy-

puszczać, że silniejszemu działaniu chitosanu z większym stopniem deacetylacji „sprzyjała” mniejsza lepkość, która może ułatwić szybsze jego przenikanie przez ściany i membrany komórkowe i równocześnie ułatwić mu zmniejszenie ich przepuszczalności [YOUNG i in. 1982] i wiązanie się z elektroujemnymi receptorami [IGNACAK i in. 1998] oraz innymi ujemnie naładowanymi anionami [HADWIGER, BECKMAN 1980]. Przyczyny różnej skuteczności grzybobójczego (grzybostatycznego) działania chitosanu na mikroorganizmy grzybowe można wiązać z różną budową ściany komórkowej u różnych grzybów. Według ALLANA i HADWIGERA [1979] wszystkie testowane grzyby, które zawierały chitosan, były niepodatne na jego grzybobójcze działanie. U badanego gatunku – *Aspergillus giganteus* mut. *alba* – wykazano, że w skład jego ściany komórkowej wchodzi chityna [FIEMA 1983] oraz glukany o strukturze β -(1-3), dlatego należało się spodziewać zróżnicowanego efektu grzybostatycznego dla chitosanów o różnym stopniu deacetylacji.

Wniosek

Różnorodność w rozkładzie działania trzech form chitosanu na wzrost grzybni *Aspergillus giganteus* mut. *alba* zależy od stopnia ich deacetylacji, stężenia (zależność wprost proporcjonalna) i lepkości (zależność odwrotnie proporcjonalna) oraz w niewielkim stopniu od sposobu ich testowania.

Literatura

- ALLAN C.R., HADWIGER L.A. 1979. *The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition*. Experimental Mycol. 3: 285–287.
- BARTNICKI-GARCIA S. 1970. *Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny*, w: *Phytochemical phylogeny*. Harborn J.B. (red.). Academic Press. London: 81–101.
- BRUNETEAU M., FABRE J., PERRET J., MICHEL G. 1988. *Antitumor active β -D-glucans from Phytophthora parasitica*. Carboh. Res. 175: 137–143.
- FIEMA J. 1983. *Some aspects of nitrogen metabolism in Aspergillus giganteus mut. alba. Chitin content in the cell walls*. Acta Physiol. Plant. 5: 113–121.
- FIEMA J. 1987. *Autolysis of the mycelium of Aspergillus giganteus Wehm. mut. alba* Zurz. Acta Bot. Cracov. Ser. Bot. 30: 25–32.
- HADWIGER L.A., BECKMAN J.M. 1980. *Chitosan as a component of pea-fusarium solani interactions*. Plant Physiol. 66: 205–211.
- IGNACAK J., GUMIŃSKA M., KĘDRYNA T., STRUSZCZYK H. 1998. *Hamowanie metabolizmu komórki nowotworowej raka wysiękowego Ehrlicha (EAT) in vitro przez chitosan*. Multidyscyplinarna konferencja Nauki o leku: S.V.K – 3. Muszyna. Instytut Farmaceutyczny, Warszawa.
- KOPP M., ROUSTER J., FRITIG B., DARVILL A., ABERSHEIM P. 1989. *Host pathogen interactions*. Plant Physiol. 90: 208–216.
- PISKORZ-BIŃCZYCKA B. 1995. *Badania nad funkcjonowaniem zegara biologicznego u przedstawicieli Penicillium clavigerum*. ZFR PAN (wyd.). Praca hab.

POSPIESZNY H., CHIRKOV S., ATABEKOV J. 1991. *Induction of antiviral resistance in plants by chitosan*. Plant Sci. 79: 63–68.

ROUTHIER P., BRUNETEAU M., MICHEL G., FIEMA J., ZURZYCKA A. 1994. *Structural characterization of alkali-soluble glucans from the mycelium of Aspergillus giganteus mut. alba*. Carboh. Res. 262: 155–159.

YOUNG D.H., KÖHLE H., KAUS H. 1982. *Effect of chitosan on membrane permeability of suspension-cultured Glycine max and Phaseolus vulgaris cells*. Plant Physiol. 70: 1449–1454.

ZURZYCKA A. 1963. *Aspergillus giganteus Wehm. mut. alba* Zurz. Acta Soc. Bot. Pol. 32: 715–718.

Słowa kluczowe: *Aspergillus*, ściany komórkowe, chitosan, deacetylacja, działanie grzybobstatyczne

Streszczenie

Sprawdzono efekt działania trzech form chitosanu o różnym stopniu deacetylacji (67%, 74%, 93%) na wzrost grzybni *Aspergillus giganteus* mut. *alba* ZURZ. na pożywce płynnej i na pożywce zestalonej agarem. Na pożywce płynnej najsilniejsze grzybobstatyczne działanie wykazuje chitosan o 93% deacetylacji wstrzymując wzrost grzybni w 85% w porównaniu do kontroli, chitosan o 74% deacetylacji – w 43%, podczas gdy chitosan o 67% deacetylacji nawet podnosi masę grzybni o około 40%. Podobne efekty obserwuje się przy rozwoju krążka grzybni na pożywce zestalonej powleczonej wcześniej różnymi formami chitosanu. Chitosan 93 całkowicie hamuje jego wzrost przez 10-dniowy okres hodowli.

THE EFFECT OF THE ACTION OF VARIOUS CHITOSAN FORMS ON THE DEVELOPMENT OF MYCELIUM OF *Aspergillus giganteus* mut. *alba* ZURZ.

Janina Fiema¹, Bernadetta Piskorz-Bińczycka²

¹ Department of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków

² Department of Plant Physiology, University of Rzeszów

Key words: *Aspergillus*, cell walls, chitosan, deacetylation, fungistatic effect

Summary

The effect of the action of three chitosan forms of various degree of deacetylation (67%, 74%, 93%) on the growth of the mycelium of *Aspergillus giganteus* mut. *alba* ZURZ. on a liquid nutrient solidified with agar, was tested.

The strongest fungistatic action has been demonstrated by chitosan with 93% deacetylation, inhibiting the growth of mycelium in 85% in comparison with the control; chitosan 74% deacetylation inhibits it in 43%; chitosan with 67% deacetylation causes the increase of the mass of mycelium by about 40%. Similar

effects were observed in the development of the mycelium disc on a solidified nutrient, covered earlier with various forms of chitosan. Chitosan with 93% deacetylation inhibits the disc growth completely during 10 days of culture.

Dr Janina **Fiema**
Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN
ul. Sławkowska 17
31-016 KRAKÓW