

Сидорова Т. М., Асатурова А. М., Аллахвердян В. В.

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ АНТИГРИБНЫХ ЭКЗО- И ЭНДОМЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ *BACILLUS VELEZENSIS***

ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»

**Реферат.** Антигрибная активность бактерий рода *Bacillus* основана на их способности продуцировать метаболиты, поэтому при подборе штамма-продуцента эффективного биофунгицида необходимо дать оценку метаболизма бактерий. Цель исследований – выделение экзо- и эндометаболитов перспективных штаммов *B. velezensis* BZR 336g, *B. velezensis* BZR 517 и оценка их антифунгальной активности. Работа проведена в 2020–2021 гг. Объект исследования – жидкая культура бактерий штаммов *B. velezensis* BZR 336g, *B. velezensis* BZR 517. Для анализа метаболитов использовали методы жидкостной экстракции, тонкослойной восходящей хроматографии, биоавтографии с тест-культурой грибов *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* и *Alternaria* sp. Выявлена способность штаммов накапливать комплекс активных метаболитов, проявляющих антигрибной эффект от фунгистатического до фунгицидного действия. На биоавтограмме экзометаболитов обнаружены две наиболее выраженные зоны подавления роста *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR P1 (фунгицид) – Rf 0,18 и 0,29. Зоны с Rf 0,58 для штамма *B. velezensis* BZR 336g и Rf 0,70 для штамма *B. velezensis* BZR517 соответствуют задержке роста тест-гриба (фунгистатик). Значительное подавление роста фитопатогена *Alternaria* sp. BZR P8 наблюдали в двух зонах (Rf 0,18 и 0,29). Применение коммерческих липопептидов (сурфактин, итурин А, фенгицин фирмы Sigma-Aldrich) при анализе методом тонкослойной хроматографии позволило обнаружить их в составе метаболитных комплексов, продуцируемых изучаемыми бактериями. Штаммы отличались друг от друга как по способности продуцировать различные по структуре метаболиты (что видно при анализе хроматограмм под ультрафиолетом), так и по воздействию на фитопатогенные грибы *in vitro*. Это может указывать на вероятные различия механизма антагонистической активности бактерий по отношению к фитопатогенным грибам. Штаммы *B. velezensis* BZR336g и *B. velezensis* BZR517 продуцируют значительный набор антигрибных метаболитов и могут быть использованы в качестве штаммов-продуцентов эффективных биофунгицидов.

**Ключевые слова:** *Bacillus velezensis*, антимикробные метаболиты, липопептиды, фунгицид, фунгистатик.

**Для цитирования:** Сидорова Т. М., Асатурова А. М., Аллахвердян В. В. Хроматографические профили антигрибных экзо- и эндометаболитов бактерий *Bacillus velezensis* // Таврический вестник аграрной науки. 2021. № 2(26). С. 191–199. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-191-199.

**For citation:** Sidorova T. M., Asaturova A. M., Allakhverdyan V. V. Chromatographic profiles of antifungal exo- and endometabolites of *Bacillus velezensis* // Taurida Herald of the Agrarian Sciences. 2021. No. 2 (26). P. 191–199. DOI: 10.33952/2542-0720-2021-2-26-191-199.

### Введение

Ризобактерии (plant growth horomotingrizzo bacteria, PGPR) (J. W. Клоеппер, 1980) влияют на многие метаболические процессы в растении, связанные с их ростом и иммунитетом [1, 2]. Супрессивные качества бактерий рода *Bacillus* по отношению к широкому списку фитопатогенов обусловлены способностью продуцировать

множество вторичных метаболитов различной химической природы. Изучение механизмов биологической активности бактерий-антагонистов фитопатогенов способствует целенаправленному отбору штаммов для создания микробиологических препаратов.

*B. velezensis* продуцирует большое количество антимикробных метаболитов: липопептиды, полипептиды, ферменты, непептидные соединения [3–7]. Поверхностно-активные вещества, которые представляют собой амфипатические молекулы с полярными и гидрофобными участками, могут быть связаны с фунгицидной активностью [8]. Структура и механизм действия липопептидных фунгицидов, к которым относят активные соединения семейств итуринов, сурфактинов, фенгицинов изучены наиболее подробно. Продукция сурфактинов, итуринов и фенгицинов, как правило индуцируется присутствием фитопатогенов в окружающей среде. Их синтез бактериями *Bacillus* влияет на подавление фитопатогенов в природных условиях. Механизм воздействия липопептидов на мицелиальные грибы связан с их влиянием на мембраны посредством взаимодействия с эргостеролом. В результате происходит образование пор с последующим выходом одновалентных катионов из клеток, что приводит к лизису [8, 9]. Для липопептидов из разных семейств специфические механизмы образования пор различны [10]. Наиболее эффективные биосурфактанты – сурфактины – поверхностно-активные вещества биологического происхождения, которые имеют сходную с итуринами структуру и антагонистические свойства. В отличие от итуринов молекулы сурфактинов содержат аминокислоты с гидрофобными радикалами и β-гидроксилированной жирной кислотой [11]. Сурфактины и фенгицины, помимо прямого действия, предотвращают адгезию конкурентных микробов и индуцируют в растениях системную устойчивость к патогенам и неблагоприятным абиотическим факторам. Липопептидные антибиотики могут восприниматься клетками растений как элиситоры, то есть выступают сигналом инициации защитных механизмов [3].

Наиболее экологичным методом детоксикации микотоксинов в растительном сырье при заражении растений токсиногенными грибами считается использование микроорганизмов-деструкторов микотоксинов. Воздействие бактерий рода *Bacillus* на токсиногенные грибы и продуцируемые ими микотоксины происходит или путем влияния на рост и способность грибов продуцировать токсины, или путем биодеструкции уже синтезированных микотоксинов [12].

**Цель исследований** – выделение экзо- и эндометаболитов двух перспективных штаммов *B. velezensis* методом тонкослойной хроматографии и оценка антифунгальной активности.

#### **Материалы и методы исследований**

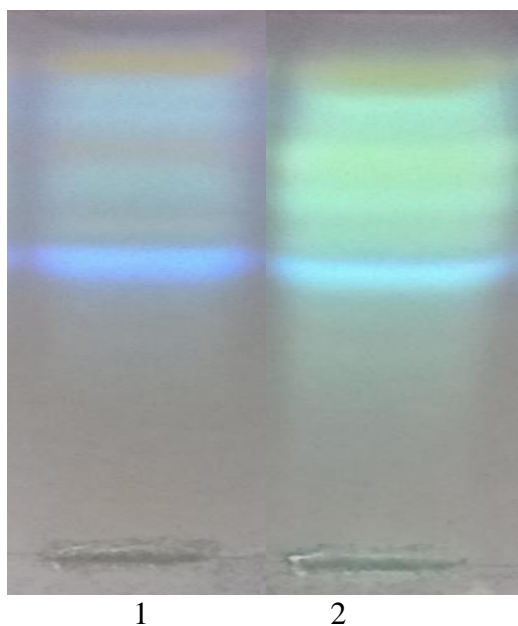
Работа проведена на базе лаборатории создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов ФНЦБЗР в 2020–2021 гг. В ходе исследований использованы коммерческие липопептиды: сурфактин, итурин А, фенгицин (Sigma-Aldrich, США), штаммы-продуценты лабораторных образцов биопрепаратов *B. velezensis* BZR 336g и BZR 517 [13–15], а также культуры фитопатогенных грибов *Fusarium oxysporum* var. *orthoceras* BZRP1 (возбудитель корневой гнили зерновых и масличных культур) и *Alternaria* sp. BZRP8 (возбудитель альтернариоза плодовых культур) из коллекции БРК ФГБНУ ВНИИБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов». В исследованиях использована материально-техническая база УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» (№ 671367).

После получения лабораторных образцов методом периодического культивирования [13] выделение и очистку экзометаболитов проводили экстракцией и

методом тонкослойной хроматографии [16–18]. Для выделения эндометаболитов бактериальные клетки промывали 0,9 % раствором NaCl и дистиллированной водой. После центрифугирования (20 мин при 12000 g) осадок суспендировали либо в 70 %-ном этаноле, либо в бутаноле на встряхивателе в течение 2 ч. Осадок удаляли центрифугированием (20 мин при 12000 g). Полученный супернатант упаривали на ротационном вакуумном испарителе (RV 10, Германия). Сухой остаток экзо- и эндометаболитов после упаривания этилацетатного, этанольного и бутанольного экстрактов растворяли в минимальном количестве этилацетата и анализировали методом восходящей тонкослойной хроматографии (ТСХ), а затем методом биоавтографии с двумя культурами тест-грибов [18]. Активные метаболиты оценивали по хроматографической подвижности (Rf) и величине зоны ингибирования (+ – фунгистатичность, ++ – фунгитоксичность, +++ – фунгицидность). Обнаружение в структуре активных метаболитов свободных аминов осуществляли путем опрыскивания 1 %-ным раствором нингидрина в этаноле.

#### Результаты и их обсуждение

При просмотре ТСХ-пластин под УФ366 светом обнаружен набор полос, различающихся как по площади, так и по характеру свечения, что дает возможность сделать предположение относительно химической структуры светящихся компонентов (рисунок 1). К примеру, синее свечение при длине волны 366 нм говорит о присутствии соединений фенольной природы, зеленое – циклических соединений [18].



**Рисунок 1 – Хроматограммы этилацетатных экстрактов супернатантов жидких культур бактериальных штаммов под УФ366 светом**

*Примечание.* 1 – *B. velezensis* BZR 336 g; 2 – *B. velezensis* BZR 517.

При обработке хроматографических пластин раствором нингидрина получены отдельные зоны, окрашенные в красный и розовый цвета. Это свидетельствует о присутствии в структурах этих метаболитов (Rf 0,50–0,70) свободных аминогрупп.

Биоавтограммы, полученные с использованием тест-культур фитопатогенных грибов *F. oxysporum* var. *orthoceras* и *Alternaria* sp., позволили обнаружить и дать визуальную оценку антигрибной активности биологически активных метаболитов исследуемых штаммов бактерий. В супернатанте жидкой культуры штаммов

*B. velezensis* выявлено несколько зон ингибирования роста грибов – от фунгистатичности до фунгицидности (таблица 1).

**Таблица 1 – Характеристика коммерческих липопептидов и бактериальных метаболитов с использованием тонкослойной хроматографии и биоавтографии**

Вариант	Rfх100	<i>F.oxysporum</i> var. <i>orthoceras</i>		<i>Alternaria</i> sp.	
		фунгицид	фунгистатик	фунгицид	фунгистатик
коммерческие липопептиды					
Фенгицин	15		+		+
Итурин А	28	+		+	
Сурфактин	75		+		+
экзометаболиты					
Этилацетатный экстракт супернатанта <i>B.velezensis</i> BZR 336 g	18	+++			++
	29	+++			++
	50		++		
	58		+++		+
	70		++		+
Этилацетатный экстракт супернатанта <i>B. velezensis</i> BZR 517	18	+++			++
	29	+++			++
	50		++		
	70		+++		+
эндометаболиты					
Экстракт 70%-ным этанолом клеточных культур <i>B. velezensis</i> BZR336 g	20		++		
	46	+++			
	77		+++		

**Примечание.** + – визуальная оценка степени подавления роста тест-культуры гриба.

При сравнении биоавтограмм исследуемых вариантов и коммерческих липопептидов обнаружено присутствие всех трех липопептидов – сурфактина, итурина А, фенгицина и, возможно, их гомологов, которые ингибируют рост обоих тест-грибов. При этом зоны подавления роста *F. oxysporum* var. *orthoceras* и *Alternaria* sp. отличались как по хроматографической подвижности, так и по степени подавления тест-гриба (учитывая не только площадь зоны ингибирования, но и характер воздействия на гриб) (рисунок 2).

Визуальная оценка обнаруженных в супернатанте жидких культур изучаемых штаммов бактерий антигрибных экзометаболитов по хроматографической подвижности и характеру воздействия на тест-гриб дает возможность предположить, что соединения с Rf 0,18–0,30 можно отнести к гомологам итурина. Соединения с Rf 0,50–0,80, вероятнее всего, имеют структуру гомологов сурфактина. Оба метаболита играют важную роль в проявлении биологической активности штаммов бактерий, так как если итурины имеют выраженную антигрибную активность благодаря их способности образовывать поры в клеточных стенках грибных клеток, то сурфактины способствуют образованию биопленки, что весьма важно для распространения бактериальных клеток [19].

Сурфактин может активировать биохимический каскад молекулярных событий, ведущих к защитной реакции растений. Обнаружена сильная корреляция между активностью, вызывающей защиту, и количеством сурфактина, продуцируемого изолятами. Высказано предположение, что системная устойчивость, индуцированная сурфактином, является результатом небольших изменений растительной клетки, вызванных внедрением молекул сурфактина в липидную мембрану. Эти разрушения мембран недостаточно велики, чтобы нарушить их целостность, но могут быть достаточными, чтобы побудить клетки растений активировать защитные механизмы [20]. Воздействие фенгицина на гриб выявить не

удалось, что, возможно, связано с тем, что фенгицин ингибирует тест-гриб незначительно и это не визуализируется.

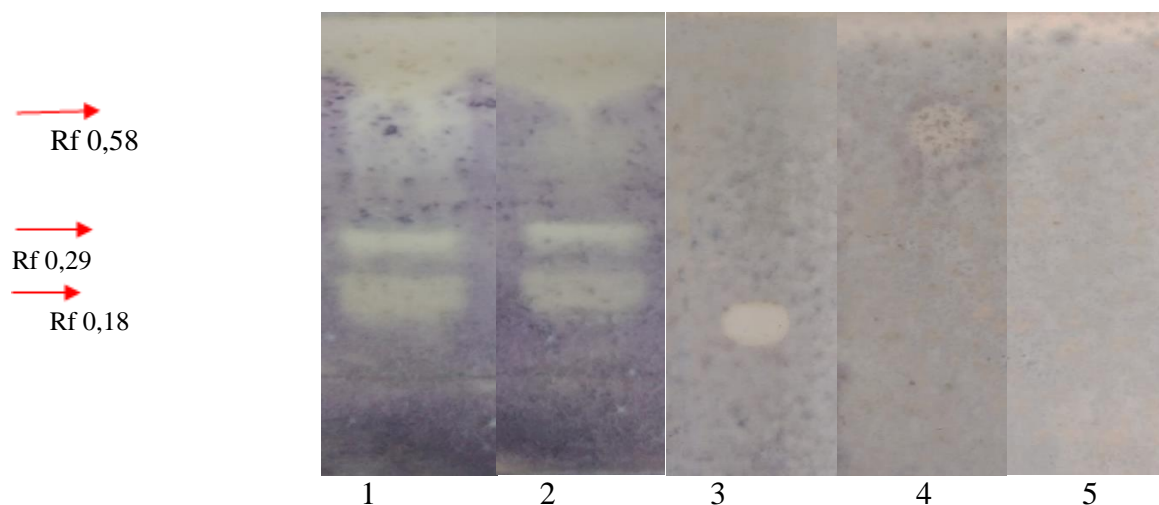


Рисунок 2 – Биоавтограммы с тест-грибом *F. oxysporum var. orthoceras*

**Примечание.** 1 – *B. velezensis* BZR 336 g; 2 – *B. velezensis* BZR 517; 3 – итурин А; 4 – сурфактин; 5 – фенгицин.

В результате экстракции клеточных структур 70 %-ным этанолом и бутанолом также выделены антигрибные эндометаболиты, отличающиеся по хроматографической подвижности от таковых в супернатанте. Хотя характер воздействия на гриб визуально мало отличается от метаболитов в супернатанте, что косвенно может свидетельствовать об их липопептидной природе (рисунок 3).

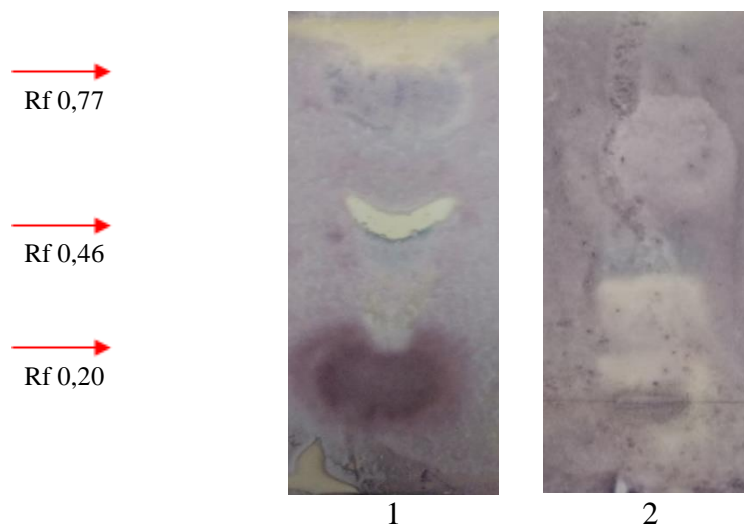


Рисунок 3 – Биоавтограммы эндометаболитов с тест-грибом *F. oxysporum var. orthoceras*

**Примечание.** 1 – экстракция 70 %-ным этанолом; 2 – бутанолом.

На биоавтограммах эндометаболитов, выделенных различными растворителями (70 %-ным этанолом (1) и бутанолом (2)), поведение тест-культуры *F. oxysporum var. orthoceras* и хроматографическая подвижность антифунгальных метаболитов различны, что указывает на то, что с помощью различных приемов можно осуществить выделение метаболитов, химическая структура которых может быть разнообразной, однако они могут принадлежать к семействам одних соединений.

Данный вопрос требует более тщательного изучения для четкого представления о механизме влияния бактериальных метаболитов на фитопатоген.

Полученные результаты показывают потенциальную способность исследуемых штаммов бактерий при оптимальных условиях культивирования продуцировать биологически активные экзо- и эндометаболиты, которые оказывают прямое и косвенное воздействие на фитопатогенный грибок. При подборе штаммов продуцентов для получения эффективных биопрепаратов необходимо исследовать химическое строение и свойства активных метаболитов, которые они синтезируют, поскольку на этой основе могут быть разработаны новые экологически безопасные технологии защиты растений от фитопатогенов. Благодаря присутствию липопептидов, которые, по данным исследователей, не только способствуют образованию пор в клеточной стенке грибного фитопатогена и лизису клетки, но и положительно влияют на системную устойчивость растений и контаминацию растительной ткани микотоксинами, что может быть весьма актуальным при заражении токсиногенными фитопатогенными грибами [19, 20].

Можно предположить, что установленная нами способность исследуемых штаммов синтезировать биологически активные соединения может способствовать их использованию в качестве продуцентов полифункциональных микробиологических препаратов, применение которых подавляет воздействие фитопатогенной микробиоты на защищаемые растения как непосредственно, так и косвенно путем повышения способности растений сопротивляться внедрению фитопатогена, а также снижает контаминацию растительной продукции микотоксинами при заражении растений токсиногенными грибами.

### Выводы

При культивировании в оптимальных условиях штаммов *B. velesensis* BZR 336g и *B. velesensis* BZR 517 синтезируется от пяти до восьми зон ингибирования тест-грибов, что соответствует воздействию на грибок биологически активных экзо- и эндометаболитов, основную часть которых составляют липопептиды – сурфактин, итурин, фенгицин и их гомологи.

Визуальная оценка хроматограмм под УФ 366 светом свидетельствует о возможном присутствии среди метаболитов бактерий штамма *B. velesensis* BZR 336g фенольных соединений и преобладании циклических соединений в составе метаболомного комплекса бактерий штамма *B. velesensis* BZR 517.

Выделенные антигрибные метаболиты различаются как по хроматографической подвижности (Rf), так и степени воздействия на грибок – от фунгистатичности (сурфактины Rf 0,75) до фунгицидности (итурины Rf 0,28).

Способность исследуемых штаммов *B. velesensis* продуцировать биологически активные метаболиты дает возможность рассматривать их в качестве потенциальных продуцентов микробиопрепаратов, которые, могут положительно влиять на системную устойчивость растений, а также снижать контаминацию микотоксинами при заражении растений фузариозной инфекцией.

*Исследования выполнены согласно Государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ в рамках НИР по теме № 0495-2019-0013 «Разработка новых биологических средств защиты растений на основе энтотоокарифагов, энтотоокарифагов и микроорганизмов-антагонистов фитопатогенов и веществ биогенного происхождения»*

### Литература

1. Чеботарь В. К., Щербаков А. В., Щербакова Е. Н., Масленникова С. Н., Заплаткин А. Н., Мальфанова Н. В. Эндоситные бактерии как перспективный биотехнологический ресурс и их разнообразие // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. С. 648–654. DOI: 10.15389/agrobology.2015.5.648rus.

2. Kloepper J., Leong J., Teintze M., Schroth M. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria // *Nature*. 1980. Vol. 28. P. 885–886. DOI: 10.1038/286885a0.
3. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // *Mol. Microbiol.* 2005. Vol. 56. P. 845–857. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
4. Olfa K.-F., Saoussen B. K., Mouna D., Amel K., Hayfa J.-K., Majda D.-R., Slim T. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V 26 for biocontrol of tomato postharvest disease // *Biological Control*. 2016. Vol. 95. P. 73–82. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.01.005.
5. Mnif I., Ghribi D. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical and environmental applications // *Biopolymers*. 2015. Vol. 104. P. 129–147. DOI: 10.1002/bip.22630.
6. Yang L., Quan X., Xue B., Goodwin P.H., Lu S., Wang J., Wei D., Wu C. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // *Biological Control*. 2015. Vol. 85. P. 52–58. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2014.12.010.
7. Ines M., Dhouha G. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity // *Peptides*. 2015. Vol. 71. P. 100–112. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.07.006.
8. Timmusk S., Grantcharova N., Wagner E. G. *Paenibacillus spolymyxa* invades plant roots and forms biofilms // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. Vol. 71. P. 7292–7300. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7292-7300.2005.
9. Ongena M., Jacques P., Touré Y., Destain J., Jabrane A., Thonart P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. Vol. 69. P. 29–38. DOI: 10.1007/s00253-005-1940-3.
10. Боронин А. М. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. 1998. Т. 10. С. 25–31.
11. Ongena M., Duby F., Jourdan E., Beandry T., Jadin V., Dommes J., Thonart P. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. Vol. 67. P. 692–698. DOI: 10.1007/s00253-004-1741-0.
12. Abdallah M. F., De Boevre M., Landschoot S., De Saeger S., Haesaert G., Audenaert K. Fungal endophytes control *Fusarium graminearum* and reduce trichothecenes and zearalenone in maize // *Toxins*. 2018. Vol. 10. P. 493–508. DOI: 10.3390/toxins10120493.
13. Асатулова А. М., Сидорова Т. М., Сидоров И. А., Дубяга В. М., Томашевич Н. С., Жарникова М. Д., Жевнова Н. А., Хомяк А. И. Спектр антифунгальной активности перспективных штаммов-продуцентов биопрепаратов // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. 2012. № 5. С. 167–169.
14. Патент РФ № 2553518 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* BZR 336g для получения биопрепарата против фитопатогенных грибов» // Авторы: Асатулова А. М., Дубяга В. М. Патентообладатель: Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений Российской академии сельскохозяйственных наук». 20.11.2013. Бюл. № 17.
15. Патент РФ № 2552146 «Штамм бактерий *Bacillus subtilis* BZR 517 для получения биопрепарата против фитопатогенных грибов» // Авторы: Асатулова А. М., Дубяга В. М. Патентообладатель: Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт биологической защиты растений Российской академии сельскохозяйственных наук». 20.11.2013. 20.11.2013. Бюл. № 16.
16. Патент № 1824146. «Способ обнаружения физиологически активных веществ растительного происхождения» // Авторы: Чигрин В. В., Розум Л. В., Сидорова Т. М. Патентообладатель: Северо-Кавказский научно-исследовательский институт фитопатологии. 30.06.1993. Бюл. № 24.
17. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. М: Мир, 1981. С. 221–285.
18. Сидорова Т. М., Асатулова А. М., Хомяк А. И., Томашевич Н. С. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR336g и *Bacillus subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии // *Сельскохозяйственная биология*. 2019. Т. 1. С. 178–185. DOI: 10.15389/agrobiol.2019.1.178rus.
19. Сидорова Т. М., Асатулова А. М., Хомяк А. И. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов (обзор) // *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53. С. 29–37. DOI: 10.15389/agrobiol.2019.1.178rus.
20. Максимов И. В., Сингх Б. П., Черепанова Е. А., Бурханова Г. Ф., Хайруллин Р. М. Перспективы применения бактерий-продуцентов липопептидов для защиты растений (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56. С. 19–34. DOI: 10.31857/S0555109920010134.

## References

1. Chebotar V. K., Shcherbakov A. V., Shcherbakova E. N., Maslennikova S. N., Zaplatkin A. N., Mal'fanova N. V. Biodiversity of endophytic bacteria as a promising biotechnological resource // Sel'skokhozyaistvennaya Biologia [Agricultural Biology]. 2015. Vol. 50. No. 5. P. 648–654. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.648rus.
2. Kloepper J., Leong J., Teintze M., Schroth M. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria // Nature. 1980. Vol. 286. P. 885–886. DOI: 10.1038/286885a0.
3. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Mol. Microbiol. 2005. Vol. 56. P. 845–857. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
4. Olfa K.-F., Saoussen B. K., Mouna D., Amel K., Hayfa J.-K., Majda D.-R., Slim T. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V 26 for biocontrol of tomato postharvest disease // Biological Control. 2016. Vol. 95. P. 73–82. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.01.005.
5. Mnif I., Ghribi D. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical and environmental applications // Biopolymers. 2015. Vol. 104. P. 129–147. DOI: 10.1002/bip.22630.
6. Yang L., Quan X., Xue B., Goodwin P.H., Lu S., Wang J., Wei D., Wu C. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* // Biological Control. 2015. Vol. 85. P. 52–58. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2014.12.010.
7. Ines M., Dhouha G. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity // Peptides. 2015. Vol. 71. P. 100–112. DOI: 10.1016/j.peptides.2015.07.006.
8. Timmusk S., Grantcharova N., Wagner E.G. *Paenibacillus spolymyxa* invades plant roots and forms biofilms // Applied and Environmental Microbiology. 2005. Vol. 71. P. 7292–7300. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7292-7300.2005.
9. Ongena M., Jacques P., Touré Y., Destain J., Jabrane A., Thonart P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis* // Applied Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 69. P. 29–38. DOI: 10.1007/s00253-005-1940-3.
10. Boronin A. M. Rhizobacteria of the genus *Pseudomonas* promoting the growth and development of plants // Soros Educational Journal. 1998. Vol. 10. P. 25–31.
11. Ongena M., Duby F., Jourdan E., Beandry T., Jadin V., Dommes J., Thonart P. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression // Applied Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 67. P. 692–698. DOI: 10.1007/s00253-004-1741-0.
12. Abdallah M. F., De Boevre M., Landschoot S., De Saeger S., Haesaert G., Audenaert K. Fungal endophytes control *Fusarium graminearum* and reduce trichothecenes and zearalenone in maize // Toxins. 2018. Vol. 10. P. 493–508. DOI: 10.3390/toxins10120493.
13. Asaturova A. M., Sidorova T. M., Sidorov I. A., Dubyaga V. M., Tomashevich N. S., Zharnikova M. D., Zhevnova N. A., Khomyak A. I. Antifungal activity spectrum of prospective strains-producers for biological products // Biological plant protection is the basis for the agroecosystems stabilization. Krasnodar. 2012. P. 167–169.
14. RF patent No. 2553518. *Bacillus subtilis* BZR 336g bacterial strain for obtaining a biological product against phytopathogenic fungi // Authors: Asaturova A. M., Dubyaga V. M. Patentee: State Scientific Institution “All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection of the Russian Academy of Agricultural Sciences”. 20.11.2013. Bulletin No. 17.
15. RF patent No. 2552146 *Bacillus subtilis* BZR 517 bacterial strain for obtaining a biological product against phytopathogenic fungi // Authors: Asaturova A. M., Dubyaga V. M. Patentee: State Scientific Institution “All-Russian Research Institute of Biological Plant Protection of the Russian Academy of Agricultural Sciences”. 20.11.2013. Bulletin No. 16.
16. USSR patent No. 1824146 Method for detecting physiologically active substances of plant origin // Authors: Chigrin V. V., Rozum L. V., Sidorova T. M. Patentee: North Caucasian Research Institute of Phytopathology. 30.06.1993. Bulletin No. 24. Kirchner J. Thin-layer chromatography. Moscow: Mir, 1981. P. 221–285.
17. Sidorova T. M., Asaturova A. M., Khomyak A. I., Tomashevich N. S. Isolation and characterization of antifungal metabolites of *Bacillus subtilis* strains BZR 336g and BZR 517 using modified bioautography method // Sel'skokhozyaistvennaya Biologia [Agricultural Biology]. 2019. Vol. 54. No. 1. P. 178–185. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.1.178rus.
18. Sidorova T. M., Asaturova A. M., Khomyak A. I. Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms (review) // Sel'skokhozyaistvennaya Biologia [Agricultural Biology]. 2018. No. 53. P. 29–37. DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus.
19. Maksimov I. V., Singh B. P., Cherepanova E. A., Burkhanova G. F., Khairullin R. M. Prospects and applications of lipopeptide-producing bacteria for plant protection (review) // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. No. 56. P. 19–34. DOI: 10.31857/S0555109920010134.



UDC 579.64: 579.222

Sidorova T. M., Asaturova A. M., Allakhverdyan V. V.

### CHROMATOGRAPHIC PROFILES OF ANTIFUNGAL EXO- AND ENDOMETABOLITES OF *BACILLUS VELEZENSIS*

**Summary.** *The antifungal activity of the Bacillus bacteria is based on their ability to produce metabolites. Therefore, when selecting a strain that produces an effective biofungicide, it is necessary to assess the metabolism of bacteria. The aim of this work is to isolate exo- and endometabolites of the promising B. velezensis BZR 336g and B. velezensis BZR 517 strains and assess their antifungal activity. Studies were carried out in 2020–2021. The object of the study is a liquid culture of the B. velezensis BZR 336g and B. velezensis BZR 517 strains. Methods of liquid extraction, ascending thin layer chromatography (TLC), bioautography with a test-culture of Fusarium oxysporum var. orthoceras and Alternaria sp. fungi were used to analyze metabolites. The ability of the strains to accumulate a complex of active metabolites showing antifungal effect from fungistatic to fungicidal action was revealed. On the bioautogram of exometabolites, we found two most pronounced zones (Rf 0.18 and 0.29) of Fusarium oxysporum var. orthoceras BZR P1 growth inhibition (fungicide). Zones with Rf 0.58 for B. velezensis BZR 336g and Rf 0.70 for B. velezensis BZR 517 correspond to the test fungus growth retardation (fungistatic). Significant suppression of Alternaria sp. BZR P8 growth was also observed in two zones (Rf 0.18 and 0.29). The use of surfactin, iturin A, fengycin (Sigma-Aldrich®) in the TLC analysis made it possible to detect similar lipopeptides in the composition of metabolite complexes produced by the studied bacteria. It should be noted that the studied strains differed both in their ability to produce metabolites of different structure (can be found when analyzing chromatograms under ultraviolet light) and in their effect on phytopathogenic fungi in vitro. This may indicate possible differences in the mechanism of antagonistic activity of bacteria against phytopathogenic fungi. Thus, B. velezensis BZR 336g and B. velezensis BZR 517 produce a significant set of antifungal metabolites and can be used as strains to produce effective biofungicides.*

**Keywords:** *Bacillus velezensis, antimicrobial metabolites, lipopeptides, fungicide, fungistatic.*

Сидорова Татьяна Михайловна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории стандартизации и контроля качества биологических средств защиты растений, ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»; 350039, Россия, г. Краснодар, ФНЦБЗР, п/о 39; e-mail: 0166505@mail.ru.

Асатурова Анжела Михайловна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией создания микробиологических средств защиты растений и коллекции микроорганизмов, ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»; 350039, Россия, г. Краснодар, ФНЦБЗР, п/о 39; e-mail: biocontrol-vniibzr@yandex.ru.

Аллахвердян Валерия Вазгеновна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории стандартизации и контроля качества биологических средств защиты растений ФГБНУ «Федеральный научный центр биологической защиты растений»; 350039, Россия, г. Краснодар, ФНЦБЗР, п/о 39; e-mail: lera\_arm@mail.ru.

Sidorova Tatyana Mikhailovna, Cand Sc. (Biol.), senior researcher of the Laboratory for standardization and quality control of biological plant protection products, FSBSI “Federal Research Center of Biological Plant Protection”; Federal Research Center of Biological Plant Protection (FNCBZR) (post office No. 39), Krasnodar, 350039, Russia; e-mail: 0166505@mail.ru.

Asaturova Anzhela Mikhailovna, Cand Sc. (Biol.), head of the Laboratory for the development of microbiological plant protection products and collection of microorganisms, FSBSI “Federal Research Center of Biological Plant Protection”; Federal Research Center of Biological Plant Protection (FNCBZR) (post office No. 39), Krasnodar, 350039, Russia; e-mail: biocontrol-vniibzr@yandex.ru.

Allakhverdyan Valeria Vazgenovna, post-graduate student, junior researcher of the Laboratory for standardization and quality control of biological plant protection products, FSBSI “Federal Research Center of Biological Plant Protection”; Federal Research Center of Biological Plant Protection (FNCBZR) (post office No. 39), Krasnodar, 350039, Russia; e-mail: lera\_arm@mail.ru.

*Дата поступления в редакцию – 28.05.2021.*

*Дата принятия к печати – 25.06.2021.*