

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГРИБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ШТАММА *BACILLUS SUBTILIS* ИБ-54 – АНТАГОНИСТА ПОЧВЕННЫХ МИКРОМИЦЕТОВ

А.И. Мелентьев, В.П. Курченко\*, В.Н. Леонтьев\*\*, Н.Ф. Галимзянова,  
Л.Ю. Кузьмина, Е.А. Гильванова, Н.Г. Усанов, Т.Ф. Бойко, Е.А. Семенова,  
Г.Э. Актуганов

Учреждение Российской Академии наук Институт биологии Уфимского научного центра РАН, Уфа, Россия

\*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

\*\*Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь

### Введение

Поиск и выделение новых штаммов бактерий – антагонистов патогенных грибов остается важной задачей современной биотехнологии, как в связи с необходимостью постоянного обновления средств биоконтроля заболеваний растений и животных [1, 2], так и для скрининга перспективных продуцентов ранее описанных и новых антигрибных соединений [3, 4]. Одной из групп микроорганизмов, характеризующихся большим разнообразием и частой встречаемостью видов антагонистов, являются аэробные эндоспорообразующие бактерии. По своему потенциалу в биосинтезе антибиотических веществ представители рода *Bacillus* уступают только стрептомицетам [5]. Вместе с тем, множество других полезных свойств, в том числе секреция внеклеточных ферментов, аминокислот, полисахаридов, фитогормонов, способность фиксировать азот и растворять фосфаты и т.д. позволяет широко применять различные штаммы в качестве средств защиты растений и пробиотиков [6]. Дополнительными преимуществами бацилл в целом является их повсеместность, относительная легкость культивирования, формирование эндоспор, устойчивых к факторам внешней среды и достаточно низкое содержание патогенных видов. Среди бацилл антагонистическая активность наиболее часто встречается у представителей вида *B. subtilis*. Значительный антагонистический потенциал этого вида связан со способностью его представителей к суммарной продукции более 20 видов различных по структуре антибиотиков, не считая разнообразных летучих фунгицидов неспецифического действия [7].

Ранее нами был выделен и идентифицирован штамм *B. subtilis* ИБ-54, проявляющий антагонистическую активность в отношении грибов – возбудителей корневых гнилей злаковых культур [8]. Однако, впоследствии обнаружилось, что этот штамм проявляет активность против широкого спектра микроорганизмов, включая представителей патогенных бактерий и грибов [9]. В экспериментах *in vivo* была продемонстрирована биологическая безопасность и эффективность *B. subtilis* ИБ-54 в лечении дерматомикозов, вызываемых грибами *Trichophyton gipseum* и *T. rubrum* [10]. Целью настоящей работы являлось выделение и предварительная характеристика антигрибных экзометаболитов из культуральной среды *B. subtilis* ИБ-54, играющих ключевую роль в антагонистической активности этого штамма к микромицетам.

### Методы исследования

В работе использовали штамм *Bacillus subtilis* ИБ-54 из коллекции Института биологии Уфимского научного центра РАН, депонированный во Всероссийской Коллекции промышленных микроорганизмов (ФГУП ГосНИИГенетика) под номером В-9795. В качестве тест-объектов использовали сапротрофные и фитопатогенные микромицеты из коллекций ИБ УНЦ РАН и ВКМ: *Alternaria alternata* Fr. Keissl., *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *A. niger* van Tieghem, *A. versicolor* (Vuill.) Tirab, *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.)

Shoemaker (= *Cochliobolus sativus*), *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc. ВКМ-844, *F. oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans. ВКМ-137, *F. solani* Mart. Sacc. ВКМ-142, *Paecilomyces variotii* Bainier, *Penicillium funiculosum* Thom.

Штамм *B. subtilis* ИБ-54 поддерживали на картофельном (КА) и мясопептонном агаре (МПА) при 37°C, культуры сапротрофных и фитопатогенных грибов – на картофельно-глюкозном агаре (КГА) и агаре Чапека при 28°C.

Таксономическую принадлежность штамма *B. subtilis* ИБ-54 уточняли с помощью классических методов фенотипической дифференциации [11], а также на основе анализа последовательности фрагмента гена 16S рНК (1473 п.о.) Амплификацию гена 16S рНК осуществляли методом ПЦР с использованием универсальных для большинства прокариот концевых праймеров 16SF27 и 16SR1512. Выравнивание и анализ полученной последовательности осуществляли с использованием редактора BioEdit [12].

Для выделения антигрибных соединений *B. subtilis* ИБ-54 штамм выращивали в течение 72 ч на качалке УВМТ-12-250 при 170 об<sup>-1</sup> и 36,5±0,5°C в питательной среде следующего состава (г/л): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 0,5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2; пептон ферментативный, 3,0; дрожжевой экстракт, 3,0; кукурузный экстракт, 3,0, глицерин, 5,0. После завершения культивирования культуральную среду центрифугировали 30 мин при 4000 об<sup>-1</sup>, надосадочную жидкость подкисляли с помощью 2 М HCl до pH 2,0 и оставляли на ночь при +5°C. Сформировавшийся осадок отделяли центрифугированием в тех же условиях, отмывали слабым раствором соляной кислоты (pH 2,0) и снова центрифугировали, после чего суспендировали в небольшом объеме дистиллированной воды. Полученную суспензию нейтрализовали до pH 7,0 на pH-метре Sartorius PB-11 раствором KOH (2 М) и добавляли к ней 60% (о/о) водного раствора метанола. Осадок удаляли центрифугированием, экстракт наносили на колонку (1,5×20 см) с Silica C-18, уравновешенную 60%-ным (о/о) раствором метанола в воде. Сорбент промывали от несвязанных компонентов равновесным растворителем при скорости 1,0 мл/мин, адсорбированные соединения элюировали в линейном градиенте метанола в воде 60–90% (о/о). Пептидные соединения регистрировали по поглощению при 254 нм с проточным УФ-детектором 2238 Uvicord SII, элюат собирали во фракции объемом 5 мл. Активные фракции объединяли и концентрировали на роторно-пленочном испарителе в вакууме при 30°C.

Оценку антигрибной активности выделенных соединений проводили методом диффузии в агар [13]. Минимальную ингибирующую концентрацию по отношению к различным микромицетам определяли в чашках с КГА. Для этого готовили серию разведений веществ, полученных на стадии экстракции метанолом. Приготовленные растворы стерилизовали через бактериальные фильтры (диаметр пор 0,45 мкм) и вносили в расплавленную агаризованную среду, охлажденную до 45°C и равными объемами разлитую в чашки Петри. После застывания среды на ее поверхность в пяти точках уколом высевали грибы. В контрольный вариант среды не добавляли ничего. Время инкубации при 28°C для различных видов микромицетов составляло до 7 суток. Радиальный рост оценивали каждые сутки, за минимальную ингибирующую концентрацию принимали количество вещества, вызывающую достоверное снижение скорости роста на не менее чем 10% по сравнению с контролем.

Восходящую тонкослойную хроматографию активных экзометаболитов *B. subtilis* ИБ-54 проводили на пластинах (5×10 см) модифицированного силикагеля Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck) в системе растворителей н-бутанол:ледяная уксусная кислота:вода (12:4:6). Для выявления пептидных соединений после завершения ТСХ пластины обрабатывали 0,25%-ным (о/о) водным раствором ацетона. Для выявления активных компонентов на хроматограмме с помощью биоавтографии [14] после завершения ТСХ пластины силикагеля высушивали в чашках Петри под УФ-облучением в течение 20 мин. Затем их заливали тонким слоем (1–2 мм) КГА или агара Чапека, на который после застывания инокулировали суспензию спор тест гриба (10<sup>3</sup>–10<sup>4</sup> КОЕ/мл). О локализации активных компонентов судили по формированию стерильной зоны в соответствующей области миграции разделяемых

соединений.

Для проведения аминокислотного анализа пептидного компонента частично очищенные метаболиты подвергали гидролизу в запаянной ампуле с 6 н HCl при 110°C в течение 24 часов. Продукты гидролиза исследовали стандартным методом постколоночной дериватизации на анализаторе ТЗЗ9М. Перерасчет содержания обнаруженных аминокислот проводили исходя из начального содержания сухого вещества анализируемого препарата равного 35 мг.

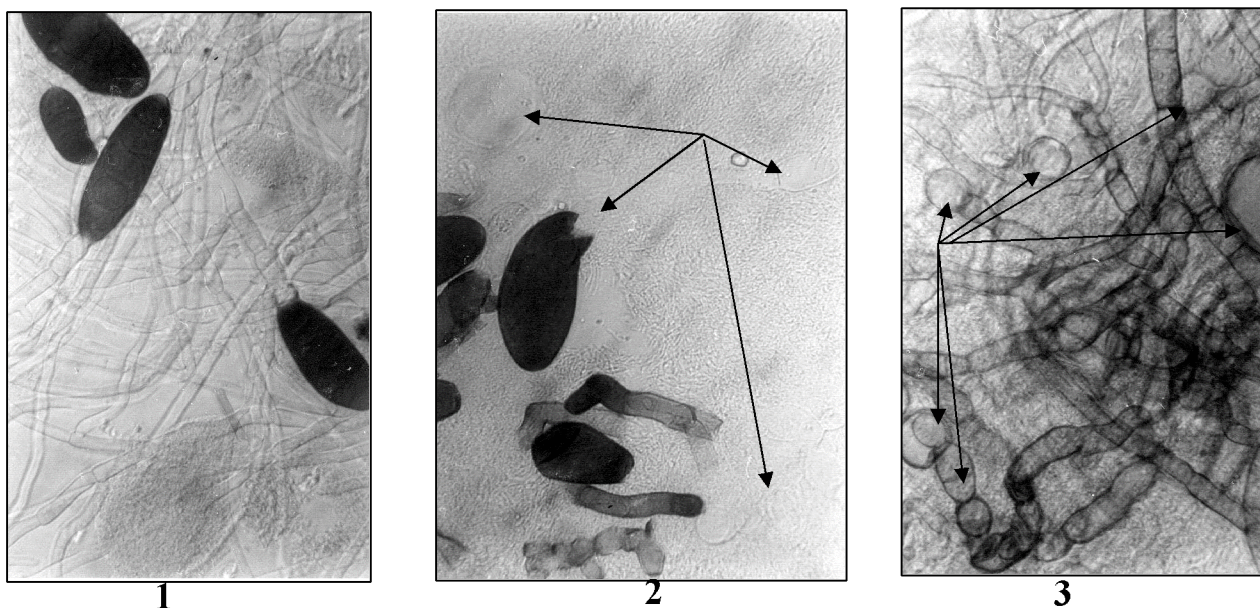
Оценку термостабильности антигрибных соединений *B. subtilis* ИБ-54 проводили, инкубируя активные фракции после стадий кислотного осаждения и экстракции метанолом при 100°C в кипящей водяной бане в течение 6 ч. Отбор образцов для анализа на антигрибную активность проводили после каждого часа инкубации.

Устойчивость пептидных экзометаболитов *B. subtilis* ИБ-54 к протеазам оценивали следующим образом. Культуральную жидкость штамма (72 ч) освобождали от клеток центрифугированием, лиофильно высушивали и готовили препараты концентрацией 20 мг/мл. Приготовленные образцы инкубировали в течение 24 ч при +37°C с пепсином (0,05 мг/мл, 25 мМ фосфатно-цитратный буфер, pH 5,0), проназой из *Streptomyces griseus* (1 мг/мл, 25 мМ трис-HCl, pH 7,5), щелочной протеазой (1 мг/мл, pH 7,5) и протеиназой К (0,05 мг/мл). Остаточную антигрибную активность оценивали методом диффузии в агар. В качестве контроля использовали образцы препаратов, инкубированные без соответствующих протеаз. Влияние метаболитов *B. subtilis* ИБ-54 на клетки грибов изучали с помощью оптического микроскопа Leica DM1000.

Эксперименты по оценке активности антигрибных соединений исследуемого штамма, определению минимальной ингибирующей концентрации очищенных веществ и изучению их физико-химических характеристик проводили в 3-кратной повторности. В качестве критерия достоверности рассчитанных значений использовали t-критерий при степени вероятности P=0,95.

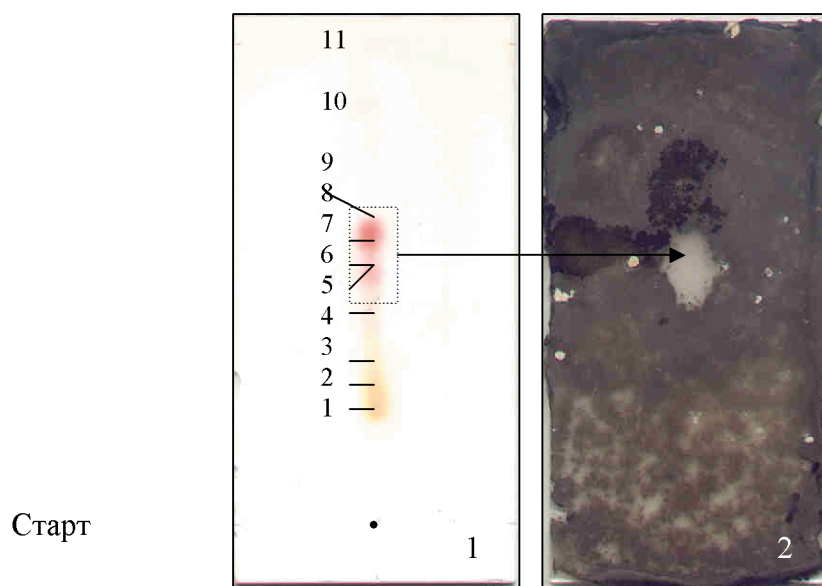
### Результаты и обсуждение

Среди большой группы исследованных нами бацилл-антагонистов, в том числе относящихся к виду *B. subtilis*, штамм ИБ-54 показывал значительную активность в отношении наиболее широкого спектра видов микромицетов. Проявление эффекта *B. subtilis* ИБ-54 на микромицеты в бинарных культурах, как при поверхностном, так и глубинном выращивании, было примерно одинаково и заключалось в сегментном раздувании грибных гиф с последующим формированием сферопластоподобных структур (рисунок 1). В целом, такая реакция на воздействие антагониста наблюдалась у различных видов микромицетов в рамках их морфологических и физиологических особенностей, тогда как ее сила и интенсивность коррелировала со специфической видовой чувствительностью грибов. Основной причиной образования вздутых и пузыревидных образований на грибных гифах, по всей видимости, являются структурно-функциональные изменения в цитоплазматической мембране (ЦПМ), приводящие к нарушению ее проницаемости. Сходный эффект наблюдался при действии ряда синтетических производных триазолов, которые, как известно, ингибируют синтез эргостерола – компонента грибных мембран [15]. Среди вторичных метаболитов, подавляющих рост и развитие микромицетов, у бацилл наиболее распространены циклические липопептиды [7], биологическая активность которых обусловлена их специфическими амфифильными свойствами. Липопептиды могут легко встраиваться в ЦПМ и, в зависимости от концентрации, приводить к дестабилизации заряда мембраны, нарушению ее барьерных функций, формированию ионных каналов, либо к полному разрыву мембраны [16, 17]. Характер цитоморфологических изменений микромицетов при их взаимодействии с *B. subtilis* ИБ-54 показывает, что активность штамма, по-видимому, обусловлена продукцией циклических липопептидов. ТСХ-анализ ацетонового экстракта экзометаболитов, образуемых в бинарной культуре бактерий с некоторыми микромицетами, показал наличие антигрибных соединений пептидной природы, подвижных в системе растворителей, содержащих н-бутанол (рисунок 2).



1 – контроль гриба после 4-х суток роста; 2 – синхронная культура гриба и бактерий, 4-е сутки; 3 – асинхронная культура гриба и бактерий с предварительным выращиванием гриба при 28°C в течение 24 ч (3-и сутки совместного роста). Световая микроскопия,  $\times 400$ . Стрелками показаны разбухания гиф при прорастании спор (2), апикальное формирование сферопластоподобных структур (3)

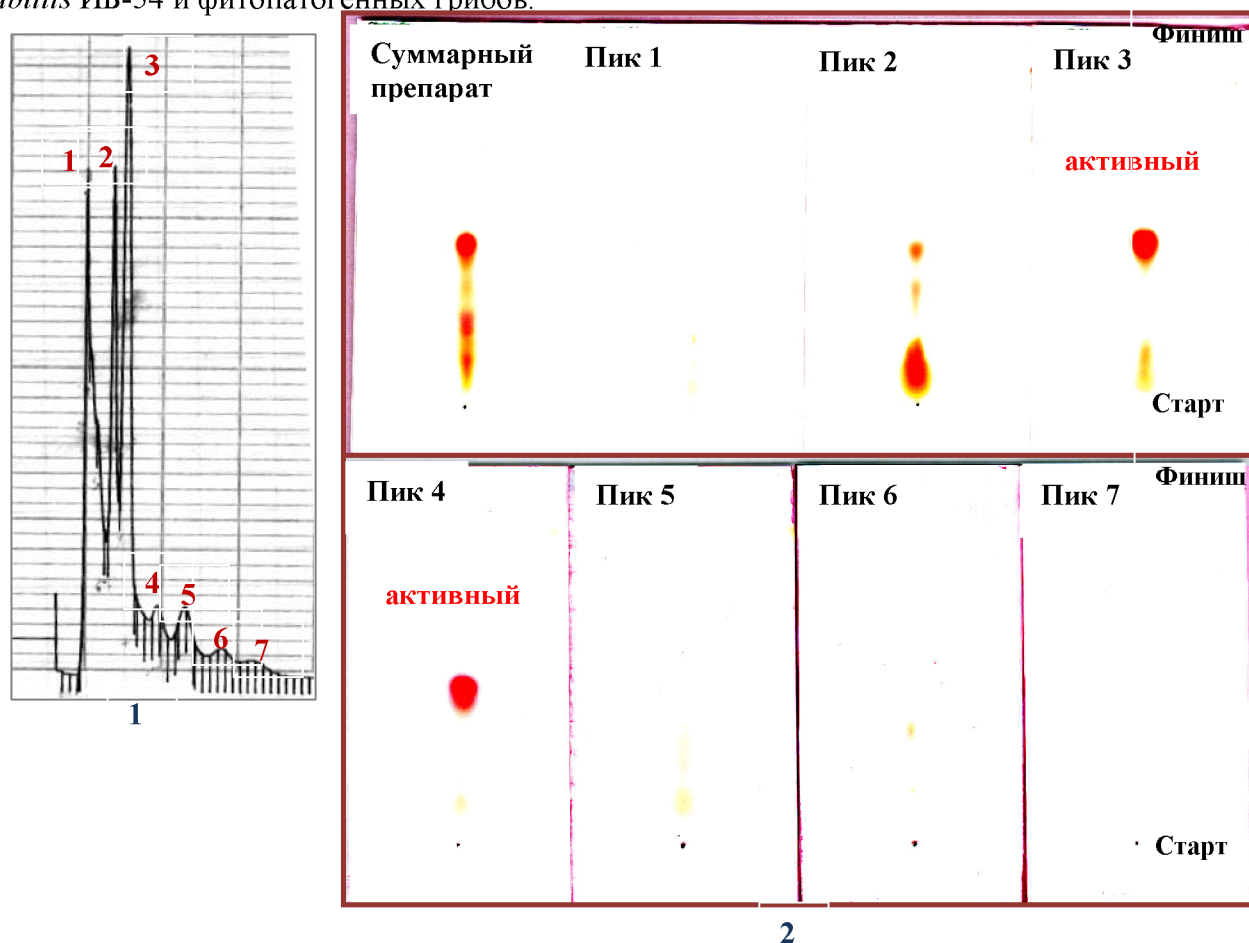
Рисунок 1 – Влияние *B. subtilis* ИБ-54 на развитие гриба *Bipolaris sorokiniana* при глубинном выращивании в совместной культуре при статических условиях (картофельно-глюкозная среда)



Пластина после окрашивания нингидрином (1) и (2) биоавтографии с тем же грибом. Относительная подвижность выявленных подвижных компонентов:  $R_f \sim 0,21$  (1); 0,30 (2); 0,35 (3); 0,44 (4); 0,47 (5); 0,52 (6); 0,55 (7); 0,62 (8); 0,69 (9); 0,79 (10); 0,87 (11). Наибольшей интенсивностью окраски (от розового до красного) характеризовались компоненты 6 и 8 (особенно 8), в зоне которых (включая компонент 7) и наблюдалась локализация активной субстанции при биологическом анализе хроматограммы

Рисунок 2 – Тонкослойная хроматография (Kieselgel F<sub>254</sub>) экзометаболитов, синтезируемых штаммом *B. subtilis* ИБ-54 в смешанной синхронной культуре с *B. sorokiniana* (жидкая среда Чапека с 1% сахарозы)

При обработке пластин нингидрином активные вещества, локализованные в зоне компонентов с относительной подвижностью ( $R_f$ ) от 0,47 до 0,62, характеризовались наибольшей интенсивностью окраски с цветом от розового до красного, свойственного для аминокислот и пептидов. К сожалению, анализ на присутствие жирнокислотной составляющей в группе описанных соединений не был нами проведен, что не давало полного основания для вывода об их липопептидной природе. Косвенным доказательством амфифильности обнаруженных соединений являлась их хорошая растворимость в смесях полярных растворителей с водой, например, 80–90%-ном (о/о) ацетоне или 50%-ном (о/о) н-бутаноле. Вместе с тем, антигрибные соединения *B. subtilis* ИБ-54 не экстрагировались неполярными растворителями типа хлороформа, что также может указывать на их амфифильную природу. Гель-фильтрация концентрированного ацетонового экстракта культуральной жидкости исследуемого штамма показала, что молекулярная масса активных метаболитов составляет существенно меньше, чем 5 кДа (рисунок 3), а ТСХ соответствующей фракции (рисунок 3, 2) подтвердила сходство в относительной подвижности с антигрибными соединениями, образующимися в совместной культуре *B. subtilis* ИБ-54 и фитопатогенных грибов.



Элюент (1) – натрий-фосфатный буфер (50 мМ, рН 6,4), скорость элюции – 1,0 мл/мин. Собранные после гель-фильтрации фракции пиков, концентрировали упариванием при комнатной температуре и наносили на пластины Kieselgel 60 F<sub>254</sub>.

Рисунок 3 – Preparative жидкостная хроматография (1) ацетонового экстракта антигрибных соединений из культуральной жидкости *Bacillus subtilis* ИБ-54 в гидрофильных условиях на колонке (1,5×20 см) с фрактогелем TSK HW-40 (Merck) с последующей тонкослойной хроматографией (2) разделенных пиков на пластинах (5×10 см) Kieselgel 60 F<sub>254</sub> в стандартных условиях

Для выделения активной фракции метаболитов из культуральной среды *B. subtilis* ИБ-54 использовали широко известную методику, основанную на осаждении липопептидов и биоПАВ при подкислении [18]. По результатам первичного осаждения таким методом удавалось выделить от 60 до 70% от первоначального объема активных веществ (данные не представлены). В супернатанте после его нейтрализации обнаруживались следы активности, которые можно было выделить повторно аналогичным способом после его концентрирования. Однократная экстракция промытого осадка 60%-ным (о/о) водным раствором метанола позволяла получить не менее 2/3 суммарного объема активных компонентов. ТСХ-анализ метанольного экстракта показывал присутствие в нем от 3 до 4 четко различимых пептид-содержащих компонентов, выявляемых нингидрином. При препаративной обратнофазовой хроматографии в системе метанол:вода (60:40) антигрибные вещества полностью связывались с сорбентом, тогда как вещества с антибактериальной активностью большей частью выходили с элюентом (рисунок 4). Дальнейшее ступенчатое повышение содержания метанола до соотношения 90:10 приводило к элюции адсорбированных соединений в виде пика, который полностью не совпадал с профилем антигрибной активности, «размытой» на более чем 10 фракций (рисунок 4).

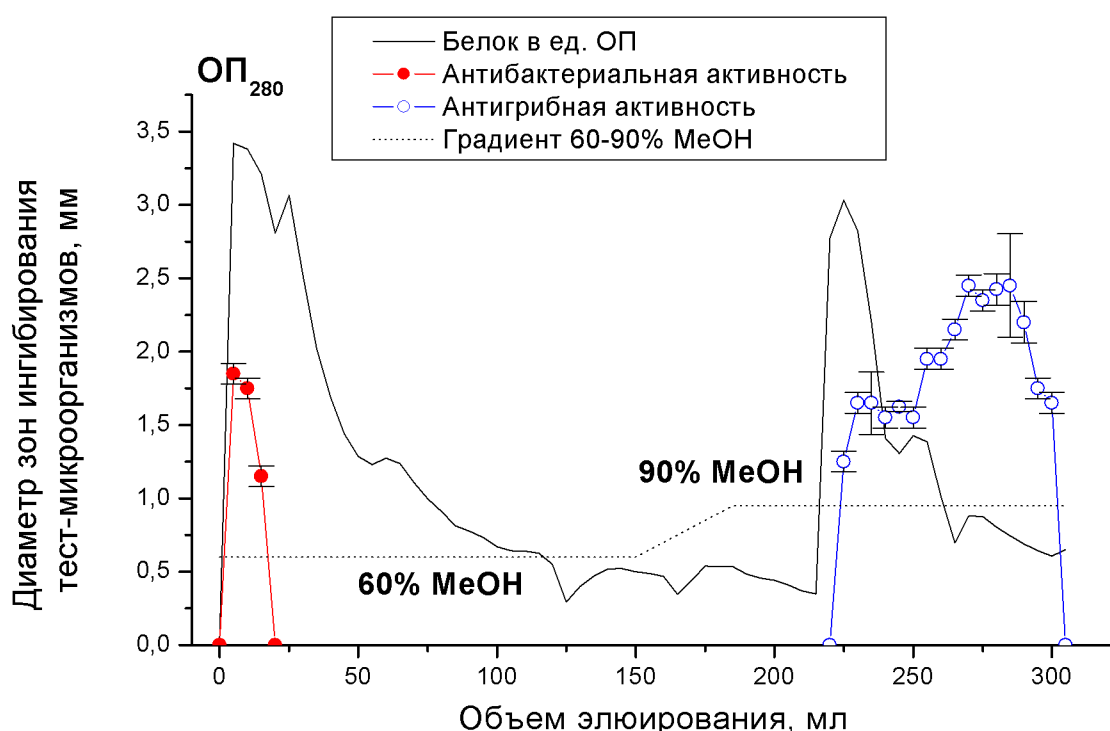


Рисунок 4 – Препаративная гидрофобная хроматография метанольного экстракта (60%) антигрибных соединений штамма *B. subtilis* ИБ-54 на колонке (1,5×20 см) с Silica C-18

Оценка устойчивости антигрибных соединений исследуемого штамма к протеолитическим ферментам показала, что они не могут быть отнесены к антибиотикам чисто белковой или пептидной природы, многие из которых чувствительны к действию протеаз [19–21]. Активность метаболитов *B. subtilis* ИБ-54 практически полностью сохранялась после обработки различными протеазами в течение 24 ч (таблица 1). Лишь в присутствии пепсина наблюдалось достоверное снижение активности по сравнению с контролем в интервале 10–25%. Следует отметить, что пептидный компонент липопептидных антибиотиков бацилл может быть устойчив к протеолизу в силу жесткости пептидного цикла и наличия в нем как необычных аминокислот, так и стереоизомеров аминокислот в D-конфигурации.

Таблица 1 – Влияние обработки протеолитическими ферментами в течение 24 ч при 37°C на активность суммарной фракции антигрибных соединений *B. subtilis* ИБ-54

Фермент	рН инкубационной смеси (буфер)	Средняя площадь зоны подавления роста <i>B. sorokiniana</i> , мм <sup>2</sup>	Относительная активность, %
Контроль (без ферментов)	7,5 (трис-НСl)	283±47	100
Проназа	7,5 (трис-НСl)	251±22	88
Протеиназа К	7,5 (трис-НСl)	291±12	103
Щелочная протеаза	7,5 (трис-НСl)	227±11	80
Контроль (без ферментов)	5,0 (фосфатно-цитратный)	170±10	100
Пепсин	5,0 (фосфатно-цитратный)	126±34	74

Исследуемые антигрибные соединения были стабильны и сохраняли свою активность при повышенной температуре и широком диапазоне значений рН. В отличие от многих описанных соединений пептидной и полипептидной природы антигрибная активность веществ, образуемых *B. subtilis* ИБ-54, достоверно возрастала после 1 ч инкубации при 100°C, дальнейшее выдерживание активных проб в течение 5 ч приводило к снижению оригинальной активности лишь на 25–30% (рисунок 5).

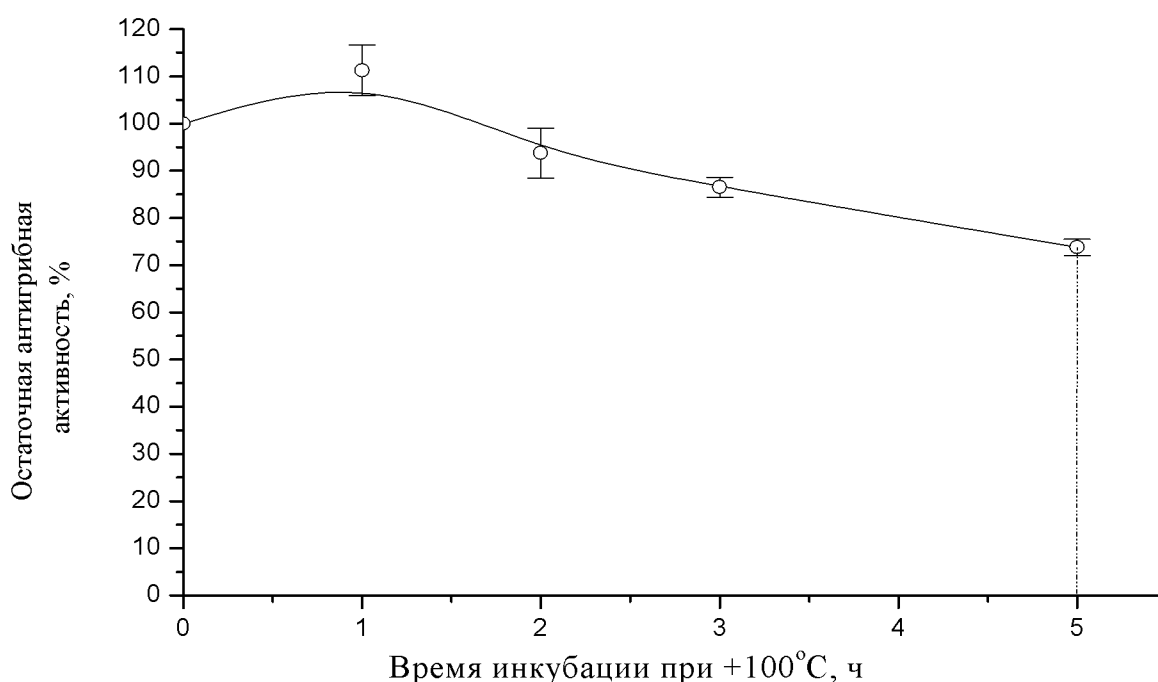


Рисунок 5 – Термостабильность очищенной фракции липопептидных метаболитов *B. subtilis* ИБ-54 при 100°C, оцениваемая по относительному снижению рост-ингибирующей активности в отношении фитопатогена *Bipolaris sorokiniana* при концентрации антигрибных соединений 2 мкг на 1 мл КГА (оценка на третьи сутки роста при 28°C)

Результаты аминокислотного анализа очищенной фракции (таблица 2) показали присутствие в ней посторонних примесей, поскольку содержание суммы аминокислот в гидролизате исследуемого препарата в пересчете на сухой вес составляло около 16,3%-мас. В то же время у большинства описанных в литературе циклических липопептидов молярное содержание пептидного компонента составляет 80–90% [7]. В полученном продукте были

обнаружены все аминокислоты, входящие в состав различных классов циклических липопептидов, за исключением триптофана. По соотношению доминирующих аминокислот (лейцин:глутаминовая кислота:валин:треонин:фенилаланин:аспарагиновая кислота, 2:1,01:0,91:0,61:0,58:0,51) метаболиты *B. subtilis* ИБ-54 весьма близки к сурфактинам и лихенизинам [16, 22], однако большие количества треонина и фенилаланина указывают на присутствие в этой смеси и других пептидных соединений, поскольку эти аминокислоты не были выявлены ранее у всех известных классов циклических липопептидов бацилл [7]. Оценка суммы аминокислот, присутствующих в анализируемом препарате, при условии его гомогенности дает значение молекулярной массы пептидного компонента 2256,81 Да. В то же время, общая масса обнаруженных аминокислот, характерных для структуры известных липопептидов бацилл, составляет 1150,24 Да, что близко среднему значению молекулярной массы смеси различных циклических липопептидов (около 1015 Да). Представленные данные свидетельствуют, скорее всего, о гетерогенности очищенного препарата *B. subtilis* ИБ-54, включающего помимо циклических липопептидов другие пептид-содержащие амфифильные соединения.

Таблица 2 – Аминокислотный анализ фракции антигрибных метаболитов, выделенных из культуральной жидкости *B. subtilis* ИБ-54 осаждением 2 М HCl с последующей тройной экстракцией 60% об. (1) и 90% об. (2) метанолом, и очисткой на гидрофобной матрице Silica C-18 (сухой вес образца 36,3–36,4 мг)

Аминокислота	Площадь пика	Содержание в мг на 1 г сухого препарата	Содержание в масс.% от сухого препарата	Содержание в масс.% от суммы аминокислот
Аспаргат	7603	10,604	1,1	6,5
<u>Треонин</u>	<u>11700</u>	<u>12,438</u>	<u>1,2</u>	<u>7,7</u>
Серин	3649	3,593	0,4	2,2
<b>Глутамат</b>	<b>13721</b>	<b>20,726</b>	<b>2,1</b>	<b>12,8</b>
Пролин	1097	6,124	0,6	3,8
Глицин	5103	3,530	0,4	2,2
Аланин	5094	4,081	0,4	2,5
<b>Валин</b>	<b>14329</b>	<b>18,745</b>	<b>1,9</b>	<b>11,5</b>
Метионин	4553	6,968	0,7	4,3
Изолейцин	6404	8,038	0,8	4,9
<b>Лейцин</b>	<b>34038</b>	<b>41,336</b>	<b>4,1</b>	<b>25,4</b>
Тирозин	1508	2,633	0,3	1,6
<u>Фенилаланин</u>	<u>7391</u>	<u>12,035</u>	<u>1,2</u>	<u>7,4</u>
Лизин	1491	2,539	0,3	1,6
Гистидин	1683	4,620	0,5	2,8
Аргинин	1368	3,158	0,3	1,9

Анализ концентрационных кривых доз ингибирования и влияния выделенных метаболитов на скорость развития различных микромицетов при поверхностном культивировании показал, что наибольшую чувствительность к липопептидам *B. subtilis* ИБ-54 проявляют грибы – возбудители корневых гнилей злаков, в т.ч. *Alternaria alternata*, *Bipolais sorokiniana* и *Fusarium culmorum*. Штаммы перечисленных микромицетов могут рассматриваться как специфические модельные объекты для экспресс-оценки минимальных количеств циклических липопептидов, образуемых антагонистами, различающимися по уровню своей активности. Другие виды фузариев демонстрировали существенно более высокую устойчивость, сравнимую с устойчивостью грибов-дерматофитов (таблица 3). Наконец, практически резистентными к действию метаболитов *B. subtilis* ИБ-54 в их физиологических концентрациях были представители сапротрофной почвенной микофлоры (таблица 3). Достаточно высокие значения эффективной ингибирующей концентрации для



многих грибов обусловлены, как упоминалось выше, присутствием в очищенных фракциях липопептидов *B. subtilis* ИБ-54 большого количества посторонних примесей (не менее 80%).

### Выводы

Результаты предварительных исследований свидетельствуют о том, что антагонистическая активность штамма *B. subtilis* ИБ-54 к микромицетам обусловлена в основном синтезом циклических липопептидов, близких к сурфактинам и итуринам. Высокий уровень активности бактерий к широкому спектру грибов, проявляющих различную чувствительность к их экзометаболизмам, показывает специфический характер взаимодействия штамма с различными видами микромицетов, связанный с особенностями образования им тех или иных антигрибных соединений. Перспективность исследуемого штамма заключается в секрети большого набора активных метаболитов, в том числе новых антигрибных соединений липопептидной структуры, отличающихся от известных наличием нехарактерных аминокислот. Изучение свойств *B. subtilis* ИБ-54 и образуемых им антигрибных соединений подтверждают высокий потенциал этого штамма для разработки средств защиты растений от болезней, вызываемых фитопатогенными грибами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 10-04-90036-Бел\_a.

### Список литературы

1. Chincholkar, S.B. Biological control of plant diseases / S.B. Chincholkar, K.G. Mukerji. – London: Routledge, 2007. – 426 p.
2. Tannok, G.W. Probiotics and prebiotics: scientific aspects / G.W. Tannok. – Horizon Scientific Press, 2005. – 230 p.
3. De Lucca, A.J. Antifungal peptides: origin, activity and therapeutic potential / A.J. De Lucca, T.J. Walsh // Rev. Iberoam. Micol. – 2000. – Vol. 17. – P. 116–120.
4. Bonmatin, J.M. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents / J.M. Bonmatin, O. Laprevote, F. Peypoux // Comb. Chem. High Throughput Screen. – 2003. – Vol. 6. – P. 541–556.
5. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites / S. Omura [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98. – P. 12215–12220.
6. Смирнов, В.В. Спорообразующие аэробные бактерии – продуценты биологически активных веществ / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, И.А. Василевская. – Киев: Наук. Думка, 1982. – 279 с.
7. Stein, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions / T. Stein // Molecular Microbiology. – 2005. – Vol 56. – P. 845–857.
8. Мелентьев, А.И. Изучение антагонизма между почвенными бациллами и микромицетами рода *Fusarium* Lk:Fr / А.И. Мелентьев, А.М. Еркеев // Микробиол. Журн. – 1990. – Т. 52, №1. – С. 53–56.
9. Антагонистическая активность бактерий рода *Bacillus* в отношении грибов дерматофитов / Лукманова К.А. [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2008. №4. – С. 21–23.
10. Доклинические испытания и оценка стабильности опытного биопрепарата наружного применения для лечения и профилактики дерматомикозов / Лукманова К.А. [и др.] // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2009. – №2. – С. 147–148.
11. Gordon, R.E. The genus *Bacillus* / R.E. Gordon // Agricultural handbook № 427. Wash. C.D., 1973. – 275 p.
12. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T.A. Hall // Nucleic Acids Symp. Ser. – 1999. – Vol. 41. – P. 95–98.
13. Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антагонистической активности / Н.С. Егоров. – М.: Высш. шк., 1975. – 208 с.

14. Блинов, Н.О. Бумажная хроматография антибиотиков / Н.О. Блинов, А.С. Хохлов. – М.: «Наука», 1970. – 364 с.
15. Georgopapadaku, N.H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs / N.H. Georgopapadaku // *Current Opinion in Microbiology*. – 1998. – Vol. 1. – P. 547–557.
16. Seydlova, G. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications / G. Seydlova, J. Svobodova, // *Cent. Eur. J. Med.* – 2008. – Vol. 3. – P. 123–133.
17. Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic / R. Maget-Dana [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1985. – Vol. 815. – P. 405–409.
18. Биоэмульгатор, образуемый культурой *Bacillus* species, и его свойства / А.Н. Шульга // *Микробиол. Журн.* – 1990. – Т. 52, №5. – С. 78–82.
19. Katz, E., Demain, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis and possible functions / E. Katz, A.L. Demain // *Bacteriol. Rev.* – 1977. – Vol. 41. – P. 449–474.
20. Выделение и характеристика полипептида *Bacillus subtilis* K-1-1 – ингибитора роста фитопатогенных грибов и бактерий / Н.С. Захарченко [et al.] // *Биотехнология*. – 2007. – №3. – С. 21–26.
21. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest / M.P. Lisboa [et al.] // *Int. Microbiol.* – 2006. – Vol. 9. – P. 111–118.
22. Structural characterization of lichenysin A by fast atom bombardment tandem mass spectrometry / M.M. Yakimov [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1999. – Vol. 1438. – P. 273–280.

**ISOLATION AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION OF ANTIFUNGAL COMPOUNDS PRODUCED BY *BACILLUS SUBTILIS*, STRAIN IB-54, ANTAGONISTIC AGAINST SOIL MICROMYCETES**

**A.I. Melentjev, V.P. Kurchenko\*, V.N. Leontjev\*\*, N.F. Galimzianova,  
L.Yu. Kuzmina, E.A. Gilvanova, N.G. Usanov, T.F. Boyko, E.A. Semenova,  
G.E. Aktuganov**

*The Institute of Biology of Ufa Research Center of Russian Academy of Sciences, Ufa,  
Russia*

*\*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

*\*\*Belarusian State Technology University, Minsk, Belarus*

*B. subtilis*, strain IB-54, antagonistic against broad spectrum of plant pathogenic and saprophyte fungi, produces constitutively low-molecular antifungal compounds. Effective 1-fold precipitation of most of active substances (60–70%) from the culture supernatant with 2 M hydrochloric acid indicates that these are predominantly cyclic lipopeptides. Amphiphilic nature of antifungal compounds is confirmed with thin-layer chromatography, while gel-filtration revealed that its molecular weight significantly less than 5 kDa. TLC-analysis detected also in total antifungal fraction at least 3–4 various peptide components differing on its R<sub>f</sub> coefficients. Antifungal compounds were additionally purified by preparative chromatography on Silica C-18. Isolated fractions were thermo- and pH-stable, resistant to action of proteases. Analysis of amino acid composition in acid hydrolysate of purified fraction revealed amino acids prevailing in structure of surfactins and iturins, however it found also unusually large content of indistinctive amino acids, such as threonine and phenylalanine. Most sensitive to inhibiting action of isolated compounds are plant pathogenic fungi – *A. alternata*, *B. sorokiniana*, *F. culmorum*.