

УДК 579.64

И.И. НОВИКОВА*, Ю.Д. ШЕНИН

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, 196608

e-mail: irina_novikova@inbox.ru

Выделение, идентификация и антигрибная активность метаболитов комплекса гамаир, образуемого штаммом *Bacillus subtilis* М-22 — продуцентом биопрепарата для защиты растений от микозов и бактериозов

Из штамма-продуцента биопрепарата для защиты растений от болезней разной этиологии *Bacillus subtilis* М-22 выделен метаболитный комплекс гамаир, обладающий широким спектром действия в отношении фитопатогенных бактерий, включая *Pseudomonas corrugata*, *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria*, и грибов *Fusarium*, *Verticillium*, *Ascochyta*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria* и др. Методами ЯМР- и ИК-спектроскопии показано, что комплекс активных веществ представляет собой смесь гамаира А (близкого к бациллину) и гамаира В—D (гексаенов типа медиоцидина). Изучены химические и биологические свойства препаратов гамаира А—D. В полевых опытах на культуре томата показано, что биологическая эффективность биопрепарата гамаир в отношении бактериального увядания, некроза сердцевины стебля и мягкой гнили достигала 70—90%, а прибавка урожая томата составила 25—35 %.

Ключевые слова: бактерицидная активность, выделение, гексаеновые антибиотики, идентификация, полипептидные антибиотики, ферментация, фитопатогенные грибы и бактерии, фунгицидная активность, хроматография.

В последние годы в сельскохозяйственную науку и практику прочно вошел новый термин — экологическое земледелие, подразумевающее развитие сельского хозяйства как единого организма, понимаемого как живая экосистема.

В основе современной концепции защиты растений от болезней и вредных членистоногих лежат представления о необходимости перехода от отдельных приемов и методов к «конструирова-

нию» экологически устойчивых агроэкосистем. При этом существенный вклад в обеспечение экологического равновесия должна внести оптимизация системы трофических связей и других механизмов саморегуляции биоценозов.

Главными показателями адаптивности сельского хозяйства, наряду с ростом урожайности и качества продукции, являются ресурсо-, энергоэкономичность технологий, природоохранный эффект,

Новикова Ирина Игоревна, Шенин Юрий Дмитриевич.

Список сокращений: а.е.м. — атомные единицы массы; ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ГМС — гексаметилсилан; ДМСО — диметилсульфоксид; ДМСО-d₆ — ДМСО полностью дейтерированный; ИК — инфракрасная спектроскопия; КЖ — культуральная жидкость; КХ — колоночная хроматография; м.д. — миллионные доли; МПА — мясо-пептонный агар; МПБ — мясо-пептонный бульон; МПК — минимальная подавляющая концентрация; СП — смачивающийся порошок; СПА — сухой питательный агар; ТСХ — тонкослойная хроматография; УФ — ультрафиолетовый; ЯМР — спектроскопия ядерно-магнитного резонанса; Rf — отношение длины пробега вещества к длине пробега растворителей.

* Автор для переписки.

оптимизация среды обитания полезных организмов и повышение стрессоустойчивости агроэкосистем [1]. С точки зрения современного системного подхода растения в биогеоценозе составляют ядро сложных биологических систем-консорциев, включающих разнообразные группы гетеротрофов, в том числе, специфический микробиоценоз возбудителей болезней, их антагонистов и гиперпаразитов.

В связи с расширением использования микробиологических средств защиты растений актуальна проблема поиска новых микроорганизмов, продуцирующих биологически активные вещества с широким спектром антипаразитарного действия.

Из Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВИЗР в результате скрининга штаммов бацилл и их метаболитов, обладающих антагонистической активностью, был отобран штамм *Bacillus subtilis* М-22. Штамм продуцирует метаболитный комплекс, названный нами гамаир, характеризующийся широким спектром действия в отношении фитопатогенных грибов и бактерий [2]. На основании результатов регистрационных испытаний и токсикологических исследований препаративные формы биопрепарата гамаир в виде смачивающегося порошка и таблеток включены в «Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных для применения на территории Российской Федерации» сроком на 10 лет. Биопрепарат рекомендован для защиты зерновых, овощных, плодово-ягодных, декоративных культур и картофеля от бактериальных и грибных болезней (фузариозная, питиозная, гельминтоспориозная и церкоспореллезная корневые гнили, септориоз, сетчатый гельминтоспориоз, фузариозные и вертициллезные увядания, бактериальный рак и некроз сердцевин стебля томата, мягкая гниль овощных культур и т.д.).

Целью настоящего исследования являлось изучение компонентного состава активного метаболитного комплекса штамма *B. subtilis* М-22, физико-химическая и биологическая оценка его активных компонентов и их идентификация, а также проведение расширенных экспериментов по изучению характера их действия.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали различные микроорганизмы возбудители болезней растений (табл. 1).

Выделение антибиотиков. Культуральную жидкость *B. subtilis* М-22 экстрагировали дважды н-бутанолом в соотношении 2:1 и 1:4 при комнатной температуре и энергичном механическом перемешивании. После удаления растворителей под

вакуумом остаток представлял собой темно-коричневое масло, которое дважды промыли гексаном и затем небольшим количеством ацетона. В результате получили аморфный порошок светло-желтого цвета (препарат гамаир). ТСХ-профиль этого препарата, наблюдаемый в системе н-бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1), содержал 4 зоны с R_f 0,18; 0,50; 0,70 и 0,85. Эти продукты оказались активны в отношении тест-культуры, фитопатогенного гриба *Alternaria solani* — возбудителя корневых гнилей растений. Для препаративного получения отдельных компонентов была использована КХ на силикагеле L (Chemapol, Чехия, колонка 25 см × 20 мм, 100—160 мкм). Препарат растворяли в 2 мл метанола (все растворители были марки «х.ч.», Россия) и наносили на колонку диаметром 0,5 см, состоящую из 20 г силикагеля. Элюцию осуществляли последовательно гексаном, гексан—этилацетатом в соотношении 9:1 и 4:1, ацетоном и, наконец, метанолом. Активные фракции, определенные методом ТСХ в вышеуказанной системе растворителей и в результате изменения биологической активности, объединяли и выпаривали досуха. Наиболее активной была фракция, элюируемая смесью гексан—этилацетат в соотношении 1:1, имеющая $R_f = 0,70$ (**гамаир А**). Для очистки фракцию растворяли в 1 мл метанола, наносили на колонку с молселектом Г-50 (Reanal, Венгрия) в растворе 1 мл метанола. Элюирование осуществляли смесью гексан—этилацетат в соотношении 5:1. После удаления растворителей получили бесцветный аморфный порошок.

Минорный активный компонент с $R_f=0,85$, элюированный с колонки метанолом, имел максимумы в УФ-спектре поглощения при λ 340, 355 и 381 нм, характерные для гексаеновой системы сопряжения двойных связей. После двукратного переосаждения ацетоном из метанольного раствора был получен порошок светло-желтого цвета с показателем $E_{1\%}^{1\text{сек}}$ при λ 381 нм, равным 650 (**гамаир В**).

Минорные компоненты с R_f 0,18 и 0,50 (**гамаир С и D**), идентифицированные как гексаены на основании трехпикового спектра в УФ, характерного для гексаеновой системы сопряженных связей, элюировали смесью ацетон—метанол и 1%-ной HCl в метаноле, соответственно.

Кислотный гидролиз препарата гамаир А. Фракцию в количестве 10 мг растворяли в 1 мл метанола и нагревали в запаянной ампуле с 2 мл 6 н. HCl в течение 24 ч при 105°. Затем гидролизат выпаривали досуха, остаток растворяли в 1 мл воды и вносили на колонку Dowex-1 (кислая форма, Merck, Германия, 25 см × 20 мм). Элюцию вели 0,5 н. уксусной кислотой; ТСХ осуществля-

Фитопатогенные микроорганизмы, использованные в работе

Вид микроорганизма	№ штамма	Растение-хозяин	Источник
Бактерии			
<i>Pseudomonas corrugata</i> Roberts and Scarlett 1981	180	Томат	ВИЗР
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> (Van Hall 1902) Joung et al., 1978	8511 (281)	То же	То же
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> (Jones 1901) Dye 1969	160, 8982	—”—	—”—
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Smith) Jensen 1984	175	—”—	—”—
<i>Xantomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Doidge 1920) Dye 1978	322	—”—	ИМВ им. Д.К. Заболотного*
Грибы			
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	1, СОР, 2 гр.	Колос пшеницы	ВИЗР
<i>Fusarium oxysporum</i> (Schlecht) Snyd. et Hans		Огурец	ВИЗР
<i>Fusarium sambucinum</i> Fuckel		Картофель	ВНИИФ**
<i>Fusarium sporotrichoides</i> Sherbakoff (F. <i>sporotrihiella</i> var. <i>sporotrichoides</i>)		Рис	ВНИИФ
<i>Fusarium culmorum</i> (W.G.Sm.) Sacc.	6 (Л-15)	Томат	ВИЗР
<i>Colletotrichum lagenarium</i> (Pass.) Ellis et Halst.		Огурец	То же
<i>Colletotrichum coccodes</i> (Wallroth) Hughes (C. <i>antramentarium</i>)		Картофель	—”—
<i>Verticillium dahliae</i> Kleb.		Огурец	—”—
<i>V. dahliae</i> Kleb.		Сахарная свекла	—”—
<i>Rhizoctonia solani</i> Kuehn		Картофель	—”—
<i>Altrernaria solani</i> Sor.		Огурец	—”—
<i>A. brassicae</i> (Berk.) Sacc.		Капуста	—”—
<i>Ascochyta melomis</i> Potebnia		Огурец	—”—
<i>Ascochyta fabae</i> Speg.		Бобы	—”—
<i>Sclerotinia libertiana</i> Fuckel (Sclerotinia <i>sclerotiorum</i> (Lib.) Vass.)		Подсолнечник	—”—
<i>Septoria nodorum</i> Berk.		Пшеница	ВНИИФ
<i>Helminthosporium sativum</i> P., K. et B. (Bipolaris <i>sorokiniana</i> Shoemaker)		Ячмень	ВИЗР

* Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев.

** Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Москва.

ли в системе н-бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1).

Условия физико-химических исследований. ЯМР(^1H и ^{13}C)-спектры компонентов гамаир А и В регистрировали на спектофотометре Bruker Al-200 (Германия) в растворе ДМСО- d_6 . Химические сдвиги в спектрах по отношению к внутреннему стандарту ГМС выражали в миллионных долях. Масс-спектры регистрировались прибором GC-2010 Shimadzu (Япония) в условиях прямого ввода. ИК-спектры сняты в таблетках KBr на приборе Shimadzu, оптическое вращение определяли на спектрополяриметре А1-ЭПО (Россия). ВЭЖХ препаратов гамаир В, С и D проводили на хроматографе Waters, США. Использовали колонку Symmetry-C18 (250×4,6 мм); подвижной фазой служила смесь ацетонитрила 0,05 М с 85%-ной H_3PO_4 (42:58). Детекцию осуществляли при λ 380 нм, скорость элюции составила 1 мл/мин.

Для ТСХ использовали пластинки Silufol-254 (Германия). Системы растворителей приведены в табл. 4 (см. «Результаты и обсуждение»). Проявление осуществляли в УФ свете, парах иода и методом определения антибиотической активности в отношении тест-культуры фитопатогенного гриба *A. solani* (методом лунок, см. далее).

Тест-культуры. В качестве тест-культур использованы штаммы фитопатогенных грибов и бактерий, хранящихся в Государственной коллекции микроорганизмов ВИЗР. Ряд тест-культур фитопатогенных грибов и бактерий получен из Государственных коллекций микроорганизмов ВНИИ фитопатологии (Москва) и ИМВ АН Украины им Заболотного (Киев). В работе также использованы свежeweделенные культуры фитопатогенов, изолированные на территории России (Ленинградская, Московская, Новосибирская, Ростовская, Волгоградская области, Северный Кавказ, Сахалин), Украины, Китая и Индии.

Биологическую активность препаратов определяли различными методами.

Метод блоков. Для оценки антагонистической активности штамм *B. subtilis* М-22 выращивали на среде МПА или СПА при 28° в термостате в течение 2 сут. Затем тестируемую культуру блоками переносили в чашки Петри на агаризованную среду, предварительно засеянную газоном тест-культур фитопатогенных микроорганизмов, и помещали в термостат при 27—28°. Об активности штамма судили по диаметру зоны лизиса тест-культур. Измерение зоны лизиса проводили через 24—48 ч у бактериальных тест-культур и через 2—5 сут у грибных тест-культур. В другом случае

на поверхность газона тестируемой культуры микроба-антагониста помещали агаровый блок тест-культуры гриба и оценивали биологическую активность штаммов бацилл по диаметру колонии выросшего гриба.

Метод лунок. Антибиотическую активность нативного раствора и компонентов метаболитного комплекса штамма М-22 определяли методом лунок по диаметру зоны лизиса тест-культуры фитопатогенного микроорганизма. Для оценки антибиотической активности в чашках Петри, засеянных тест-культурой, делали лунки с помощью стандартного бура ($d=5$ мм), а затем в лунки пастеровской пипеткой вносили супернатант КЖ, суспензию лабораторного образца биопрепарата определенной концентрации или элюаты индивидуальных компонентов активного комплекса штамма М-22. Чашки помещали в термостат при 28° для инкубации.

Зоны лизиса фитопатогенных бактерий измеряли через 24—48 ч, а грибов — через 3—5 сут после инкубирования чашек при 28° в термостате.

Метод серийных разведений. Из лабораторного образца сухого биопрепарата гамаир на основе штамма М-22 готовили 6 рабочих суспензий на МПБ с последовательным уменьшением концентрации с каждым разведением в 2 раза: 0,2%, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0125 и 0,00625%. Тест-культуры фитопатогенных бактерий вносили в таком количестве, чтобы в 1 мл МПБ содержалось 10 млн. клеток. В контрольные варианты биопрепарат не вносили. Они служили показателями интенсивности роста фитопатогенных бактерий в данной питательной среде без антибиотика. Один ряд контрольных пробирок с разведениями биопрепарата оставляли незасеянными фитопатогенными бактериями для контроля интенсивности роста штамма-продуцента.

После инкубирования в течение 2—5 сут в зависимости от тест-культуры проводили микроскопирование с целью определения последнего активного разведения. Для дополнительного контроля из каждой пробирки производили рассев бактериальной петлей выросших микроорганизмов на стерильную среду (Чапека или МПА с глюкозой). Чашки вновь помещали в термостат при 26° и выдерживали 48 ч. Об эффективности суспензии образца биопрепарата определенной концентрации судили по тому, какой вид микроорганизма вырастал на агаризованной среде (тест-культура или штамм-продуцент биопрепарата *B. subtilis* М-22).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ступенчатый скрининг штаммов р. *Bacillus* был проведен нами на довольно значительном количестве культур (около 150), как хранящихся в Государственной коллекции микроорганизмов ГНУ ВИЗР, так и выделенных нами из источников в различных природно-климатических зонах России, Китая и Индии. На первом этапе исследований лабораторные образцы штаммов накапливали в колбах на кукурузно-мелассной среде (кукурузный экстракт — 3%; меласса — 1,5%; рН до стерилизации — 7,2—7,5), заканчивая культивирование на стадии окончания споруляции, а затем оценивали антагонистическую активность жидких и 0,1%-ного водного раствора лиофильно высушенных нативных растворов (супернатант КЖ после осаждения клеток).

На основании данных первичного скрининга в качестве наиболее перспективных были отобраны штаммы *B. subtilis* В-10 и *B. subtilis* М-22, сравнительная активность которых, определенная методами блоков, лунок и серийных разведений в разных вариантах, представлена в таблицах 2—4.

Как видно из данных таблиц 2—4, оба штамма бацилл проявляли высокую антагонистическую активность в отношении фитопатогенных грибов, выделенных из разных природно-климатических зон. Однако в отношении фитопатогенных бактерий проявлял активность только штамм *B. subtilis* М-22. Проверка антибактериальной активности методом серийных разведений показала, что в концентрации 0,1—0,2% штамм подавлял все тест-культуры; при концентрации 0,05—0,025% в ряде случаев наблюдался совместный рост штаммов (см. табл. 4). Подавляющая концентрация для *E. carotovora ssp. carotovora* была очень низкой — 0,025%. Таким образом, для дальнейших исследований на основании многочисленных опытов был отобран штамм *B. subtilis* М-22 как наиболее активный в отношении широкого круга возбудителей бактериальных и грибных болезней растений. Из этого штамма выделили комплексный препарат гамаир (см. “Условия эксперимента”), из которого изолировали биологически активные фракции — гамаир А, В, С и D.

Гамаир А представляет собой аморфный порошок белого цвета без определенной температуры плавления (разлагается около 170°), хорошо растворим в ДМСО, уксусной кислоте, водных спиртах; умеренно растворим в кислой и щелочной водной среде, ацетоне, этилацетате, гексане, хлороформе; нерастворим в воде и эфире. Оптически неактивен, $[L]_D^{20} = -121$ (с 0,05, метанол). Препарат характеризуется положительными качественными ре-

акциями с нингидрином, бромкрезоловым зеленым, реактивом Драгендорфа и отрицательными реакциями с треххлористым железом и реактивами Молиша, Сакагучи и Эрлиха. В УФ спектре имеется слабый широкий максимум поглощения в области λ 280—320 нм (метанол).

В ИК-спектре (рис. 1) имеются полосы поглощения при 3400—3500, 1675, 1402, 1232 см^{-1} , характерные для амидов кислот; в области 1712 — поглощение, характерное для карбонильных групп, и при 1079 — для эпокси групп.

В ^1H -ЯМР-спектре (рис. 2) имеются сигналы при 0,38 м.д.; 0,95; 1,45; 1,95; 2,14; 2,48; 3,08; 3,36; 3,98 и 5,29 м.д. В ^{13}C -ЯМР-спектре (рис. 3) — сигналы при 13,83 м.д.; 18,54; 22,46; 24,68; 26,70; 31,42; 33,90; 34,81; 50,08; 55,71; 58,62; 62,95; 68,45; 72,47; 114,96; 127,82; 129,85; 171,55; 172,02 и 174,87 м.д.

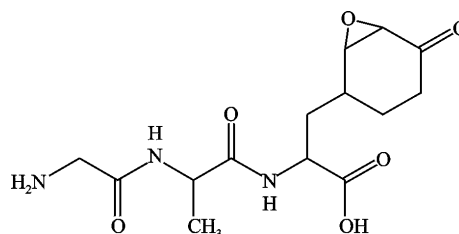
Гамаир А активен в отношении дрожжей и грибов (табл. 5, 6).

Хроматографическая подвижность препарата в ряде систем растворителей представлена в табл. 7.

В продуктах кислотного гидролиза гамаира А были обнаружены аминокислоты тирозин, глицин и аланин (Rf 0,40; 0,60 и 0,23, соответственно). Все эти данные говорят о близости гамаира А к описанным в литературе препаратам бациллину, выделенному из штамма *B. subtilis* ВКМ В501, и антикапсену [3], выделенному из штамма *Streptomyces griseoplanus*.

Были зарегистрированы масс-спектры производных гамаира А в условиях, указанных для анализа бациллина [4]. Масс-спектр триметилсилильного производного гамаира А содержит пик с m/e 473 а.е.м, что соответствует молекулярной массе исходного соединения 327 а.е.м. В масс-спектре метилового эфира N-трифтор-ацил-производного гамаира А имеется пик с m/e 473 а.е.м, что подтверждает его молекулярную массу 327 а.е.м.

На основании приведенных выше данных можно предложить для соединения гамаир А следующую структуру:



Гамаир В (Rf = 0,75) представляет собой аморфный порошок желтого цвета с температурой плавления $>150^\circ$, растворимый в большинстве органических растворителей и нерастворимый

Сравнительная характеристика спектра антагонистической активности штаммов *B. subtilis* В-10 и *B. subtilis* М-22 (супернатант КЖ, метод лунок, диаметр лунки 5 см)

Вид фитопатогенных микроорганизмов	Диаметр зоны лизиса тест-культуры, мм, обусловленного действием	
	<i>B. subtilis</i> М-22	<i>B. subtilis</i> В-10
<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i>	24	0
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	18	0
<i>Pseudomonas corrugata</i>	24	0
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	30	0
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	24	0
<i>Alternaria solani</i>	20	18
<i>Alternaria brassicae</i>	22	10—15
<i>Verticillium dahliae</i>	34	–
<i>Fusarium graminearum</i>	34	25—30
<i>Fusarium oxysporum</i>	20	20—30
<i>Fusarium culmorum</i>	–	25—30
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	–	25—30
<i>Fusarium sambucium</i>	–	20—25
<i>Ascochyta fabae</i>	18	18
<i>Ascochyta melonis</i>	–	10—12
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	24	20
<i>Colletotrichum coccodes</i>	–	10
<i>Rhizoctonia solani</i>	24	18
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	24	5—7
<i>Sclerotinia libertiana</i>	24	5—7
<i>Septoria nodorum</i>	15	18—20
<i>Verticillium dahliae</i>	–	8—10

в воде и гексане; оптически недеятелен в растворе метанола; имеет типичный гексаеновый УФ-спектр поглощения (λ макс. 280 нм, 305, 340, 358 и 378 нм).

В ИК-спектре имеются полосы поглощения в области 3320—3400 см⁻¹, 2959, 2926, 2873, 1708, 1630, 1535, 1457, 1386, 1278, 1207, 1117, 1080, 1015, 976 и 957 см⁻¹.

В ¹H-ЯМР-спектре имеются сигналы 0,81 м.д.; 1,00; 1,1; 1,79; 1,80; 2,08; 2,26; 2,48; 3,40; 3,58; 4,04; 4,20; 6,62; 6,99; 7,39; 7,92;

7,99; 8,11 и 8,29 м.д. В ¹³C-ЯМР-спектре — 13,83 м.д.; 18,52; 22,45; 26,71; 28,64; 28,97; 30,08; 52,76; 55,72; 58,62; 61,14; 62,96; 72,44; 76,58; 114,96; 127,82; 129,85; 155,73; 169,10; 171,55 и 173,88 м.д.

Гамаир В неактивен в отношении грамотрицательных бактерий, слабо активен в отношении грамположительных бактерий, но эффективен в отношении дрожжей и грибов, включая фитопатогенные виды (см. табл. 5, 6).

Таблица 3

Сравнительная антагонистическая активность штаммов *B. subtilis* М-22 и *B. subtilis* В-10 в отношении фитопатогенных грибов (метод агаровых блоков, диаметр 5 см)

Вид микроорганизма (источник)	Диаметр колоний тест-культур фитопатогенов, мм, при различном времени выращивания на поверхности антагониста, сут											
	Контроль				<i>B. subtilis</i> В-10				<i>B. subtilis</i> М-22			
	Среда Чапека		СПА		Среда Чапека		СПА		Среда Чапека		СПА	
	2	5	2	5	2	5	2	5	2	5	2	5
<i>Sclerotium rolfsii</i> (Индия)	15	30	5	32	5	6	5	5	13	10	5	5
<i>Fusarium oxysporum</i> (Индия)	25	38	25	32	15	22	10	12	15	27	5	17
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Индия)	10	15	20	23	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Rhizoctonia solani</i> (Индия)	35	48	25	27	17	18	5	5	13	17	5	5
<i>Alternaria solani</i> (Россия)	30	30	18	20	7	8	10	5	17	18	5	5
<i>Fusarium graminearum</i> (Россия)	20	29	28	40	15	15	10	16	15	15	7	10
<i>Fusarium oxysporum</i> (Россия)	32	47	30	37	11	13	5	8	10	13	5	5
<i>Pythium debarianum</i> (Россия)	70	90	10	40	5	5	5	5	12	12	5	5
<i>Botrytis cinerea</i> (Россия)	20	20	10	10	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Colletotrichum coccodes</i> (Россия)	14	15	23	17	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>Verticillium dahliae</i> (Россия)	15	8	19	13	8	5	5	5	8	12	5	5

Примечание: Состав СПА, г/л: пептон ферментативный, сухой для бактериологических целей – 9,0; гидролизат казеина ферментативный, неглубокой степени расщепления — 8,0; дрожжевой экстракт — 3,0; хлорид натрия — 5,0; натрий гидроортофосфат — (2,0±0,5); агар микробиологический — (10,5±2,5); рН 7,0—7,4.

Таблица 4

Эффективность образца биопрепарата на основе *B. subtilis* М-22 в отношении фитопатогенных бактерий, определенная методом серийных разведений (диаметр блока тест-культур 5 см)

Виды микроорганизмов	№ штамма	Концентрация суспензии биопрепарата на основе <i>B. subtilis</i> М-22, %						Без <i>B. subtilis</i> М-22
		0,2	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	
<i>Clavibacter michiganense</i> <i>ssp. michiganense</i>	13а	1	1	3	2	2	2	2
<i>Erwinia carotovora ssp.</i> <i>carotovora</i>	8982	1	1	1	1	3	3	2
<i>Xanthomonas campestris pv.</i> <i>vesicatoria</i>	322	1	1	2	2	2	2	2
<i>Pseudomonas corrugata</i>	9069	1	1	3	3	2	2	2
Контроль (<i>B. subtilis</i> М-22 без фитопатогенных бакте- рий)		1	1	1	1	1	1	–

Условные обозначения: 1 — рост колоний штамма *B. subtilis* М-22; 2 — рост колоний данного тест-микроорганизма; 3 — рост колоний штамма *B. subtilis* М-22 и тест-культур микроорганизмов.

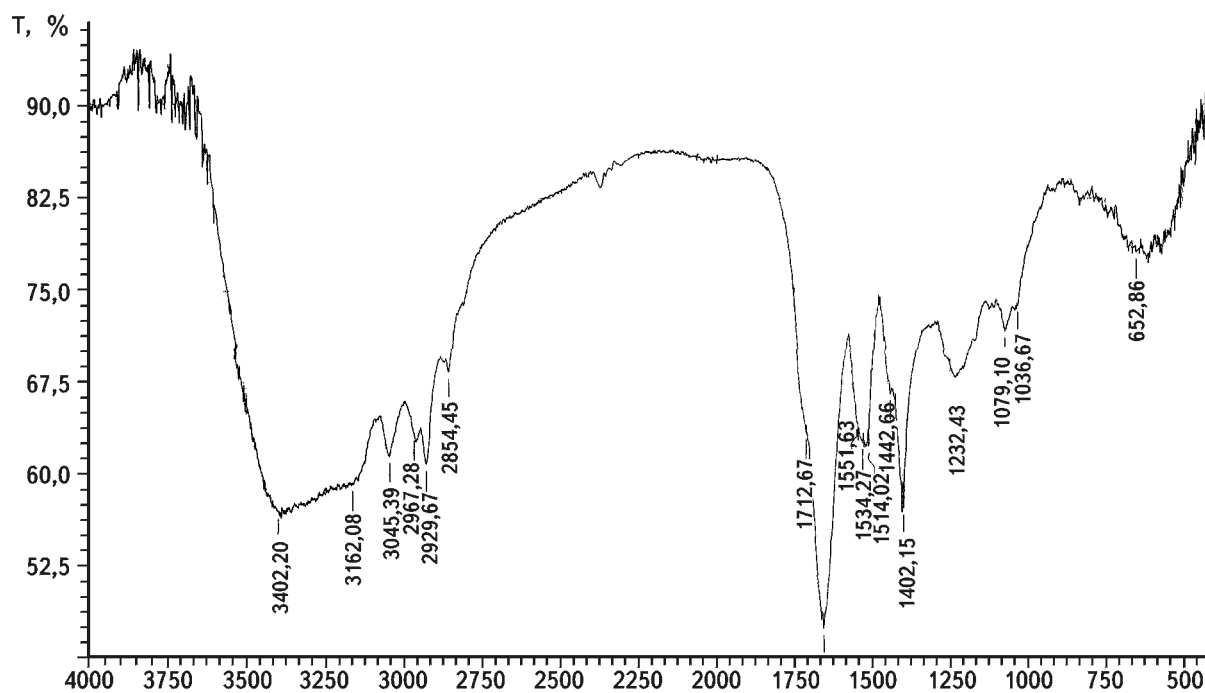


Рис. 1. ИК-спектр гамаира А

Гексаеновые антибиотики продуцируются главным образом актиномицетами и представляют собой малоизученную небольшую группу полиеновых макролидов [5—7]. Они проявляют высокую активность в отношении грибов; активны также в

отношении грамположительных бактерий. Однако в последние годы полиеновые антибиотики, в том числе и гексаены, были выделены из других микроорганизмов, в частности, бактерий [8, 9]. По своему химическому строению гексаены можно под-

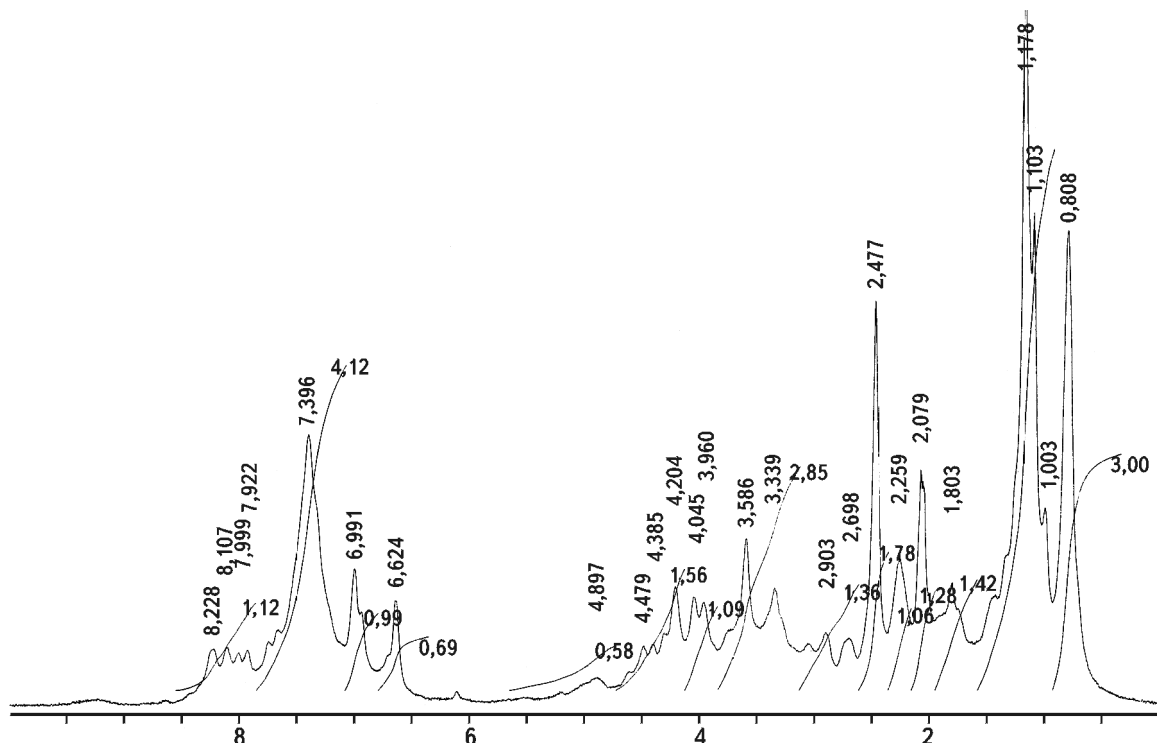


Рис. 2. ¹H-ЯМР-спектр гамаира А в ДМСО-d₆

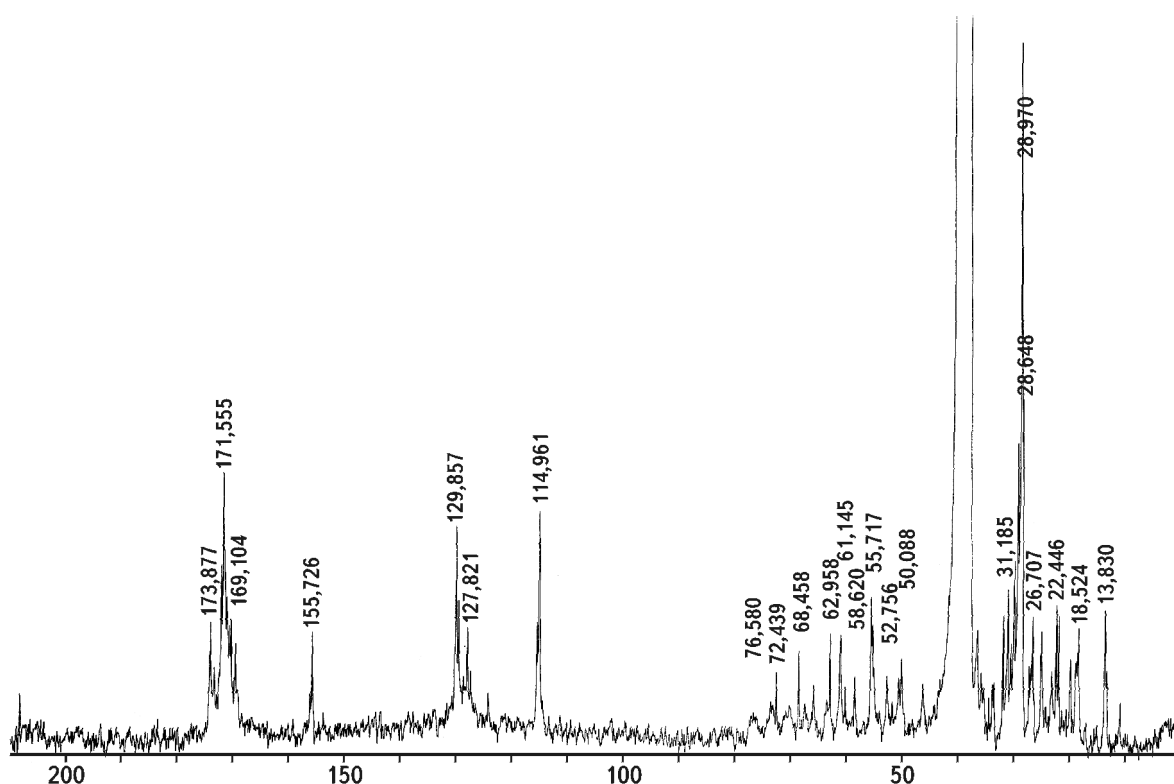


Рис. 3. ^{13}C -ЯМР-спектр гамаира А в DMSO-d_6

разделить на две группы: гексаены макролиды и гексаены с открытой углеводородной цепью.

Предложены две схемы классификации гексаеновых антибиотиков: на основании УФ-спектров и биологической активности и на основании данных ВЭЖХ [10, 11]. Согласно этой классификации, выделенный нами гамаир В можно отнести к подгруппе 1А (подгруппа медиоцидина). Препарат высокоактивен в отношении грибов и грамположительных бактерий, а в УФ-спектре поглощения имеются максимумы, характерные для гексаена и тетраена.

Выделенный нами гексаен (гамаир В) по хроматографической подвижности в системе $\text{CHCl}_3\text{—MeOH—NH}_3$ (4:10:1) и $\text{CHCl}_3\text{—MeOH—H}_2\text{O}$ (6:10:1) очень близок к медиоцидину. Rf гамаира В равен 0,7 в первой системе и 0,8 — во второй (для медиоцидина Rf = 0,25, 0,65 и 0,85 в первой системе; 0,2, 0,6 и 0,75 — во второй системе). Гамаир С и D имеют Rf 0,2 и 0,5 в первой системе и 0,25, 0,65 — во второй системе, соответственно.

Близость гамаира В к медиоцидину и отличия от него показывают данные ВЭЖХ. Время удерживания гамаира В в системе ацетонитрил—0,06 М цитрат аммония (45:55) составляет 5,3 мин, в то время как для медиоцидина этот показатель составляет 4,9 мин.

Сопоставление физико-химических и биологических свойств гамаира В со свойствами представителей подгруппы медиоцидина (эндомицин, гексафунгин, антибиотик Н-30) позволяет сделать вывод о том, что выделенный нами антибиотик является оригинальным.

В модельных лабораторных и вегетационных опытах биопрепарат на основе штамма *B. subtilis* М-22 показал высокий бактерицидный эффект на возбудителей бактериального рака томата *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* 175 и мягкой гнили *Erwinia carotovora ssp. carotovora* 8982. Развитие бактериоза проростков томата в разных вариантах вегетационных опытов составляло 1,5—7,5% по сравнению с таковым в зараженном контроле (85,5—95,0%). Был отмечен стимулирующий эффект биопрепарата на проростки и растения томата.

На основании данных модельных лабораторных опытов были проведены широкие полевые испытания биопрепарата гамаир, которые показали его высокую эффективность в защите культуры томата от бактериальных болезней — бактериального рака томата (возбудитель — *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis*), мягкой гнили овощных (*Erwinia carotovora ssp. carotovora*) и некроза сердцевины стебля томата (*Pseu-*

Биологическая активность компонентов препарата гамаир в отношении различных бактерий и дрожжей при тестировании методом лунок

Тест-культура	Минимальная концентрация препарата, мкг/мл, при которой наблюдалась задержка роста микроорганизма	
	Гамаир А	Гамаир В
<i>Escherihia coli</i>	2,7	<100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,7	–
<i>Proteus vulgaris</i>	1,3	<100
<i>Klebsiella pneumonia</i>	2,0	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,5	15,0
<i>Bacillus subtilis</i>	2,0	15,0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	50,0	1,5
<i>Bacillus megatherium</i>	2,7	–
<i>Micrococcus pyogenes var. aureus</i>	10—15	–
<i>Saccharomyces cerevisia</i>	5,0	6,25
<i>Candida albicans</i>	>100	3,75
<i>Candida tropicalis</i>	>100	1,5
<i>Nocardia madurae</i>	>100	–
<i>Epidermophyton floccosum</i>	25,0	–
<i>Microsporium lanosum</i>	100,0	–
<i>Aspergillus niger</i>	100,0	1,57
<i>Aspergillus fumigatus</i>	100,0	6,25
<i>Trichphyton rubrum</i>	50,0	3,75
<i>Penicillium funiculosum</i>	50,0	15,5

Примечание: «–» — не определяли.

domonas corrugata). В полевых условиях биологическая эффективность биопрепарата определяется по снижению распространенности и развития болезни. Для каждого заболевания разработана балльная шкала, по которой оценивают тяжесть поражения, затем определяют развитие болезней.

Развитие болезни в процентах подсчитывали по формуле:

$$R = \frac{(a \cdot b) \cdot 100}{n \cdot c},$$

где R — развитие болезни, %; $(a \cdot b)$ — сумма произведений числа больных растений (a) на соответствующий балл (b) поражения; n — общее число учетных растений; c — высший балл шкалы.

Распространенность болезней в процентах подсчитывали по формуле:

$$P = \frac{n \cdot 100}{N},$$

где P — распространенность, %; n — число больных растений, шт.; N — общее число учетных растений, шт.

Биологическая эффективность гамаира в отношении бактериальных болезней томата по различным регионам была следующей: Ленинградская область (совхоз “Ленинградский”, сельскохозяйственное акционерное общество закрытого типа (САОЗТ) “ЛЕТО”) — 40,5—60,4%; Поволжье, Волгоград (коллективное сельскохозяйствен-

Таблица 6

Антибиотическая активность компонентов гамаир в отношении фитопатогенных грибов, определенная методом лунок

Тест-культура	Диаметр зоны задержки роста, мм				
	Комплексный препарат гамаира (А, В, С, D)	Гамаир А	Гамаир В	Гамаир С	Гамаир D
<i>Alternaria solani</i>	20,0	20,0	50,0	22,0	36,0
<i>Verticillium dahliae</i>	Не определяли	Не определяли	45,0	Не определяли	Не определяли
<i>Fusarium solani</i>	21,0	15,0	Не определяли	23,0	20,0
<i>Fusarium culmorum</i>	27,0	27,0	35,0	28,0	15,0
<i>Fusarium oxysporum</i>	Не определяли	Не определяли	15,0	Не определяли	Не определяли

ное предприятие (КСП) “Тепличное”) — 40,8—70,6%; Татарстан, Казань (совхоз “Майский” Татплодоовощпрома) — 30,9—55,9%. Отмечено стимулирующее действие гамаира на развитие растений: увеличение высоты стебля, количества листьев и завязей, ускорение сроков созревания плодов. Хозяйственная эффективность (С)* гамаира была равна 15—45%; средняя прибавка урожая составляла 25—35%.

Высокую фиторегуляторную активность и биологическую эффективность в подавлении бактериозов гамаир показал на гибридах томата Тортилла, Шаганэ и Верлиоко (КСП «Тепличное»). Распространенность заболеваний снизилась на 74,0—92,0%. Хозяйственная эффективность достигала 25—44%, что было существенно выше, чем в варианте с биопрепаратом фитолавин. Биологическая эффективность гамаира в отношении комплекса бактериальных болезней в условиях САОЗТ «ЛЕТО» составляла 50,8—60,5% и превышала эффективность стандартов (биопрепараты бактофит, фитолавин). Определены норма расхода и способ применения гамаира на овощных культурах: полусухое протравливание семян при норме расхода препарата 1 г/га, двукратное опрыскивание в рассадный период и после высадки растений на постоянное место при норме расхода 60—150 г/га.

В литературе описано большое количество видов и штаммов микроорганизмов — антагонистов возбудителей болезней сельскохозяйственных

Таблица 7

Хроматографическая подвижность препарата гамаир А при ТСХ

Система растворителей	Rf
Хлороформ—метанол—вода (65:30:5)	0,63
Гексан—эфир диэтиловый (70:30)	0,00
Хлороформ—метанол (97:3)	0,46
Бутанол—уксусная кислота—вода (3:1:1)	0,81
Вода, насыщенная бутанолом (10:5)	0,57
Хлороформ—ацетон (90:10)	0,94
Хлороформ—уксусная кислота (90:10)	0,58
Изопропанол—вода (70:30)	0,82
Этанол—аммиак (70:30)	0,93
Хлороформ—метанол—уксусная кислота (94:5:1)	0,91

растений из рода *Bacillus* [12—30]. Некоторые препараты (бактофит, фитоспорин и др.) вошли в отечественную практику борьбы с болезнями сельскохозяйственных растений [23—27].

* С, % = (А-В)/А·100, где А — урожай (в расчете на 1 га) на участке проведения мероприятий по защите растений; В — урожай с необработанного участка.

Однако разработка средств защиты растений на основе комплексов биологически активных соединений, выделенных из микроорганизмов, начата относительно недавно; литературные данные по этому вопросу весьма ограничены. В частности, фенилацетиловая кислота и фенилацетат натрия, выделенные из актиномицета *Streptomyces humiditatis*, полностью подавляли *in vitro* и *in vivo* рост *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* и *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* в концентрации 10—50 мкг/мл [31]. Биологическая активность этих соединений была близка к фунгициду металаксилу.

Известно, что биологически активные соединения белковой природы имеют существенное значение для контроля популяций. Выделен и охарактеризован пептид с антифунгальными свойствами APS-1, продуцируемый бактерией-антагонистом *B. cereus* [32].

В настоящей работе показано, что широкий спектр антагонистической активности штамма *B. subtilis* М-22 — продуцента полифункционального биопрепарата гамаир для защиты растений от грибных и бактериальных инфекций и повышения урожайности сельскохозяйственных культур, обусловлен сложным компонентным составом активного комплекса, включающим соединения различного химического состава: гамаир А — полипептид, близкий к бациллину, гамаир В — гексаеновый антибиотик, отнесенный к подгруппе 1А (медиоцидина), гамаиры С и D также представляют собой гексаеновые антибиотики.

Получено 15.11.10

ЛИТЕРАТУРА

1. Жученко А.А. Стратегия адаптивной интенсификации сельского хозяйства (концепция). — Пушино: ОНТИ ПЦН РАН, 1994. — 148 с.
2. Новикова И.И. Биологическое обоснование создания и применения полифункциональных биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: Автореферат дисс. д.б.н. — СПб, 2005.
3. Neuss, N. The Structure on Anticapcin, a new Biologically Active Metabolite *Streptomyces griseoplanus* / N. Neuss, B.B. Mollog, R. Shah, N. Dehahiguera // Biochem. J. — 1970. — V. 118. — P. 571—575.
4. Patel, P.S. Bacillaen, a novel Inhibitor of Prokariotic Protein Synthesis Produced by *Bacillus subtilis*. Production, Taxonomy, Isolation, Physico-chemical Characterization and Biological activity / P.S. Patel, S. Huang, S. Fisher, D. Pirmin, C. Aklorus, L. Dean, E. Mayers, P. Fernandes, F. Mayers // J. Antibiot.— 1995. — V. 48. — P. 997—1003.
5. Omura, S., Tanaka, H. Macrolide antibiotics: chemistry, biology and practice. — N.Y.: Academic Press Jns., 1984. — P. 351—404.
6. Vestesy, L. Polyene antibiotics from *Streptomyces medicidicus* // J. Natural Products. — 2007. — V. 70. — N. 2. — P. 215—219.
7. Илич С.Б. Биоактивные метаболиты из изолятов стрептомицетов — описание и антимикробная активность / С.Б. Илич, С.С. Константинович, З.Б. Тодорович, М.Л. Лазич, В.Б. Велькович, Н. Йокович // Микробиология. — 2007. — Т. 76. — № 4. — С. 480—487.
8. Кудряшова Е.Б. *Bacillus subtilis* и фенотипически близкие штаммы-продуценты гексаеновых антибиотиков / Е.Б. Кудряшова, Н.Г. Винокурова, Е.В. Арискина // Прикл. биохим. микробиол. — 2005. — Т. 41. — С. 553—557.
9. Thirsis, C. Polyene natural Products / C. Thirsis, A. Whiting // J. Chem. Soc., Perkin Trans. J. — 2002. — N. 8. — P. 999—1023.
10. Cietci, T. Comparative analysis of hexaene antibiotics / T. Cietci, T.A. Borkman, L.E. McDaniel, C.P. Schaffner // J. Antibiot. — 1984. — V. 37. — P. 876—884.
11. Mechlinski, W. Separation of polyene antifungal antibiotics by high speed liquid chromatography / W. Mechlinski, C.P. Schaffner // J. Chromatogr. — 1974. — V. 99. — P. 619—633.
12. Новикова И.И. Биологическое обоснование использования полифункциональных препаратов на основе микробов-антагонистов в защите растений от болезней // Защита и карантин растений. — 2005. — № 2. — С. 5—9.
13. Актуганов Г.Э. Внеклеточные гидролазы штамма *Bacillus* sp. 739 и их участие в лизисе клеточных стенок микробов-антагонистов в защите растений от болезней // Защита и карантин растений. — 2005. — № 2. — С. 5—9.
14. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus* Cohn. в агроэкосистемах. — М.: Наука, 2007. — 148 с.
15. Centurion, M.A.P. Mecanismos de atuacao de antagonistas selecionados para o controle biologico da ferrugem do feijepiro (*Uromyces phaseoli* (Reben.) Wint.) / M.A.P. Centurion, C. Kimati, G.T. Pereira // Cientifica. — 1994. — V. 22. — N. 2. — P. 174—175.
16. Bailey, K.L. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments / K.L. Bailey, G. Lazarovits // Soil & Tillage Research. — 2003. — V. 72. — P. 169—180.
17. Новикова Л.М. Возможности использования штамма бактерий *Bacillus mycoides* 683 для защиты картофеля и капусты / Л.М. Новикова, Ф.А. Попов, С.И. Бельская, Т.Г. Шабашова // Изв. Акад. агр. наук Беларуси. — 1994. — № 1. — С. 203—205.
18. Саттарова Р.К. Бактерии-антагонисты фитопатогенов на хлопчатнике / Р.К. Саттарова, Р.Н. Маннанов // Защита и карантин растений. — 2000. — № 9. — С. 51.
19. Marrone, P.G., Heins, S., Manker, D. Biological control of plant fungal infections // Патент США № 6004774, A0N25/00. 1999.

20. Korsten, L. Postharvest biological control of avocado fruit diseases / L. Korsten, E.E. De Villiers, A.K. Rowell // J.M South African Avocado Growers' Association Yearbook. — 1993. — V. 16. — P. 65—69.
21. Helbig, J. Biological control of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. in strawberry by *Paenibacillus polymyxa* // J. Phytophthol. — 2001. — V. 149. — N. 5. — P. 265—273.
22. Мелентьев А.И. Применение бацилл-антагонистов для биоконтроля грибов, разрушающих сырую древесину / А.И. Мелентьев, П. Хелисто, Л.Ю. Кузьмина, Н.Ф. Галимзянова, Г.Э. Актуганов, Т. Корпела // Прикл. биохим. микробиол. — 2006. — Т. 42. — № 1. — С. 70—75.
23. Амбросов В.А., Крашенинникова Т.К., Кузьмич М.К., Болезнин М.И., Румянцев В.А. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* — продуцент вещества, обладающего противогрибковой активностью // Патент РФ № 2094990, А01N63/00. 1997.
24. Гольшин Н.М. Новые средства защиты растений от болезней // Защита растений. — 1992. — В. 8. — С. 50—54.
25. Burkhard F. Antibiotics for plant protection / F. Burkhard, L. Folker, B. Fugmann, // Chem. Unserer Zeit. — 1991. — V. 25. — P. 317—330.
26. Lynch, J.M. Rhizosphere bacteria and their antibiotics as a factors of biological control / J.M. Lynch, N.E. Crook // Chem. Brit. — 1992. — V. 28. — P. 42—45.
27. Berdian, G. Biologische Bekämpfung ausgewählter Gemeskrankheiten mittels *Trichoderma harzianum*. D. Pflanzenschutztag. — 23—26 Sept., 1996. "Mitt. Biol. Bundesanst. Land- und Forstwirt. Berlin-Dahlem". — Berlin, 1996. — N. 321. — P. 456—457.
28. Смирнов В.В., Сорокулова И.Б., Бережницкая Т.Г., Ваньянц Г.М., Менликиев М.Я., Недорезков В.Д., Минеев М.И., Вахитов В.А., Байгузина Р.М. Биопрепарат фитоспорин для защиты растений от болезней // Патент РФ. № 2109947, А01N63/00. 1998.
29. Романовская Т.В. Биопрепарат энатин с широким спектром антимикробного действия / Т.В. Романовская, Э.И. Коломиец, Н.А. Здор, А.Г. Лобанок // Прикл. биохим. микробиол. — 2002. — Т. 38. — № 6. — С. 669—676.
30. Хэрстон У.Г., Артур К.С., Роуза Ф.К. Стабильный при хранении предварительно приготовленный состав для защиты растений от фитопатогенного грибка и способ защиты от фитопатогенного грибка // Патент РФ №2126209, А0N25/00. 1999.
31. Hwang, B.K. Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Sreptomyces humiditis* / B.K. Hwang, S.W. Lim, B.S. Kim, J.G. Lee, S.S. Moon // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — V. 67. — N. 8. — P. 3739—3745.
32. Pei Yan Purification and characterization of a novel antifungal peptide APS-1 produced by *Bacillus cereus* / Yan Pei, Xi-anbi Li, Hongwei Peng // Acta Microbiol. Sinica. — 1999. — V. 39. — N. 4. — P. 344—349.

I.I. NOVIKOVA*, and Yu.D. SHENIN

The All-Russian Research Institute for Plant Protection, 196608, Pushkin, St.-Petersburg Russia

e-mail: irina_novikova@inbox.ru

Isolation, Identification and Antifungal Activity of a Gamair Complex Formed by *Bacillus subtilis* M-22, a Producer of a Biopreparation for Plant Protection from Mycoses and Bacterioses

A metabolic complex, Gamair, has been isolated from a *Bacillus subtilis* strain M-22, a producer of a biopreparation for plant protection from diseases of various etiologies. Gamair was shown to possess a broad spectrum of activity against phytopathogenic bacteria (including *Pseudomonas corrugata*, *Erwinia carotovora*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, and *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria*), and fungi (of *Fusarium*, *Verticillum*, *Ascochyta*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Septoria*, and other genera). Using NMR and IR spectroscopy, it was shown that the complex of active compounds is a mixture of the following fractions: Gamair A (close to bacillin) and Gamair B—D (mediocin type hexaene-like) antibiotics. The chemical and biological properties of the above fractions were investigated. In the field trials using tomato plants, it was demonstrated that the biological efficacy of Gamair against bacterial wilt, stem core necrosis and vegetable's mild rot reached 70—90%, whereas the harvest increase was 25—35%.

Key words: antibacterial activity, chromatography, fermentation, fungicidal activity, hexaen-like antibiotics, identification, isolation, phytopathogenic fungi and bacteria, polypeptide antibiotics.

* Author for correspondence.