

На правах рукописи

СТЕПАНОВ АРТЕМ АНАТОЛЬЕВИЧ

**ОСОБЕННОСТИ АНТИФУНГАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ
2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНА, ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИТА
*PSEUDOMONAS PROTEGENS***

Шифр и наименование научной специальности:
1.5.18. – Микология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Тюмень
2025

Работа выполнена в лаборатории антимикробной резистентности института сельскохозяйственной и экологической биологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Тюменский государственный университет» (ФГАОУ ВО ТюмГУ).

Научный руководитель: **Васильченко Алексей Сергеевич**
кандидат биологических наук, заведующий лабораторией антимикробной резистентности Института сельскохозяйственной экологической биологии (X-Bio) ФГАОУ ВО «Тюменский государственный университет»

Официальные оппоненты: **Садыкова Вера Сергеевна**
доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией таксономического изучения и коллекции культур микроорганизмов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе»

Берестецкий Александр Олегович
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией фитотоксикологии и биотехнологии ФГБНУ «Всероссийский НИИ защиты растений»

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной микробиологии»

Защита диссертации состоится 20 ноября 2025 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.008.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР) по адресу: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3, факс: (812) 470-51-10; E-mail: dissovet@vizr.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЗР и на сайте vizrspb.ru Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений.

Автореферат разослан _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Гусева Ольга Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Среди зарегистрированных в РФ микробиологических препаратов, бактерии рода *Pseudomonas* востребованы как биопестициды и как микробиологические удобрения (Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов ..., 2024). Способность бактерий *Pseudomonas* защищать растения от фитопатогенов обуславливают вторичные метаболиты – биологически активные соединения, которые не участвуют в процессах роста и развития, но необходимы для обеспечения конкурентного преимущества в окружающей среде (Craney et al., 2013). 2,4-диацетилфлороглюцин (2,4-ДАФГ), вторичный метаболит *Pseudomonas*, обладает широким спектром биологической активности, в том числе антифунгальной (PhlD-based genetic diversity ..., 2006). Впрочем, особенности действия 2,4-ДАФГ на микромицеты в субингибиторных (т.е. ниже летальной) концентрациях не изучены, и экологические эффекты такого воздействия на микобиом агроценоза не известны.

Степень разработанности темы исследования. Представители рода *Pseudomonas* являются широко распространенными представителями микробиома ризосферы растений и одними из самых изученных PGPR-бактерий (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). 2,4-ДАФГ является одним из доминирующих антибиотиков в арсенале ризосферных и почвенных псевдомонад. Антимикробные свойства 2,4-ДАФГ были открыты более 50 лет назад (Reddi, Borovkov, 1969) и за прошедший период времени проведенные исследования раскрыли его важную роль в аспекте защиты растений от фитопатогенных грибов (Shanthi, Vittal, 2013; Fluorescent Pseudomonads..., 2015; Partial purification ..., 2021), бактерий (Production of 2,4-diacetylphloroglucinol ..., 1994; Characterization and Assessment ..., 2022) и нематод (Toxicity of 2,4-diacetylphloroglucinol ..., 2009). Убедительным доказательством этому являются результаты исследований, проведенные с использованием мутантных штаммов с нокаутированными генами биосинтеза 2,4-ДАФГ. Такие бактерии оказались неэффективными в биоконтроле фитопатогенов по сравнению с дикими штаммами (Importance of 2,4-DAPG ..., 2004; PhlF– mutant of ..., 2014). На фоне накопленного массива данных, частично или полностью отсутствуют исследования биологических эффектов 2,4-ДАФГ на биоплёнки микромицетов, на их вторичный метаболизм, включая продукцию микотоксинов. Вместе с тем, по-прежнему нет понимания как изменяется сообщество грибов при попадании 2,4-ДАФГ в почву – среду со-существования бактерий рода *Pseudomonas* и микромицетов.

Цель работы – охарактеризовать особенности действия субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ на дрожжеподобные и мицелиальные грибы в условиях *in vitro* и *in situ*.

Задачи исследования:

1. Оценить влияние субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ на процессы биоплёнокообразования микромицетов.
2. Определить морфолого-физиологические изменения микромицетов, вызванные действием субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ.

3. Оценить продукцию вторичных метаболитов микромицетов в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ.

4. Проанализировать изменения в структурно-функциональных свойствах почвенного грибного сообщества при внесении 2,4-ДАФГ.

Научная новизна. Впервые показано влияние субингибиторных и ингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование микромицетов. Продемонстрировано действие субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ на морфолого-физиологические свойства, в том числе – вторичный метаболизм, микромицетов. Впервые проанализировано влияние 2,4-ДАФГ на структуру грибного сообщества почвенного микробиома. Выявлены функциональные изменения почвенного микробиома, вызванные действием 2,4-ДАФГ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты об особенностях действия 2,4-ДАФГ расширяют представление об антибиотиках не только как о веществах, подавляющих жизнеспособность восприимчивых видов микроорганизмов, но и как модуляторах их физиологических процессов, определяющих жизненную стратегию. Также показано, что 2,4-ДАФГ изменяет структурно-функциональные свойства почвенного микробиома.

Полученные результаты определяют необходимость дополнительного контроля микотоксинов в почве и растениеводческой продукции, полученной при использовании биопрепаратов на основе бактерии рода *Pseudomonas*. Одновременно, можно рекомендовать соответствующие биопрепараты при обработке почвы с целью активизации сапротрофных видов грибов, разлагающих пожнивные остатки.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению влияния 2,4-ДАФГ на дрожжеподобные и мицелиальные грибы. В диссертационной работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические (ампликоновое высокопроизводительное секвенирование), химические (жидкостная хроматография, количественный химический анализ, определение ферментативной активности с хромогенными и флуоресцентно-мечеными субстратами), методы микроскопии (сканирующая электронная и атомно-силовая микроскопия) и методы статистического анализа (тест Колмогорова-Смирнова, *t*-критерии Стьюдента, индекс Шеннона, индекс Чао1).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ негативно влияют на процессы биоплёнкообразования микромицетов.

2. Субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ у грибов рода *Aspergillus* понижают, а у грибов рода *Fusarium* повышают продукцию микотоксинов.

3. Внесение низких концентраций 2,4-ДАФГ увеличивает относительную долю минорных представителей из отрядов *Ascomycota* и *Basidiomycota* с одновременным уменьшением относительной доли доминантных представителей из отряда *Micoromycota* в почвенном сообществе, а также стимулирует продукцию ферментов, ассоциированных с разрушением органического материала.

Достоверность полученных научных результатов. Описанные в диссертационной работе результаты получены с использованием современных

микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов, подтверждены экспериментами, основанными на серии измерений в нескольких биологических повторах. Представленные в работе результаты экспериментов проанализированы методами статистического анализа и являются достоверными. Материалы диссертации опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS и Scopus.

Апробация результатов исследования. Результаты диссертации были представлены на 2-ой Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» (28 февраля – 6 марта 2022 года, г. Иркутск), на V Всероссийской с международным участием школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (30 ноября – 2 декабря 2022 года, г. Казань), на 26-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века», (9 – 13 апреля 2023 года, г. Пущино), на Всероссийской конференции «От микробиологии к генетическим технологиям» (22 – 25 сентября 2023 года, г. Новосибирск), на V Всероссийском конгрессе по защите растений (16 – 19 апреля 2024 года, г. Санкт-Петербург).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи в периодических научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS и Scopus, 5 - в других научных изданиях и сборниках, материалах съездов и конференций.

Личный вклад автора. Автором диссертации совместно с научным руководителем разработаны основные направления научного исследования, сформулирована цель, поставлены задачи исследовательской работы. Диссертантом лично выполнена основная часть экспериментальных исследований, проведен анализ полученных результатов, сформулированы выводы. Некоторые экспериментальные и теоретические исследования проведены автором как самостоятельно, так и совместно с российскими коллегами. Написание, редактирование и оформление публикаций проводилось совместно с соавторами.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, 4 разделенных на разделы глав, заключения, списка сокращений, заключения, списка публикации по теме диссертации и списка литературы, включающего 216 наименований, среди которых 200 иностранных. Текстовая часть работы содержит 151 страницу машинописного текста, включая 2 таблицы и 58 рисунков.

Благодарности. Выражаю благодарность к.б.н. Васильченко А.С. за руководство научной работой; сотрудникам лаборатории антимикробной резистентности ТюмГУ Тесле А.В., Пошвиной Д.В. и коллегам из научно-образовательного центра «Нанотехнологии» ТюмГУ за помощь в проведении экспериментов. Особую признательность выражаем сотрудникам лаборатории микологии ФГБНУ ВИЗР за советы и критические замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства Науки и Высшего образования (соглашение № 075-15-2024-563).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Биологические средства защиты растений на основе ризосферных псевдомонад и функциональная роль 2,4-ДАФГ в защите растений от фитопатогенов (обзор литературы)

В обзоре литературы приведены данные о наиболее значимых фитопатогенных грибах и роли факторов патогенности в инфекционном процессе. Рассмотрена актуальность использования биологических средств защиты растений. Дана информация о роли ризосферных бактерий, в частности, рода *Pseudomonas*, в биологической защите растений. Рассмотрена вовлеченность вторичных метаболитов *Pseudomonas* в обеспечение защиты растений от фитопатогенных микроорганизмов. Проанализирована функциональная роль 2,4-ДАФГ в защите растений от бактерии, грибов и нематод, а также в коммуникации *Pseudomonas* с другими видами микроорганизмов и растениями.

Глава 2. Материалы и методы исследования

В качестве штамма-продуцента выступил *Pseudomonas protegens* CV3. В качестве тест-штаммов были использованы *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus fumigatus* UTMN, *Aspergillus niger* INA 00760, *Aspergillus ochraceus* INA 01112, *Fusarium solani* VKPM F-890, *Fusarium culmorum* MFG 102100, *Fusarium sporotrichioides* MFG 11039. Антифунгальная активность 2,4-ДАФГ в отношении исследуемых штаммов была определена с помощью метода серийных разведений в 96-луночных планшетах (минимальная ингибирующая концентрация, МИК). Влияние 2,4-ДАФГ на биоуплёткообразование исследуемых штаммов оценивали спектрофотометрически по регистрации интенсивности поглощения кристаллического фиолетового и 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида, отображающих показатель общей биомассы и метаболической активности биоуплётков, соответственно. Экзополимерный матрикс биоуплётков исследуемых штаммов получали химическим методом. Количественный анализ белков, углеводов и аминокислот в экзополимерном матриксе (ЭПМ) биоуплётков определяли с помощью соответствующих спектрофотометрических методов. Морфологию биоуплётков и конидии исследуемых штаммов анализировали с помощью электронно-сканирующей (СЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Структурные компоненты плазматической мембраны и клеточной стенки исследуемых штаммов изучали с помощью количественного химического анализа. Количественное определение эргостерола, альфа-, бета-глюканов и хитина проводили с помощью спектрофотометрических методов. Микотоксины *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp. экстрагировали из культуральной жидкости с помощью жидкость-жидкостной и твердофазной экстракции, соответственно. Продукцию микотоксинов *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp. анализировали методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Продукцию внеклеточных протеолитических ферментов оценивали по расщеплению хромогенного субстрата азо-казеина.

Структура и биоразнообразие почвенного сообщества грибов были оценены с помощью ампликонового секвенирования внутреннего транскрибируемого спейсерного участка ITS1. Альфа-разнообразие, выраженное через индексы Шеннона и Чао1, рассчитывали в Past v.4.17, относительную представленность таксонов грибов определяли на основании сформированных таблиц со списком идентифицированных ASV (amplicon sequence variants) и количеством прочтений. Ферментативную активность в почвенных образцах определяли с помощью флуоресцентно-меченных субстратов. Полученные результаты были статистически проанализированы с использованием Origin 2021 v. 9.8.0.200 (OriginLab Corporation, США).

Глава 3. Особенности антифунгального действия 2,4-ДАФГ.

3.1. Спектр антифунгальной активности 2,4-ДАФГ

Показано, что минимальная ингибирующая концентрация (МИК) 2,4-ДАФГ в отношении *C. albicans* и грибов рода *Aspergillus* составила 125 мкг/мл, в отношении грибов рода *Fusarium* – 62 мкг/мл (таблица 1). Все последующие исследования с микромицетами выполнялись с использованием ингибиторных и субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ.

Таблица 1 - Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) 2,4-ДАФГ в отношении исследуемых тест-штаммов.

Тест-штамм	МИК, мкг/мл
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	125
<i>Aspergillus fumigatus</i> UTMN	125
<i>Aspergillus niger</i> INA 00760	125
<i>Aspergillus ochraceus</i> INA 01112	125
<i>Fusarium solani</i> VKPM F-890	62
<i>Fusarium culmorum</i> MFG 102100	62
<i>Fusarium sporotrichioides</i> MFG 11039	62

3.2. Влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование, физиолого-биохимические свойства культур и вторичный метаболизм *C. albicans*

Установлено, что 2,4-ДАФГ подавляет биоплёнкообразование у *C. albicans*. Это проявляется в снижении общей биомассы и метаболической активности биоплёнок, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ, на 2,1-62,2 и 21,4-64,7%, соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 1). Продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ влияет на содержание экзополимерного матрикса (ЭПМ) биоплёнок *C. albicans* и на количественный состав его компонентов. 2,4-ДАФГ в концентрации 62 мкг/мл (1/2·МИК) снижает сухой вес ЭПМ по сравнению с контролем, на 10,7±3,4%. Субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ уменьшают количественное содержание белков в ЭПМ формирующихся биоплёнок на 53,6-66,1%, по сравнению контролем (рисунок 1). Достоверных различий в количественном содержании углеводов в ЭПМ формирующихся биоплёнок обнаружено не было

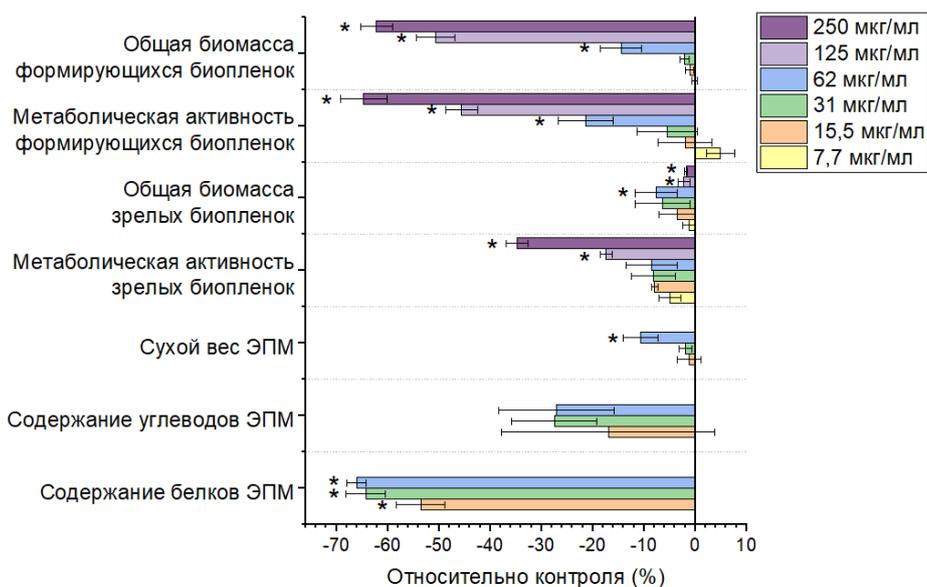


Рисунок 1 — Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся и зрелые (сформированные) биоплёнки *Candida albicans* ATCC 10231 (Stepanov et al., 2022).

Примечание: ЭПМ – экзополимерный матрикс (формирующихся биоплёнок); звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

Было выяснено, что ингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ вызывают изменения в ультраструктуре гиф. На АСМ-изображениях биоплёнок, обработанных 2,4-ДАФГ, можно обнаружить поро-подобные образования, функция которых предположительно связана с секрецией протеолитических ферментов (рисунок 2).

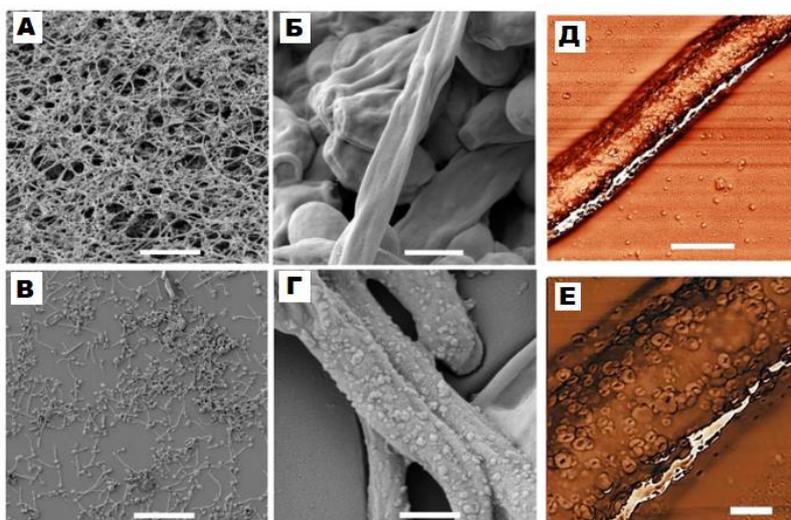


Рисунок 2 — Морфология биоплёнок (24 ч) *Candida albicans* ATCC 10231, сформированных на RPMI-1640 в присутствии 2,4-ДАФГ. А, Б – контроль (СЭМ); В, Г – СЭМ изображения биоплёнки, выросшей с 2,4-ДАФГ 250 мкг/мл; Д, Е – АСМ изображения биоплёнки, выросшей с 2,4-ДАФГ 250 мкг/мл. Масштабная линейка — 50 мкм (А, В); 2 мкм (Б, Г, Д); 200 нм (Е) (Stepanov et al., 2022).

Также установлено, что воздействие 2,4-ДАФГ нарушает процессы мицелиально-дрожжевого диморфизма. Это проявлялось как в подавлении формирования ростовой трубки у дрожжеподобных клеток на 19,6-98,5%, по сравнению с контролем, так и в ингибировании мицелиального роста культуры на агаризованной питательной среде (рисунок 3 Б).

Показано, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ увеличивали содержание эргостерола в плазматической мембране, и бета-глюканов в клеточной стенке *C. albicans* на 7,7-10,5 и 2,3-5,2%, по сравнению с контролем (рисунок 3). Вместе с тем, 2,4-ДАФГ снижал гидрофобность клеточной стенки планктонных клеток *C. albicans* на 21,7-29,8%, по сравнению с контролем (рисунок 3 А).

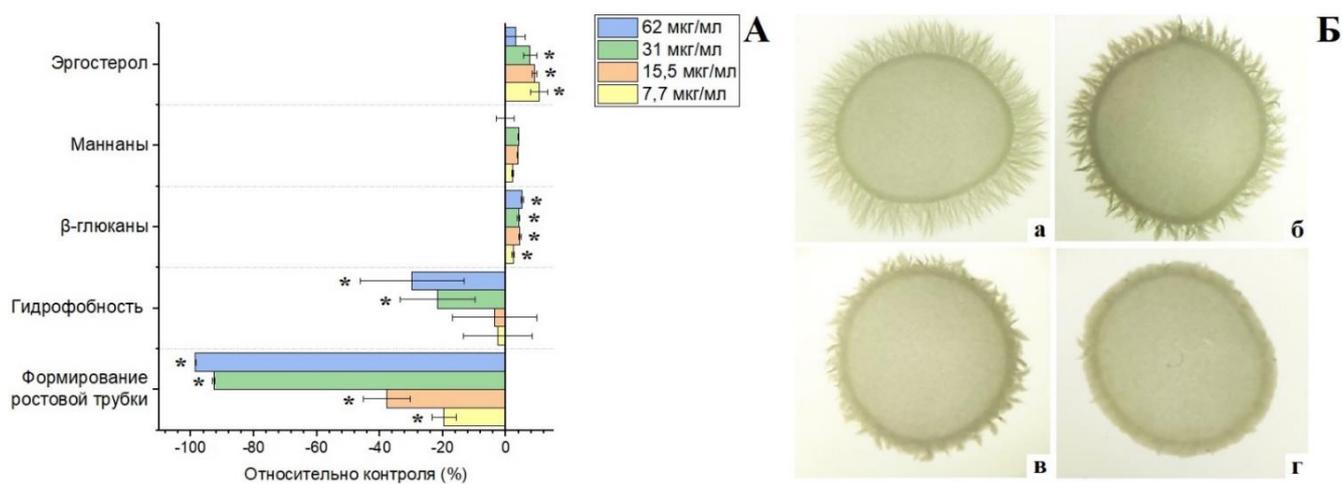


Рисунок 3 — Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства (А) и мицелиально-дрожжевой диморфизм (среда Spider, 4 сут) (Б) *Candida albicans* ATCC 10231: а – контроль, б – 7,7 мкг/мл, в – 15,5 мкг/мл, г – 31 мкг/мл (Stepanov et al., 2022).

Примечание: звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента). (Stepanov et al., 2022).

Продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ модулирует вторичный метаболизм *C. albicans*. Было выяснено, что при воздействии 2,4-ДАФГ снижалась продукция молекулы «чувства кворума» тирозола у планктонных клеток и биоплёнок *C. albicans* на 24,1-76,2%, по сравнению с контролем (рисунок 4 А).

Вместе с тем, в концентрациях выше 31 мкг/мл 2,4-ДАФГ увеличивал продукцию внеклеточных протеолитических ферментов на 16,1-330%, по сравнению с контролем. Эффект наблюдался как на планктонных клетках, так и на биоплёнках (рисунок 4 Б).

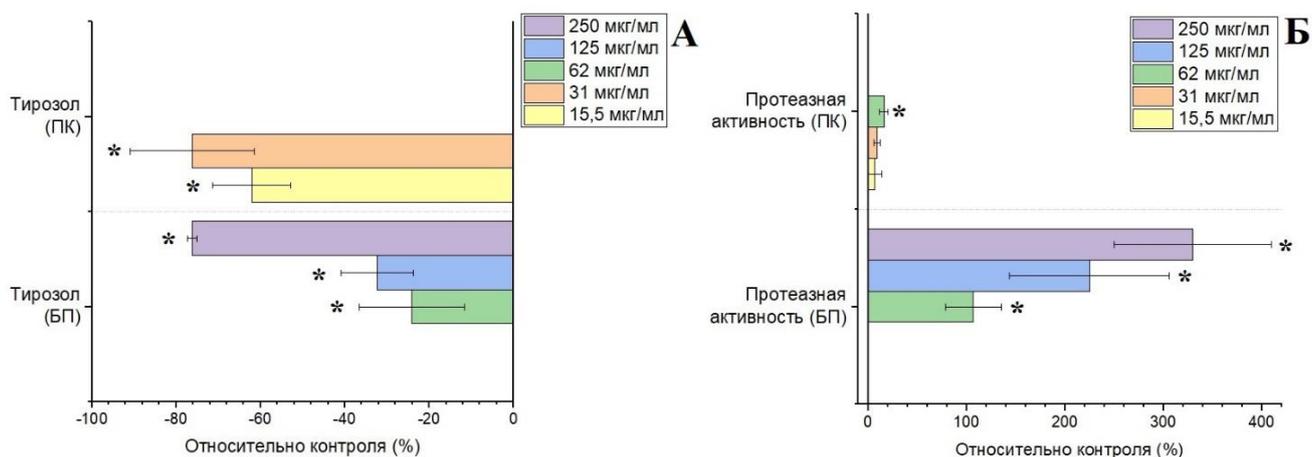


Рисунок 4 — Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию тирозола (среда YPD, 24 ч) (А) и секрецию внеклеточных протеолитических ферментов (среда YPD + 0,2% БСА, 24 ч) (Б) *Candida albicans* ATCC 10231 (Stepanov et al., 2022).

Примечание: ПК – планктонные клетки, БП – биоплёнки; звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

3.3. Влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование, физиолого-биохимические свойства культур и вторичный метаболизм грибов рода *Aspergillus*.

Было продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ подавляет процессы биоплёнкообразования у грибов рода *Aspergillus*. Так, 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях снижал общую биомассу и метаболическую активность формирующихся биоплёнок на 10,8-91,0 и 31,7-89,7%, соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 5). Структура формирующихся биоплёнок грибов рода *Aspergillus*, обработанных 2,4-ДАФГ, визуализирована с помощью СЭМ (рисунок 6).

Вместе с тем, 2,4-ДАФГ оказывал ингибирующее воздействие на зрелые биоплёнки *Aspergillus* spp. При этом 2,4-ДАФГ не разрушал структуру сформированных биоплёнок, но проникал через экзополимерный матрикс и снижал метаболическую активность клеток *A. fumigatus* на 15,2-91,9%, по сравнению с контролем. Стоит отметить, что влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование исследуемых культур *Aspergillus* spp. согласуется с данными о продукции ЭПМ и количественном содержании его компонентов. Так, в обработанных 2,4-ДАФГ биоплёнках *A. fumigatus* сухой вес ЭПМ увеличивался на 4,8-7,2%, по сравнению с контролем (рисунок 5). В свою очередь, 2,4-ДАФГ снижал содержание ЭПМ в биоплёнках *A. niger* и *A. ochraceus* на 21,2-42,2%, по сравнению с контролем.

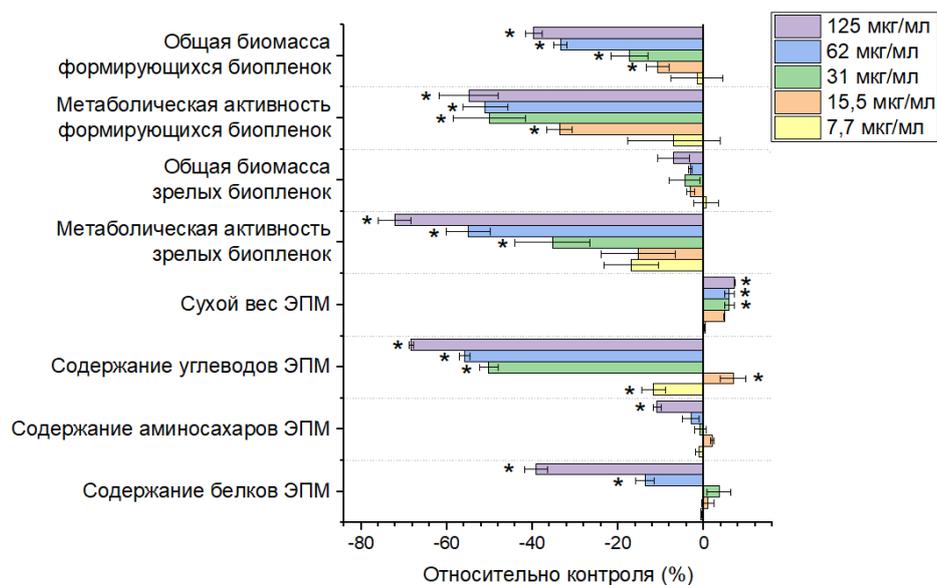


Рисунок 5 — Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся (36 ч) и зрелые (36+24 ч) биоплёнки *Aspergillus fumigatus* UTMN (Stepanov et al. 2023).

Примечание: ЭПМ – экзополимерный матрикс (формирующихся биоплёнок); звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

Количественный анализ ЭПМ биоплёнок *A. fumigatus*, *A. niger* и *A. ochraceus*, сформированных в условиях воздействия 2,4-ДАФГ, показал снижение количественного содержания углеводов и белков на 11,7-77,9 и 8,4-74,4%, соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 5).

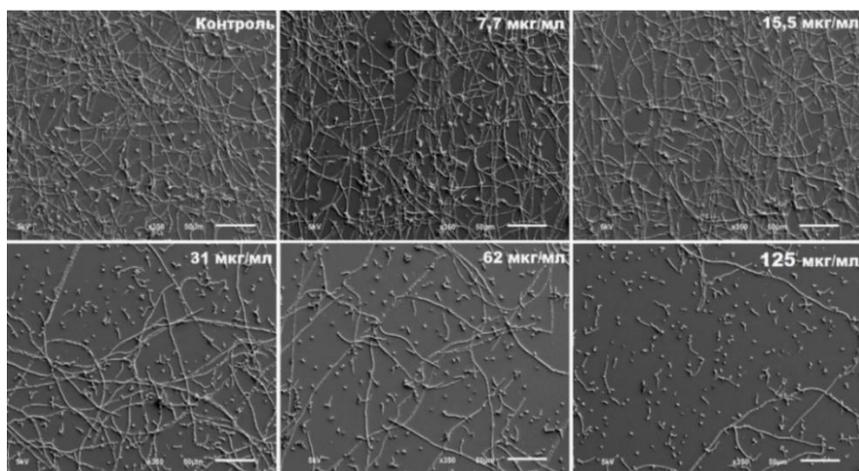


Рисунок 6 — Внешний вид биоплёнок (48 ч) *Aspergillus fumigatus* UTMN, сформированных на RPMI-1640 в присутствии 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 50 мкм (Stepanov et al., 2023).

Выяснено, что 2,4-ДАФГ оказывает влияние на физиолого-биохимические показатели культур *A. niger*, *A. ochraceus* и *A. fumigatus*. Кроме того, показано, что 2,4-ДАФГ снижал гидрофобность клеточной стенки конидий *Aspergillus* spp. на 9,0-39,6%, по сравнению с контролем (рисунок 7). Также было оценено содержание

меланина в конидиях *A. fumigatus* и *A. niger*, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ. Выяснено, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ снижали содержание меланина в конидиях *A. fumigatus* и *A. niger* на 76,4-82,9 и 56,6-85,1%, соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 7).

Влияние 2,4-ДАФГ на меланиногенез *A. fumigatus* находит отражение в морфологии конидий. На изображениях, полученных с помощью СЭМ, можно увидеть различия в структуре клеточной стенки *A. fumigatus* между обработанными 2,4-ДАФГ образцами и контролем (рисунок 8). Если в контроле поверхность клеточной стенки выглядит шероховатой, то в случае с обработанными 2,4-ДАФГ образцами поверхность является более гладкой (изменение шероховатости подтверждено с использованием АСМ).

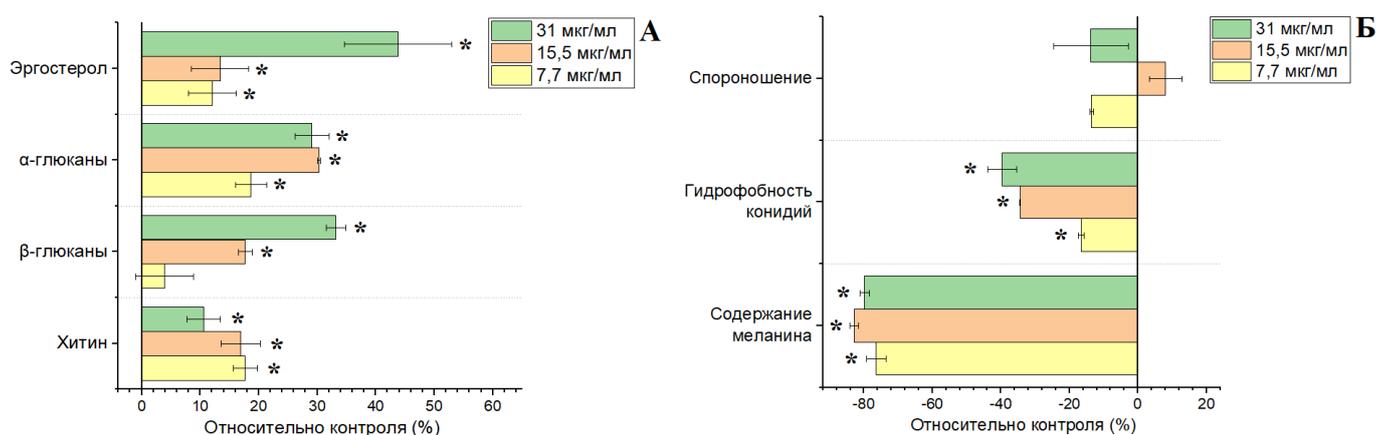


Таблица 7 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства погруженных (среда СУА, 4 сут) (А) и поверхностных (КГА, 5 сут) (Б) культур *Aspergillus fumigatus* UTMN (Stepanov et al. 2023).

Примечание: звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

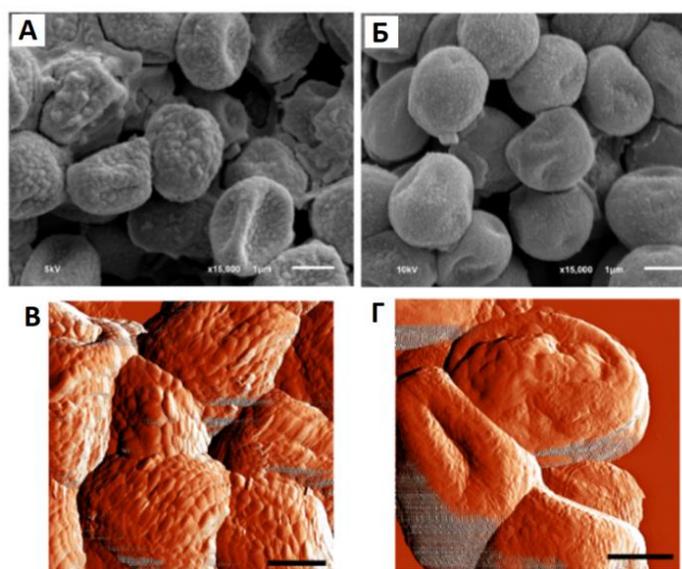


Рисунок 8 — Морфология конидий *Aspergillus fumigatus* UTMN, сформированных на КГА (5 сут) в присутствии 2,4-ДАФГ. А, В – контроль, Б, Г – 2,4-ДАФГ (31 мкг/мл). Масштабная линейка: 1 мкм (Stepanov et al., 2023).

Примечания: А, Б – изображения, полученные с помощью СЭМ, В, Г – изображения, полученные с помощью АСМ.

Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические показатели было проанализировано также в отношении погруженных культур *Aspergillus*. Отмечено, что 2,4-ДАФГ снижал количественное содержание эргостерола в плазматической мембране *A. fumigatus* и *A. niger* на 12,1-43,8%, по сравнению с контролем (рисунок 7). Продемонстрировано, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ снижали содержание альфа-и бета-глюканов, а также хитина в клеточной стенке погруженных культур *A. fumigatus*, *A. niger* и *A. ochraceus* на 6,0-33,2%, по сравнению с контролем (рисунок 7).

Показано, что 2,4-ДАФГ влияет на продукцию вторичных метаболитов, включая микотоксины, грибами рода *Aspergillus*. Так, 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях снижал содержание микотоксинов глиотоксина и фумагиллина у погруженных культур *A. fumigatus* на 25,4-68,7 и 42,4-64,3%, соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 9 А).

Выяснено, что 2,4-ДАФГ способен влиять на продукцию охратоксина А, основного микотоксина *A. ochraceus*. Так, содержание охратоксина А в погруженных культурах *A. ochraceus*, сформированных в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ, было меньше на 40,4-47,7%, по сравнению с контролем (рисунок 9 А).

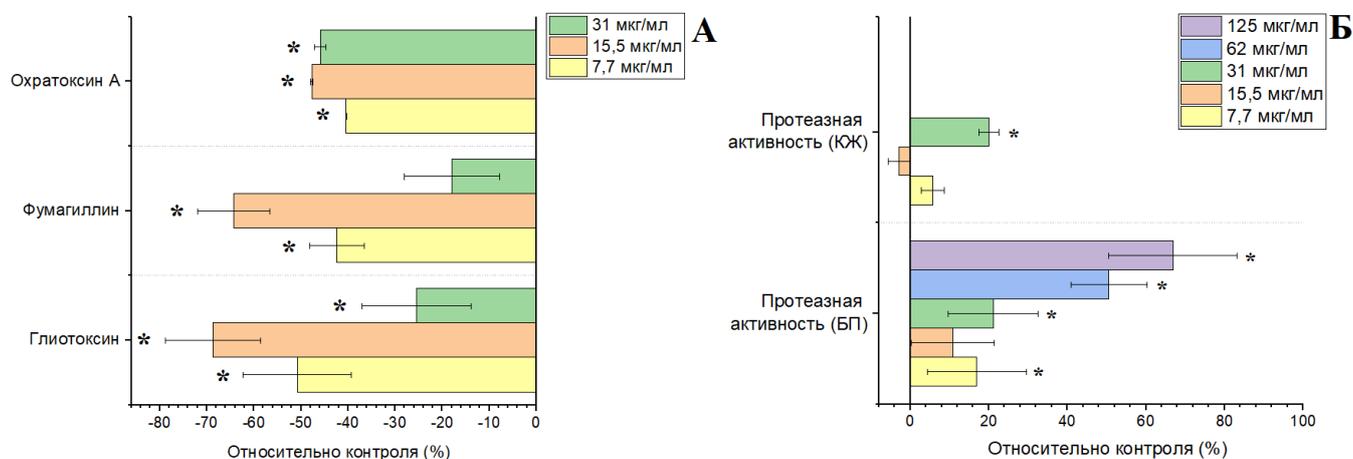


Рисунок 9 – Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию микотоксинов фумагиллина и глиотоксина *Aspergillus fumigatus* UTMN (среда YES, 4 сут) и охратоксина А *Aspergillus ochraceus* ИНА 01223 (среда YES, 9 сут) (А) и секрецию внеклеточных протеаз *Aspergillus fumigatus* UTMN (среда СУА + 0,2% БСА, 72 ч) (Б) (Stepanov et al., 2023; Stepanov et al., 2024).

Примечание: КЖ – культуральная жидкость, БП – биоплёнки; звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

Выяснено, что 2,4-ДАФГ оказывает влияние на протеазную активность культур и биоплёнок у грибов рода *Aspergillus*. Так, обработка *A. fumigatus* 2,4-ДАФГ в

концентрации выше 15,5 мкг/мл приводило к увеличению секреции протеаз на 20,1-133,0%, по сравнению с контролем (рисунок 9 Б). Эффект был характерен как для погруженных культур, так и для биоплёнок. Культуры *A. niger* и *A. ochraceus* оказались более чувствительны к действию 2,4-ДАФГ, чем *A. fumigatus*; увеличение секреции протеолитических ферментов наблюдалось в концентрациях 7,7 мкг/мл и выше. Как и в случае с *A. fumigatus*, эффект был установлен для погруженных культур и биоплёнок.

3.4. Влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнообразование, физиолого-биохимические свойства культур и вторичный метаболизм грибов рода *Fusarium*.

Продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ способен подавлять биоплёнообразование у грибов рода *Fusarium*. Внесение 2,4-ДАФГ в среду культивирования вело к снижению биомассы и метаболической активности биоплёнок *Fusarium* spp. на 1,7-17,9 и 7,6-68,0%, соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 10).

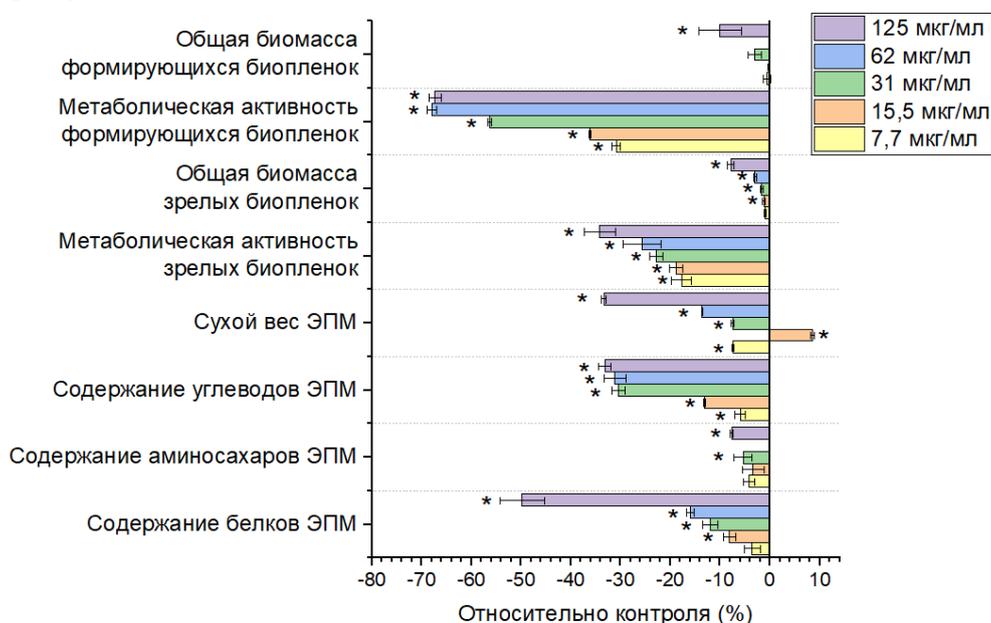


Рисунок 10 – Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся (48 ч) и зрелые (48+24 ч) биоплёнки *Fusarium solani* VKPM F-890 (Stepanov et al., 2024).

Примечание: ЭПМ – экзополимерный матрикс (формирующихся биоплёнок); звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

Структура биоплёнок *Fusarium*, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ, визуализирована с помощью СЭМ (рисунок 11). Снижение в биомассе биоплёнок, выросших в присутствии 2,4-ДАФГ сопровождалось изменениями в компонентном составе ЭПМ этих биоплёнок (рисунок 10).

На структуру зрелых биоплёнок *Fusarium* spp. 2,4-ДАФГ не оказывал деструктивного воздействия. Впрочем, отмечено снижение метаболической активности зрелых биоплёнок на 10,8-47,0, по сравнению с контролем (рисунок 10).

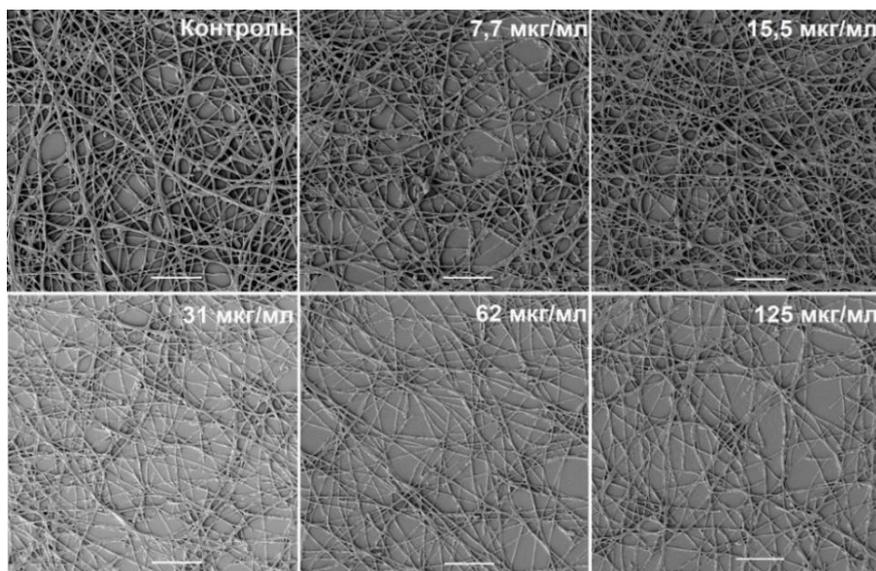


Рисунок 11 – Внешний вид биоплёнок (48 ч) *Fusarium solani* VKPM F-890, сформированных на RPMI-1640 в присутствии 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 50 мкм (Stepanov et al., 2024).

Так, продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ снижает количественное содержание углеводов и белков в ЭПМ биоплёнок *Fusarium* spp. на 6,0-52,5 и 6,0-49,8%, соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 10).

2,4-ДАФГ также оказывает влияние на физиолого-биохимические свойства культур грибов рода *Fusarium*. 2,4-ДАФГ способен изменять гидрофобные свойства мицелия грибов рода *Fusarium*. Выяснено, что воздействие 2,4-ДАФГ снижало гидрофобность клеточной стенки *F. solani*, что отразилось в смачиваемости мицелия водными растворами красителей (рисунок 12). Достоверных различий в гидрофобности клеточной стенки мицелия у культур *F. culmorum* и *F. sporotrichioides*, сформированных в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ, не установлены.

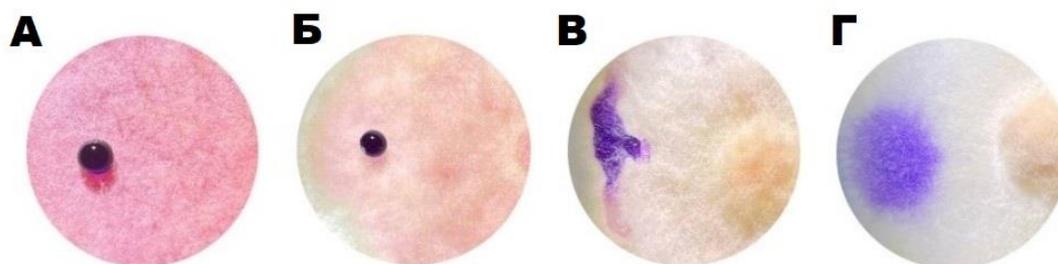


Рисунок 12 – Гидрофобность клеточной стенки мицелия *Fusarium solani* VKPM F-890, сформированного на КГА (7 сут) в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ. А – контроль, Б – 7,7 мкг/мл, В – 15,5 мкг/мл, Г – 31 мкг/мл (Stepanov et al., 2024).

Также с помощью СЭМ была оценена морфология конидий, сформированных в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ (рисунок 13). Продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ не влиял на морфологию конидий, но нарушало

конидиогенез. В частности, можно заметить значительное увеличение доли микроконидий в образцах, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ (рисунок 14).

Вышеуказанные эффекты 2,4-ДАФГ в отношении *F. solani*, в частности, нарушение гидрофобных свойств мицелия и конидиогенеза, могут быть взаимосвязаны. Известно, что нарушения морфогенеза у грибов рода *Fusarium* могут затрагивать одновременно изменения в гидрофобности клеточной стенки и паттерна конидиогенеза (FvVE1 regulates filamentous..., 2006). Достоверных изменений в конидиогенезе *F. culmorum* и *F. sporotrichioides*, сформированных в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ, обнаружено не было.

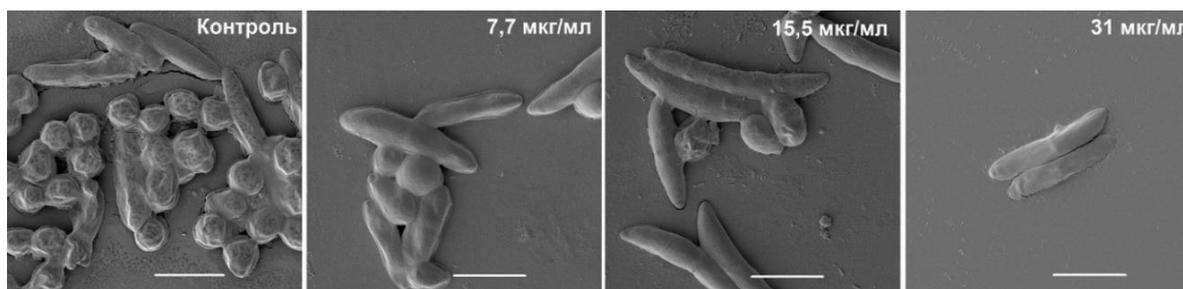


Рисунок 13 – Морфология конидий культур *Fusarium solani* VKPM F-890, сформированных на КГА (7 сут) в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 10 мкм (Stepanov et al., 2024).

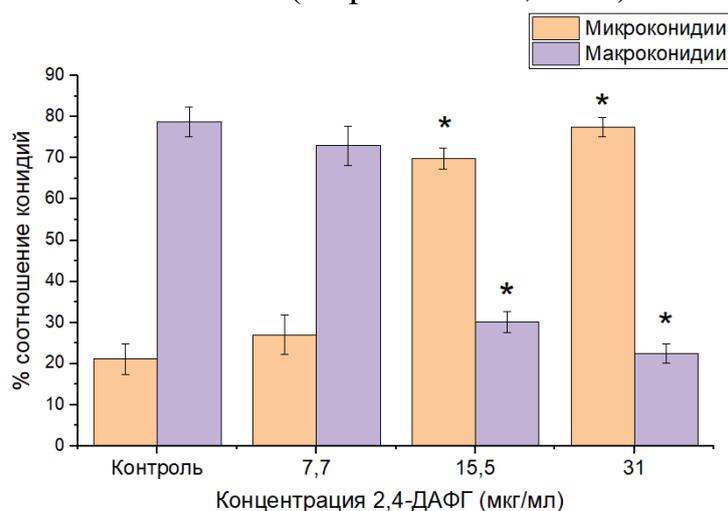


Рисунок 14 – Процентное соотношение макро- и микроконидий у культур *Fusarium solani* VKPM F-890, сформированных на КГА (7 сут) в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ.

Примечание: звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

Выяснено, что 2,4-ДАФГ оказывает влияние на физиолого-биохимические параметры погруженных культур грибов рода *Fusarium*. Так, содержание эргостерола в плазматической мембране культур *Fusarium* spp., сформированных в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ, оказывается меньше на 6,7-56,3%, по сравнению с контролем (рисунок 15).

Показано, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ уменьшают количественное содержание альфа и бета-глюканов, а также хитина в клеточной стенке культур *Fusarium* spp. на 16,4-68,3%, по сравнению с контролем (рисунок 15).

Вместе с тем, 2,4-ДАФГ оказывает влияние на содержание в мицелии грибов рода *Fusarium* нафтохиноновых пигментов, вторичных метаболитов, обладающих антимикробной и антиоксидантной активностью. Продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях снижает содержание нафтохиноновых пигментов в мицелии погруженных культур *Fusarium* spp. на 39,2-88,1%, по сравнению с контролем (рисунок 15). Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что стрессовые факторы и соединения с антифунгальной активностью могут снижать содержание хитина в клеточной стенке у *Fusarium* spp. (Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium ..., 2021; Natural product osthole ..., 2023).

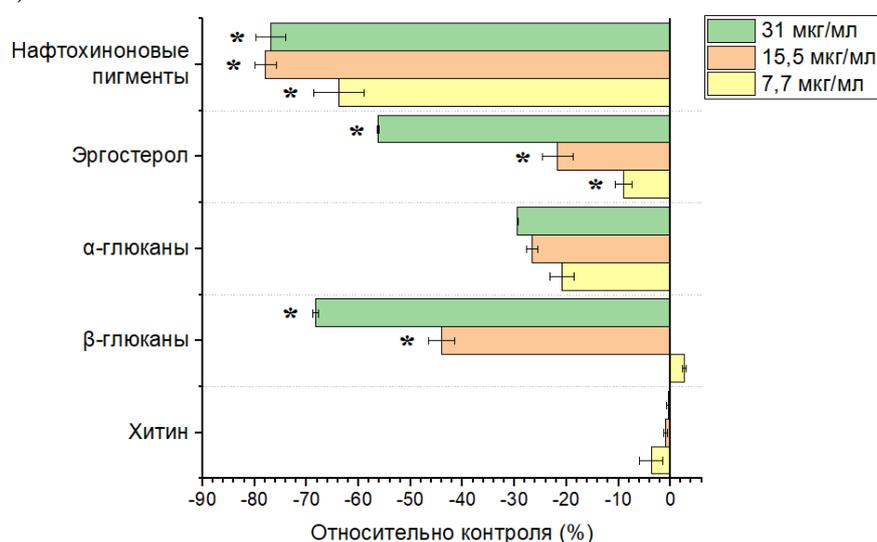


Рисунок 15 – Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства погруженных культур *Fusarium solani* VKPM F-890 (Stepanov et al., 2024).

Примечание: звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

Отмечено, что 2,4-ДАФГ оказывает влияние на продукцию вторичных метаболитов, включая микотоксины, грибами рода *Fusarium*. Выяснено, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ повышают продукцию микотоксинов Т-2 токсина у *F. sporotrichioides* и зеараленона у *F. culmorum*, на 25,2-66,7 и 73,5-87,8%, соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 16 Б).

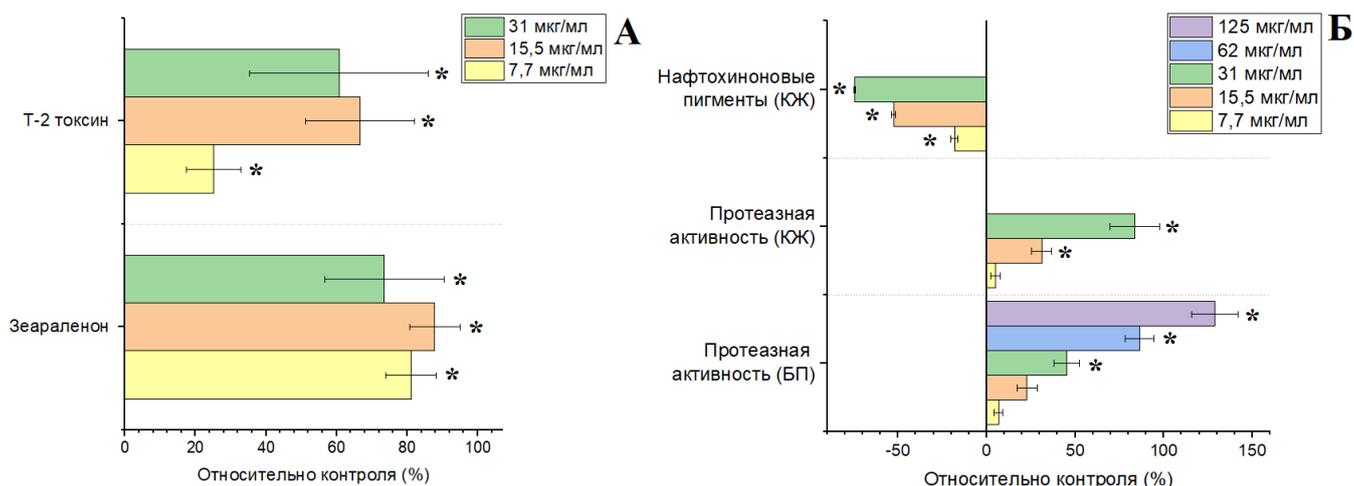


Рисунок 16 – Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию Т-2 токсина *Fusarium sporotrichioides* MFG 11039 и зеараленона *Fusarium culmorum* MFG 102100 (среда Муго, 6 сут) (А) и продукцию вторичных метаболитов *Fusarium solani* VKPM F-890 (Б) (Stepanov et al., 2024).

Примечание: КЖ – культуральная жидкость, БП – биоплёнки; звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

Повышение продукции микотоксинов в ответ на действие 2,4-ДАФГ, предположительно, является неспецифической стресс-реакцией (Perincherry et al., 2019). Известно, что соединения с антифунгальной активностью могут усиливать продукцию микотоксинов у грибов рода *Fusarium* (Nakajima, 2010; Effect of fungicides commonly ..., 2021).

Кроме того, субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ влияют на продукцию внеклеточных нафтохиноновых пигментов у погруженных культур грибов рода *Fusarium*. Так, 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях снижает продукцию нафтохиноновых пигментов у *F. solani* и *F. sporotrichioides* в среднем на 11,8-74,6%, по сравнению с контролем (рисунок 16 А). Снижение содержания нафтохиноновых пигментов в мицелии и культуральной жидкости исследуемых штаммов в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ может быть причиной увеличения секреции микотоксинов Т-2 токсина и зеараленона. Известно, что продукция нафтохиноновых пигментов и микотоксинов у грибов рода *Fusarium* находится в отрицательной корреляции. Повышенная продукция нафтохиноновых пигментов влечет за собой снижение продукции микотоксинов и наоборот (Identification of a gene ..., 2005; Histone H3K4 methylation ..., 2015).

2,4-ДАФГ также оказывает влияние на протеазную активность культур и биоплёнок у грибов рода *Fusarium*. Отмечено, что опытное воздействие 2,4-ДАФГ дозозависимо повышало протеазную активность *Fusarium* spp. на 10,6-149,7%, по сравнению с контролем (рисунок 16 А). Как и в случае с другими исследуемыми тест-штаммами, увеличение продукции внеклеточных протеолитических ферментов, предположительно, является общей неспецифической реакцией грибов на стресс-факторы.

Глава 4. Влияние 2,4-ДАФГ на грибное сообщество почвенного микробиома

Выяснено, что 2,4-ДАФГ способен изменять структуру почвенного грибного сообщества в лабораторных условиях проведения эксперимента. В частности, на 28 сутки эксперимента 2,4-ДАФГ в концентрациях 1 и 10 мг/кг почвы отмечено лишь незначительное увеличение индекса Шеннона, характеризующего альфа-разнообразие грибов в почвенном сообществе, с $4,04 \pm 0,11$ до $4,15 \pm 0,08$ и $4,18 \pm 0,08$, соответственно (рисунок 17 А). Достоверных изменений в индексе альфа-разнообразия Чао1, отражающем реальное число обнаруженных ASV, не было найдено (рисунок 17 Б).

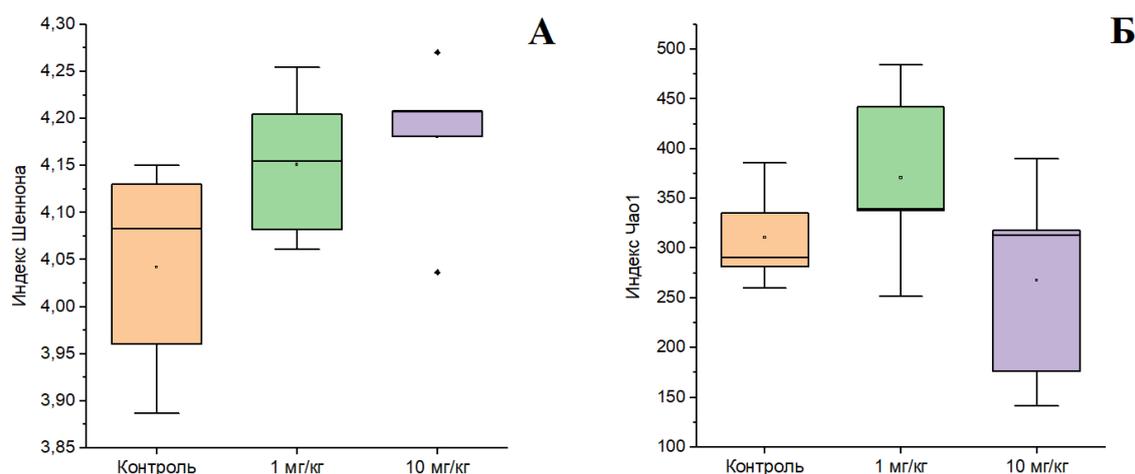


Рисунок 17. Влияние 2,4-ДАФГ на биоразнообразие почвенного сообщества грибов, выраженное в индексах альфа-разнообразия Шеннона (А) и Чао1 (Б).

На уровне таксономической организации грибного сообщества были зафиксированы следующие изменения в представленности таксонов.

При внесении в почвенные микроскопические системы 2,4-ДАФГ на 28 сутки инкубирования уменьшалась представленность отряда *Mucoromycota* с $35,61 \pm 4,50$ до $22,84-28,90\%$ (рисунок 18 А). Уменьшение в представленности на уровне рода было дозозависимым: представленность *Mortierella* при внесении 1 мг/кг 2,4-ДАФГ (Log_2 -кратное изменение $-0,36$) и 10 мг/кг (Log_2 -кратное изменение $-0,53$) и *Linnemannia* (ASV 6) (Log_2 -кратные изменения $-0,70$ и $-0,88$, соответственно) (рисунок 18 Б). Также наблюдалось увеличение представленности отрядов *Ascomycota* (с $50,34 \pm 3,39$ до $55,89-60,95\%$) и *Basidiomycota* (с $12,34 \pm 0,83$ до $12,80-14,85\%$) (рисунок 18 А). На уровне рода, при внесении 1 мг/кг 2,4-ДАФГ отмечается увеличение в представленности доминантных ASV, отнесенных к родам *Nectria* (Log_2 -кратное изменение $+0,94$), *Leptosphaeria* (Log_2 -кратное изменение $+0,83$), *Fusarium sensu lato* (Log_2 -кратное изменение $+1,24$), а также о *Pleosporales* (Log_2 -кратное увеличение $+1,00$) (рисунок 17 Б). Внесение 10 мг/кг 2,4-ДАФГ приводит к увеличению представленности доминантных ASV, отнесенных к *Niesslia* (Log_2 -кратное изменение $+0,63$) (рисунок 17 Б).

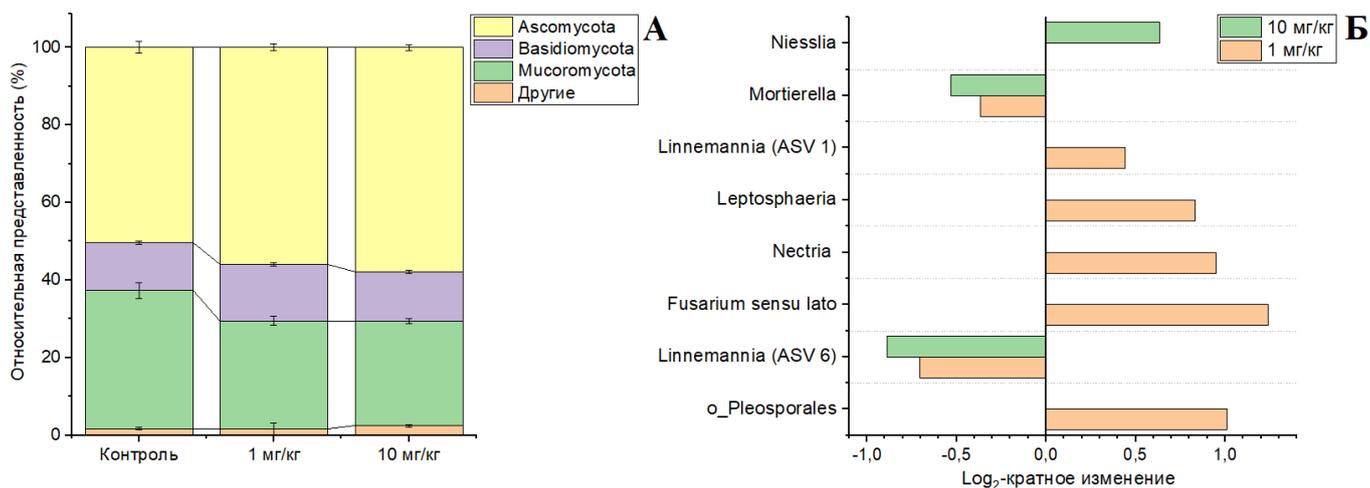


Рисунок 17 – Влияние 2,4-ДАФГ на таксономическую структуру почвенного сообщества грибов на уровне отряда (А) и рода (Б). На уровне рода данные выражены в значениях относительного изменения представленности (Log_2 -кратное изменение) доминантных таксонов в опытной выборке по сравнению с контрольной выборкой.

Также продемонстрировано, что внесение в почвенные микроскомы 2,4-ДАФГ в концентрациях 1 и 10 мг/кг почвы увеличивало активность внеклеточных почвенных ферментов на 28 сутки эксперимента: β -1,4-глюкозидазы, β -1,4-ксилозидазы, β -1,4-целлобиозидазы, N-ацетил-глюкозаминидазы и кислой фосфатазы в среднем на 115-683%, по сравнению с контролем (рисунок 18). Активность лейцинаминопептидазы на 28 сутки наблюдения была многократно выше в свободных от 2,4-ДАФГ почвенных микроскомах по сравнению с содержащими 2,4-ДАФГ образцами (рисунок 18).

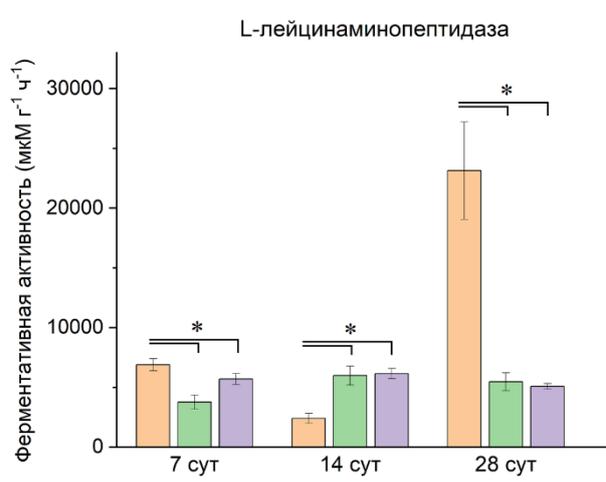
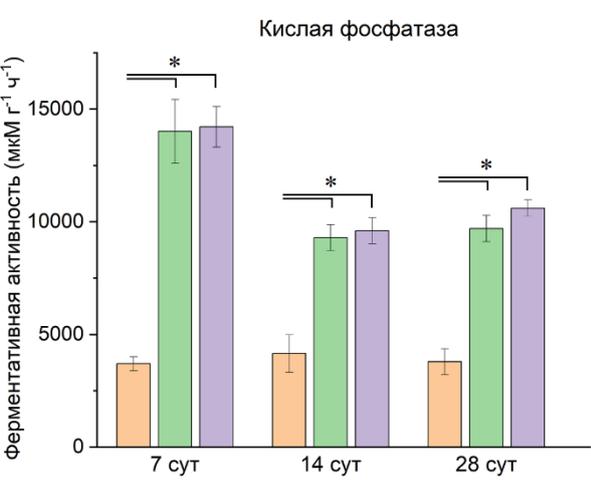
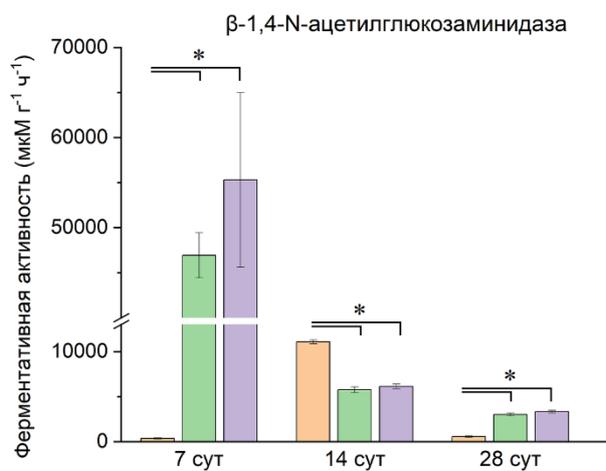
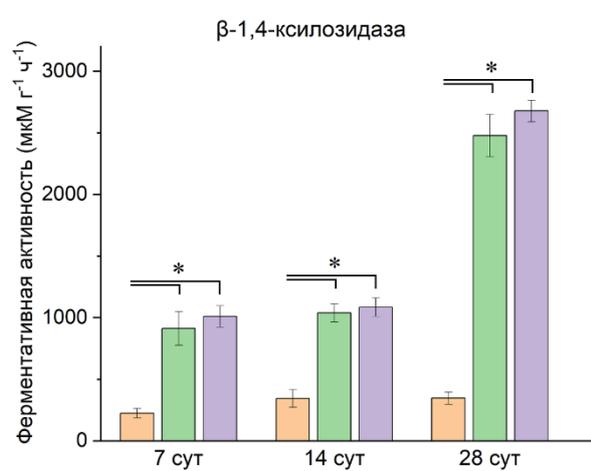
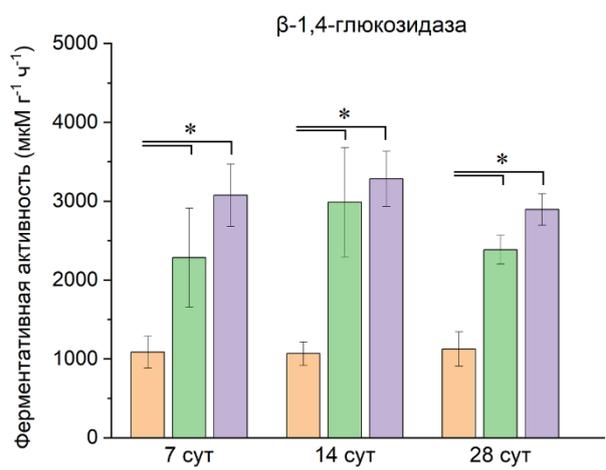
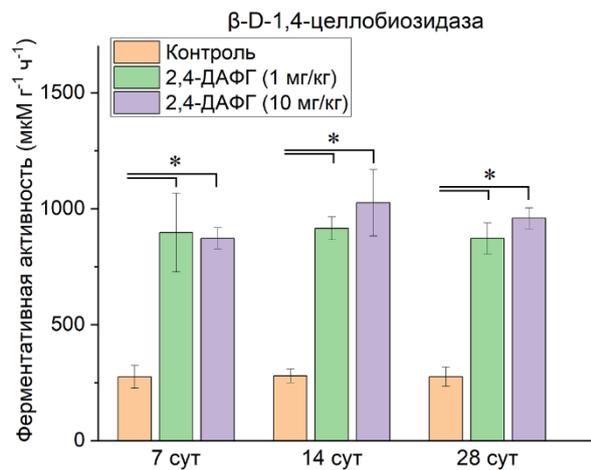


Рисунок 18 – Влияние 2,4-ДАФГ на ферментативную активность почвенного микробиома.

Примечание: звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента).

Заключение

1. Исследования показали, что 2,4-ДАФГ по-разному влияет на биоплёнки дрожжеподобных и мицелиальных грибов. Низкие концентрации (1/16–1/4 МИК) не подавляют образование биоплёнок у *Candida albicans*, но при 1/2 МИК у формирующихся и зрелых биопленок наблюдается снижение биомассы на 14,4% и 7,7%, по сравнению с контролем. У *Aspergillus* spp. низкие концентрации (1/16–1/2 МИК) вызывают дозозависимое снижение биомассы и жизнеспособности формирующихся и зрелых биоплёнок. Максимальный эффект достигается на 1/2 МИК, при которой биомасса и метаболическая активность биоплёнок снижается на 33,5–89,3% и 51,0–93,5%, соответственно, по сравнению с контролем. У *Fusarium* spp. 2,4-ДАФГ в концентрациях 1/8–1/2 МИК не нарушает структуру биоплёнок, но снижает их жизнеспособность. При 1/2 МИК наблюдается снижение метаболической активности формирующихся и зрелых биоплёнок на 25,7–68,0%, по сравнению с контролем. Таким образом, 2,4-ДАФГ наиболее эффективен против *Aspergillus* spp., умеренно действует на *Fusarium* spp. и слабее всего влияет на *Candida albicans*.

2. Установлено, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях меняет количественный состав экзополимерного матрикса (ЭПМ) биоплёнок микромицетов. Обнаружено, что субингибиторных концентрациях (1/8-1/2 МИК) снижает содержание углеводов в ЭПМ формирующихся биоплёнок у *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp. на 11,7-68,3% и 13,1-52,5%, соответственно, по сравнению с контролем. Содержание белков в ЭПМ формирующихся биоплёнок *C. albicans*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. уменьшается на 53,6-66,1%, 8,4-69,4% и 8,1-49,8%, соответственно, по сравнению с контролем. Обнаруженные изменения можно объяснить штаммовыми особенностями.

3. Показано, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ способны влиять на межклеточную коммуникацию *C. albicans*. Продемонстрировано, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ (1/8-1/2 МИК) снижают продукцию тирозола - молекулы «чувства кворума» у культур *C. albicans* на 24,1-76,2%, по сравнению с контролем.

4. Продемонстрировано, что воздействие субингибиторных концентраций (1/8-1/2 МИК) 2,4-ДАФГ дозозависимо снижает продукцию микотоксинов у токсигенных представителей рода *Aspergillus*: охратоксина А у *A. ochraceus* на 40,4-47,7%, и глиотоксина и фумагиллина у *A. fumigatus* на 25,4-68,7 и 42,4-64,3%, соответственно, по сравнению с контролем. У токсигенных представителей рода *Fusarium* 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях (1/8-1/2 МИК) дозозависимо повышает продукцию микотоксинов: Т-2 токсина у *F. sporotrichioides* и зеараленона у *F. culmorum* на 25,2-66,7 и 73,5-87,8%, соответственно, по сравнению с контролем. Таким образом, в зависимости от эколого-трофической принадлежности микромицетов, действие 2,4-ДАФГ может снижать продукцию микотоксинов у сапротрофных видов и повышать её у фитопатогенных.

5. Показано, что 2,4-ДАФГ субингибиторных концентрациях (1/8-1/2 МИК) дозозависимо повышает продукцию внеклеточных протеаз у погруженных культур и биоплёнок *C. albicans*, *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. на 16,1-107,1%, 20,0-70,4% и 21,8-97,8%, соответственно, по сравнению с контролем. Данный эффект носит общий

характер для всех микромицетов, её проявление зависит лишь от штаммовых особенностей.

6. Установлено, что в почвенных образцах, содержащих 2,4-ДАФГ в концентрациях 1 и 10 мг/кг, на 28 сутки эксперимента наблюдается уменьшение относительной доли представителей отдела *Mucoromycota* с одновременным увеличением относительной доли представителей отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota*. Также на 28 сутки эксперимента зафиксировано увеличение ферментативной активности микроорганизмов в почвенных образцах, содержащих 2,4-ДАФГ, на 115-683%, по сравнению с контролем.

Полученные результаты расширяют представление о взаимодействии 2,4-диацетилфлороглюцина, вторичного метаболита ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* с микромицетами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, индексируемых Scopus и WoS:

1. **Stepanov, A.A.** The Ecological Strategy Determines the Response of Fungi to Stress: A Study of the 2,4-diacetylphloroglucinol Activity Against *Aspergillus* and *Fusarium* Species / A.A. Stepanov, N.A. Shulaev, A.S. Vasilchenko // Journal of Basic Microbiology. – 2024. – Vol. 65, N 1, e2400334.

2. **Stepanov, A.A.** Subinhibitory Effects of 2,4-Diacetylphloroglucinol on Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus* / A.A. Stepanov, Vasilchenko A.V., Vasilchenko A.S. // Journal of Applied Microbiology. – 2023. – Vol. 134, N 12, lxad294.

3. **Stepanov, A.A.** 2,4-Diacetylphloroglucinol Modulates *Candida albicans* Virulence / A.A. Stepanov, D.V. Poshvina, A.S. Vasilchenko // Journal of Fungi. – 2022. – Vol. 8, N 10, 1018.

Публикации в других научных изданиях:

1. **Степанов, А.А.** Влияние 2,4-диацетилфлороглюцина на грибы рода *Aspergillus* / А.А. Степанов, А.С. Васильченко // V Всероссийский конгресс по защите растений. Сборник тезисов докладов. СПб.: ФГБНУ ВИЗР, 2024. – С. 225.

2. **Степанов, А.А.** Влияние 2,4-диацетилфлороглюцина на почвенного микромицета *A. fumigatus* / А.А. Степанов, А.С. Васильченко // От микробиологии к генетическим технологиям: Материалы всероссийской конференции, Новосибирск, 22–25 сентября 2023 года. – Новосибирск: Общество с ограниченной ответственностью «Офсет-ТМ», 2023. – С. 73-74.

3. **Степанов, А.А.** Влияние 2,4-диацетилфлороглюцинола на биоплёнкообразование *Candida albicans* и *Aspergillus fumigatus* / А.А. Степанов, А.С. Васильченко // Материалы 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века», Пущино, 9–13 апреля 2023 г. – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2023. – С. 186-187.

4. **Степанов, А.А.** Влияние 2,4-диацетилфлороглюцинола на факторы вирулентности *A. fumigatus* / А.А. Степанов, А.С. Васильченко // V Всероссийская с международным участием школа-конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века», Казань, 30 ноября — 2 декабря 2022 г. — Казань: КФУ, 2022. — С. 83.

5. **Степанов, А.А.** Влияние 2,4-диацетилфлюороглиуцинола на биоплёнкообразование *C. albicans* / А.А. Степанов, А.С. Васильченко // Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания: тезисы докладов Второй Всероссийской научной конференции с международным участием, Иркутск, 28 февраля – 06 марта 2022 года. – Иркутск: Иркутский государственный университет, 2022. – С. 209–210.