

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Тюменский государственный университет»

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Васильченко Алексей Сергеевич

Тюмень – 2025

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ РИЗОСФЕРНЫХ ПСЕВДОМОНАД И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНА В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	10
1. Фитопатогены грибного происхождения как основная причина потери сельскохозяйственной продукции	10
1.1. Фитопатогенные грибы и контаминанты пищевой продукции	10
1.1.1. Биоплёнки как форма существования грибов	11
1.1.2. Факторы патогенности грибов	14
1.1.3. Микотоксины	14
1.1.4. Внеклеточные ферменты	19
1.2. Химическая защита растений от грибных фитопатогенов	21
1.2.1. Резистентность к фунгицидам	22
1.2.2. Токсичность фунгицидов для нецелевых организмов	23
1.3. Биологическая защита растений от грибных фитопатогенов	25
1.3.1. Роль PGPR-бактерии в биологическом контроле фитопатогенов .	26
1.3.2. Ризосферные бактерии рода <i>Pseudomonas</i> как потенциальные агенты биоконтроля	27
1.3.3. Вторичные метаболиты ризосферных <i>Pseudomonas</i> spp.	27
1.3.4. 2,4-диацетилфлороглюцин - ключевой антимикробный метаболит <i>Pseudomonas</i> spp.	28
1.3.5. Биосинтез 2,4-ДАФГ и его регуляция	31
1.3.6. Роль 2,4-ДАФГ в защите растений от бактерий, грибов и нематод	33
1.3.7. Роль 2,4-ДАФГ в коммуникации с растениями, в т.ч. активации иммунитета	34
1.3.8. Роль 2,4-ДАФГ в коммуникации с микроорганизмами	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1. Объекты исследования	37
2.1.1. Штаммы микроорганизмов	37
2.2. Методы исследования	37
2.2.1. Культивирование микроорганизмов	37
2.2.2. Получение препаративных количеств 2,4-ДАФГ	38

2.2.3. Определение антифунгальной активности 2,4-ДАФГ	39
2.2.4. Оценка влияния 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование грибов	40
2.2.5. Оценка морфологии биоплёнок грибов	41
2.2.6. Химический анализ экзополимерного матрикса биоплёнок грибов	42
2.2.7. Оценка содержания полисахаридов в клеточной стенке <i>C. albicans</i>	42
2.2.8. Оценка содержания полисахаридов в мицелии <i>Aspergillus</i> spp. и <i>Fusarium</i> spp.....	44
2.2.9. Оценка содержания эргостерола в планктонных клетках <i>C. albicans</i> и мицелии <i>Aspergillus</i> spp. и <i>Fusarium</i> spp.....	45
2.2.10. Оценка гидрофобных свойств клеточной стенки планктонных клеток <i>C. albicans</i> и конидии <i>Aspergillus</i> spp.....	46
2.2.11. Оценка гидрофобных свойств мицелия <i>Fusarium</i> spp.....	47
2.2.12. Анализ мицелиально-дрожжевого диморфизма <i>C. albicans</i>	47
2.2.13. Оценка спороношения <i>Aspergillus</i> spp.	48
2.2.14. Оценка содержания меланинов в конидиях <i>Aspergillus</i> spp.	48
2.2.15. Оценка морфологии конидий <i>Aspergillus</i> spp. и <i>Fusarium</i> spp.	49
2.2.16. Оценка содержания нафтохиноновых пигментов в мицелии <i>Fusarium</i> spp.....	49
2.2.17. Оценка продукции молекул «чувства кворума» <i>C. albicans</i>	50
2.2.18. Оценка продукции глиотоксина и фумагиллина <i>A. fumigatus</i>	51
2.2.19. Оценка продукции охратоксина А <i>A. ochraceus</i>	52
2.2.20. Оценка продукции Т-2 токсина и зеараленона <i>Fusarium</i> spp.	52
2.2.21. Оценка продукции внеклеточных нафтохиноновых пигментов <i>Fusarium</i> spp.....	54
2.2.22. Оценка продукции внеклеточных протеолитических ферментов грибов	54
2.2.23. Анализ структуры почвенного микробиома	55
2.2.24. Анализ ферментативной активности почвенного микробиома ...	56
2.2.25. Статистическая обработка.....	57
ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ АНТИФУНГАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНА	57
3.1. Спектр антифунгальной активности 2,4-ДАФГ	57
3.2. Влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование <i>C. albicans</i>	58

3.3. Влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование <i>Aspergillus</i> spp.	61
3.4. Влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование <i>Fusarium</i> spp.	70
3.5. Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства культур <i>C. albicans</i>	80
3.6. Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства культур <i>Aspergillus</i> spp.	83
3.7. Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства культур <i>Fusarium</i> spp.	92
3.8. Влияние 2,4-ДАФГ на вторичный метаболизм <i>C. albicans</i>	100
3.9. Влияние 2,4-ДАФГ на вторичный метаболизм <i>Aspergillus</i> spp. и <i>Fusarium</i> spp.	102
ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНА НА ПОЧВЕННОЕ ГРИБНОЕ СООБЩЕСТВО	112
4.1. Влияние 2,4-ДАФГ на структурные свойства почвенного микробиома	112
4.2. Влияние 2,4-ДАФГ на функциональные свойства почвенного микробиома	116
4.3. Взаимосвязь между структурными и функциональными изменениями, вызванными действием 2,4-ДАФГ	119
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	125
СПИСОК ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128

ВВЕДЕНИЕ

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 концентраций 2,4-ДАФГ на дрожжеподобные и мицелиальные грибы в условиях *in vitro* и *in situ*.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценить влияние субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ на процессы биоплёнкообразования микромицетов.
2. Определить морфолого-физиологические изменения микромицетов, вызванные действием субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ.
3. Оценить продукцию вторичных метаболитов микромицетов в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ.
4. Проанализировать изменения в структурно-функциональных свойствах почвенного грибного сообщества при воздействии 2,4-ДАФГ.

Научная новизна. Впервые показано влияние субингибиторных и ингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование микромицетов. Продемонстрировано действие субингибиторных концентраций 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*-критерий Стьюдента, индекс Шеннона, индекс Чао1).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ негативно влияют на процессы биоплёнокообразования 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 *Mucoromycota* 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 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 публикаций 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)

ГЛАВА 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ РИЗОСФЕРНЫХ ПСЕВДОМОНАД И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНА В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1. Фитопатогены грибного происхождения как основная причина потери сельскохозяйственной продукции

По оценкам продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (Food and Agriculture Organization, FAO), ежегодные потери урожая возделываемых культур от фитопатогенов составляют до 40%. Соответствующие экономические потери составляют порядка 220 миллиардов долларов (FAO's Plant Production ..., 2022).

Известно, что порядка 70-80% известных возбудителей заболеваний растений составляют грибы (Fungal disease detection ..., 2017). Фитопатогены грибного происхождения являются одной из основных причин снижения урожая и ухудшения качества сельскохозяйственных культур вследствие контаминации микотоксинами (FAO's Plant Production ..., 2022). Соответствующие ежегодные потери пищевой продукции оцениваются в 25-30% (Nji et al., 2023).

1.1. Фитопатогенные грибы и контаминанты пищевой продукции

Фитопатогенные грибы распространены по всему миру, и точное количество видов, поражающих культурные растения, до сих пор неизвестно. Среди грибных фитопатогенов традиционно выделяют грибы рода *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizoctonia*, *Septoria*, *Cercospora*, *Colletotrichum*, *Botrytis*, *Puccinia*, *Ustilago*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Erysiphe* и некоторые другие (Hermann, Stenzel ..., 2019). Можно выделить несколько представителей фитопатогенных грибов, приносящих наибольший ущерб сельскому хозяйству. Журнал *Molecular Plant Pathology* в 2012 году составил список 10 наиболее важных, как с научной, так и с экономической точек зрения фитопатогенов грибной природы (The Top 10 fungal pathogens ..., 2012). В него попали *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Puccinia* spp., *Fusarium graminearum*, *Fusarium*

oxysporum, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Colletotrichum* spp., *Ustilago maydis* и *Melampsora lini*.

Наличие в списке сразу двух видов рода *Fusarium* не случайно. Представители рода *Fusarium* являются важнейшими фитопатогенами, вызывающие заболевания у широкого спектра растений-хозяев (Ekwomadu, Mwanza, 2023). Они не только вызывают снижение урожая, но также загрязняют пищевую продукцию микотоксинами, вызывающими микотоксикозы у человека и животных. Грибы рода *Fusarium* также являются оппортунистическими возбудителями грибковых заболеваний у человека и животных (Human fusariosis ..., 2020).

Как было сказано выше, фитопатогенные грибы не только снижают урожай, но также ухудшают его качество вследствие контаминации микотоксинами. По данным FAO, примерно 25% урожая всех сельскохозяйственных культур ежегодно оказываются контаминированы микотоксинами (FAO's Plant Production ..., 2022). Традиционно к микотоксигенным грибам относят виды рода *Aspergillus*, *Fusarium* и *Penicillium* (An overview on the major mycotoxins ..., 2022). Стоит отметить, что представители рода *Aspergillus* и *Penicillium* не являются типичными возбудителями заболеваний растений. Контаминация микотоксинами в этом случае происходит не на этапе вегетации растений, а на этапе хранения растительного сырья (The Good, the Bad ..., 2021).

Наиболее важными представителями данной группы являются виды рода *Aspergillus*, ухудшающих качество пищевой продукции, в частности зерновых, бобовых, масличных и плодовых культур (*Aspergillus* derived mycotoxins ..., 2021). Ровно как и *Fusarium* spp., представители рода *Aspergillus* являются оппортунистическими возбудителями грибковых инфекций человека и животных (A global view ..., 2021).

1.1.1. Биоплёнки как форма существования грибов

В последние десятилетия было достигнуто понимание того, как микроорганизмы существуют в постоянно меняющихся условиях

окружающей среды. Стало понятно, что микроорганизмы существуют не в виде одиночных клеток. Они отдают предпочтение существованию в виде биоплёнок. Биоплёнки представляют собой скопление микробных клеток и внеклеточного матрикса, состоящего из полисахаридов, белков и нуклеиновых кислот (Fungal biofilm resistance, 2017). Биоплёнки обеспечивают защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды: УФ-излучения, изменения температуры, влажности, pH, а также действия антимикробных соединений. Несмотря на то, что явление «биоплёнкообразования» первоначально было описано для бактерий, со временем накопились сведения о том, что грибы также существуют в окружающей среде в виде биоплёнок. Наиболее подробно процессы биоплёнкообразования описаны для дрожжеподобных грибов, в частности, представителей рода *Candida* (Miranda et al., 2022). В 2009 году Harding и соавт. предложили модель формирования грибной биоплёнки. Этапы биоплёнкообразования в случае с мицелиальными грибами практически аналогичны тем, что описаны для дрожжеподобных грибов и бактерии. Согласно Harding и соавт. формирование биоплёнки у мицелиальных грибов состоит из шести этапов: 1) прикрепление пропагул (конидий или гиф) к поверхности, 2) активное прикрепление пропагул к поверхности, включающее секрецию белков адгезинов во время прорастания спор или роста других структур, 3) образование микроколонии, включающее в себя рост гиф и формирование анастомозов (образование монослоя), 4) вторичное образование микроколонии, или созревание биоплёнки (образование трехмерной структуры), 5) созревание, окончательное оформление структуры биоплёнки, 6) дисперсия, выброс клеток грибов наружу биоплёнки (Can filamentous fungi ..., 2009).

Как было сказано ранее, биоплёнки первоначально были описаны для возбудителей бактериальных и грибных (в частности – грибов рода *Candida*) инфекции. Впоследствии биоплёнкообразование было описано для грибов рода *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Trichosporon*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Coccidioides* (Fungal biofilms and ..., 2017). О важности

биоплёнообразования говорит тот факт, что, по оценкам, порядка 80% бактериальных и грибковых инфекции человека связаны с формированием биоплёнок (Miranda et al., 2022). Более того, оппортунистические возбудители кандидозов (*Candida* spp.) и аспергиллёзов (*Aspergillus fumigatus*), способные к формированию биоплёнок, являются причиной порядка 1 350 000 смертей ежегодно (Denning, 2024).

В последние десятилетия накопились сведения о том, что грибные биоплёнки фитопатогенов играют большую роль во взаимодействии с растениями. Harding и соавт. (2010) выяснили, что возбудитель серой гнили *Botrytis cinerea* формирует на стеблях томата трехмерную сеть гиф, окруженную внеклеточным матриксом (Biofilm morphologies ..., 2010). Abdel-Aziz соавторами (2019) было показано, что *Aspergillus niger* способен формировать биоплёнки на поверхности луковиц *Allium cepa*, что, предположительно, имеет значение в инфекционном процессе (Abdel-Aziz et al., 2019). Также Peiqian с соавторами было выяснено, что возбудитель фузариозного увядания огурца *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* на различных поверхностях образует сложную гетерогенную структуру, состоящую из гиф и внеклеточного матрикса (Biofilm formation ..., 2014).

Стоит отметить, что для биоплёнок как бактерий, так и грибов, характерна саморегуляция, которая обеспечивается межклеточной коммуникацией посредством химических сигналов (мессенджеров). Так, возбудитель голландской болезни вязов *Ophiostoma ulmi* секретирует химические сигналы, подавляющие формирование гиф (Inoculum size effect ..., 2004). Также возбудитель антракноза *Colletotrichum gloeosporioides* способен выделять соединения, подавляющие формирование мицелия (Microbial chemical signaling ..., 2012). Кроме того, возбудитель пузырчатой головни кукурузы *Ustilago maydis* секретирует внеклеточные соединения, регулирующие диморфизм прорастания спор (Jones, Bennett, 2011).

Таким образом, биоплёнообразование является, с одной стороны, является процессом, обеспечивающим существование грибов меняющихся

условиях окружающей среды, а с другой - важным фактором инфекционного процесса у грибных патогенов (Plant-associated fungal ..., 2020).

1.1.2. Факторы патогенности грибов

Стоит заметить, в процессе жизнедеятельности грибы сталкиваются не только с неблагоприятными факторами окружающей среды, но также с другими микроорганизмами, конкурирующими за экологическую нишу. Явление «антагонизма», впервые описанное Л. Пастером в 1877 году, служит основой жизнедеятельности микроорганизмов, в том числе грибов. Антагонистические свойства микроорганизмов обеспечиваются наличием в арсенале широкого спектра биологически активных соединений. Среди них можно обнаружить как соединения, обладающие непосредственно антимикробным действием (антибиотики, микотоксины), так и соединения, обеспечивающие конкурентные преимущества в борьбе за экологическую нишу (органические кислоты, гидролитические ферменты, сидерофоры) (Plant Pathogenic Fungi, 2017).

В их число входят также соединения, непосредственно участвующие в инфекционном процессе, например, микотоксины, органические кислоты и гидролитические ферменты, расщепляющие компоненты клеточной стенки растений (Kumar et al., 2024).

1.1.3. Микотоксины

Микотоксины являются низкомолекулярными вторичными метаболитами грибов, важным фактором патогенности фитопатогенных грибов. Микотоксины обладают выраженной токсичностью для клеток как растений, так и человека и животных. Наиболее важными токсигенными грибами являются представители родов *Aspergillus* и *Fusarium*.

К токсигенным видам рода *Aspergillus* традиционно причисляют *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius* и *A. welwitschiae*. К микотоксинам, продуцируемым токсигенными грибами рода *Aspergillus*, относят афлатоксины (B1, B2, G1, G2), охратоксин А, патулин, стеригматоцистин, цитринин и веррукулоген (Molecular diversity of ..., 2004).

Среди них наибольшее экономическое значение имеют афлатоксины и охратоксин А.

Афлатоксины представляют собой вторичные метаболиты *A. flavus* и *A. parasiticus*, относящиеся к классу поликетидов. Афлатоксины ингибируют биосинтез хлорофилла и каротеноидов. Также предположительно афлатоксины ингибируют ДНК-зависимый синтез РНК и, как следствие, биосинтез белка (Perrone, Gallo, 2017). Стоит подчеркнуть, что афлатоксины являются необходимым фактором, обеспечивающим колонизацию растительных субстратов. Zhang и соавт. было показано, что мутантный штамм *A. flavus*, дефектный по гену *AflSkn7*, ответственный в том числе за биосинтез афлатоксина В1, неспособен поражать семена кукурузы (The Stress Response ..., 2016).

Афлатоксины, прежде всего афлатоксин В1, являются соединениями с ярко выраженной гепатотоксичностью. Механизм действия предположительно связан с формированием в печени токсичного производного афлатоксин В1-8,9-эпоксида, повреждающего ДНК (Aflatoxins: Occurrence ..., 2024).

Охратоксин А представляет собой вторичный метаболит *A. ochraceus*, *A. carbonarius* и *A. niger*, относящийся к классу поликетидов (Molecular diversity of ..., 2004). Охратоксин А ингибирует биосинтез белка, нарушает процессы фотосинтеза и окислительного фосфорилирования, а также работу метаболических путей, связанных с фенилаланином (Perrone, Gallo, 2017). Как и в случае с афлатоксинами, охратоксин А обеспечивает колонизацию растительных субстратов, что можно оценить на примере мутантов, дефектных по соответствующим биосинтетическим путям. Так, Maog и соавторами (2020) было продемонстрировано, что у мутантного штамма *A. carbonarius*, дефектного по гену *AclaeA*, регулирующим в том числе биосинтез охратоксина А, значительно снижена способность колонизировать плоды *Prunus persica* (Host Factors Modulating ..., 2020).

Микотоксин обладает ярко выраженной цитотоксичностью и нефротоксичностью, который, предположительно, связан с ингибированием синтеза РНК, и, как следствие, биосинтеза белка (Dirheimer, Creppy, 1991)

Фитопатогенные грибы рода *Fusarium*, как правило, являются токсигенными, поскольку продукция микотоксинов является одним из ключевых факторов инфекционного процесса. К микотоксинам, продуцируемым токсигенными видами рода *Fusarium*, относят трихотецены, фумонизины и зеараленон (Почвенные грибы ..., 2021). Наибольшее экономическое значение имеют трихотеценовые микотоксины и зеараленон.

Трихотеценовые микотоксины представляют собой сесквитерпеновые соединения. Известно более 200 соединений трихотеценовых микотоксинов, которые по химической структуре объединены в 4 группы: А, В, С и D. Наиболее важными являются трихотецены группы А (Т-2 токсин, НТ-2 токсин, диацетоксисцирпенол) и В (деоксиниваленол, ниваленол, 3- и 15-ацетилдеоксиниваленол). К важным продуцентам трихотеценовых микотоксинов относят *F. acuminatum*, *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *F. culmorum*, *F. graminearum* и *F. pseudograminearum* (Munkvold, 2017).

Трихотеценовые микотоксины обладают крайне выраженной фитотоксичностью, что выражается в некрозе и хлорозе растительных тканей, а также снижении роста или гибели растений (Perincherry et al., 2019). Аналогично микотоксинам грибов рода *Aspergillus*, трихотеценовые микотоксины являются важным фактором патогенеза. Так, Cuzick и соавторами (2008) было показано, что мутантный штамм *F. graminearum*, дефектный по гену Tri5, ответственного за биосинтез деоксиниваленола, вызывает меньше внешних признаков поражений *Arabidopsis thaliana*, чем дикий тип (Cuzick et al., 2008). И напротив, Gardiner и соавторами (2009) на примере *F. graminearum* продемонстрировано, что симптомы фузариоза колоса в случае с мутантом *F. graminearum*, обладающим повышенной экспрессией гена Tri6, подавляющего биосинтез деоксиниваленола,

оказываются куда более выраженными, по сравнению с диким типом (Gardiner et al., 2009)

Трихотеценовые микотоксины являются самой частой причиной микотоксикозов (Munkvold, 2017; Левитин, Джавахия, 2020). Механизм действия трихотеценовых микотоксинов связан с ингибированием биосинтеза белка. В силу выраженной цитотоксичности могут провоцировать как симптомы острого токсикоза с выраженной клинической картиной, так и хронический токсикоз скрытого течения (Lainhart, 2018).

Фумонизины представляют собой вторичные метаболиты *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. sacchari*, *F. subglutinans* и *F. fujikuroi*, относящиеся к классу поликетидов (Perincherry et al., 2019; Артамонов, 2023). Известно 28 фумонизинов, которые по химической структуре объединены на 4 группы: А, В, С и Р. Фумонизины В1, В2 и В3 являются наиболее изученными представителями этой группы. Механизм действия связан с нарушением биосинтеза сфинголипидов, регуляторов клеточного сигнала и клеточного распознавания. Фумонизин В1 обладает выраженной фитотоксичностью, вызывает некроз, хлороз растительных тканей, скручивание листьев, дефолиацию, задержку роста или гибель растения (Perincherry et al., 2019). Фумонизины, ровно как и трихотецены, представляют собой необходимый для патогенеза фактор токсигенных грибов рода *Fusarium*. Показано, что при заражении кукурузы мутантным штаммом *F. verticillioides* с делецией кластера, ответственного за биосинтез фумонизинов (FvZBD1), поражение листьев оказывается в разы меньше, по сравнению с диким типом (Transformation-mediated complementation ..., 2008).

Зеараленон, или F2-токсин, представляет собой вторичный метаболит *F. graminearum*, *F. culmorum* и *F. verticillioides*, относящийся к поликетидов. Зеараленон не обладает выраженной фитотоксичностью, не влияет на прорастание семян, развитие корневой системы, ровно как и надземной части растения (Perincherry et al., 2019).

Токсичность зеараленона обусловлена способностью при попадании в кровь связываться с эстрогенными рецепторами и вызывать нарушения работы репродуктивной системы (Lainhart, 2018; Артамонов, 2023). Зеараленон представляет угрозу для сельскохозяйственных животных, поскольку даже в небольших дозах способен отрицательно влиять на их плодотворность.

Стоит также отметить экологическую роль микотоксинов. Несмотря на то, что микотоксины обладают антимикробной активностью, их взаимодействие с другими микроорганизмами оказывается куда сложнее.

Микотоксины фитопатогенных грибов также позволяют им успешно конкурировать за экологическую нишу с другими, в том числе фитопатогенными микроорганизмами. Так, *Fusarium fujikuroi* в ответ на колонизацию почвы фитопатогенной бактерией *Ralstonia solanacearum* начинает продуцировать микотоксин беаверицин и нафтохиноновый пигмент бикаверин, синергетическое действие которых оказывает сильный антимикробный эффект (Conserved Responses ..., 2018). Было также продемонстрировано, что эндофитный штамм *Fusarium vericilloides*, продуцирующий фузариевую кислоту, снижал симптомы пузырчатой головни, вызванной *Ustilago maydis* (Lee et al., 2009). Было также продемонстрировано, что конкуренция в условиях почвы идет в том числе между токсигенными грибами. Так, Falade с соавторами (2016) выяснено, что *Fusarium oxysporum* способен снижать продукцию афлатоксинов *Aspergillus flavus* (In vitro experimental environments ..., 2016).

Также показано, что микотоксины могут играть роль внеклеточных мессенджеров. Показано, что некоторые микотоксины (зеараленон, фуманизин, фузариевая кислота) в низких концентрациях подавляют продукцию молекул «чувства кворума» у бактерий (Bacon et al., 2017; Fusaric acid and ..., 2017).

1.1.4. Внеклеточные ферменты

Ферменты, расщепляющие клеточные стенки растений (Plant Cell Wall Degrading Enzymes, PCDE) играют важную роль в жизнедеятельности грибов, обеспечивая разрушение растительных тканей с последующим поступлением питательных веществ. PCDE ферменты обеспечивают не только деструкцию растительных тканей, но также антагонистические свойства грибов, позволяющие успешно конкурировать с другими микроорганизмами за экологическую нишу (Fungal plant cell wall-degrading ..., 2013). Вместе с тем, PCDE ферменты, наряду с микотоксинами, являются необходимым фактором патогенности фитопатогенных грибов. Они обеспечивают проникновение фитопатогенных грибов внутрь растительных тканей путем лизиса компонентов клеточной стенки, полисахаридов и белков (Kubicek et al., 2014).

Клеточная стенка растений состоит преимущественно из полисахаридов, в частности, целлюлоз, гемицеллюлоз, пектина, лигнина, а также белков (Heredia et al., 1995). В процессе коэволюции грибы, в том числе фитопатогенные, приспособились разрушать все вышеперечисленные компоненты клеточной стенки.

Классификация PCDE ферментов основана на субстратной специфичности. Выделяют целлюлолитические, гемицеллюлолитические, лигнолитические, пектинолитические, протеолитические ферменты (The contribution of cell wall ..., 2002).

Целлюлоза представляет из себя полисахарид, состоящий из остатков бета-глюкозы, соединенных гликозидными связями (Fungal cellulases, 2015). Традиционный взгляд на гидролиз целлюлозы подразумевает работу двух типов целлюлаз (экзо- и эндодействия) с последующим расщеплением бета-глюкозидазами, которые гидролизуют целлодекстриновые олигомеры на глюкозу (Kubicek et al., 2014). Разделение целлюлолитических ферментов на эндо- и экзо-целлюлазы является условным, поскольку их субстратная специфичность может перекрываться.

Под термином «гемицеллюлозы» понимают полисахариды, в состав которых входят ксилоглюканы, ксиланы и галактоманнаны (Fungal cellulases, 2015). В расщеплении гемицеллюлаз, в зависимости от структуры полисахарида, могут участвовать эндо-бета-1,4-глюканазы, ксилоглюканазы, бета-маннаназы и бета-маннозидазы (Kubicek et al., 2014).

Пектин, наряду с целлюлазами и гемицеллюлазами, является одним из основных полисахаридов клеточной стенки растений. Пектин представляет собой гетерополисахарид, частично или полностью состоящий из остатков галактуроновой кислоты, соединенных между собой альфа-1,4-гликозидными связями (Jayani, Saxena, 2005). В силу особенностей химической структуры, гликозидные связи внутри молекулы могут быть расщеплены как путем гидролиза полигалактуроназами (экзо- и эндодействия), так и негидролитической реакцией (бета-элиминированием) с помощью пектин и пектат лиаз (Fungal pectinases: and insight ..., 2023).

Несмотря на то, что белки составляют в относительно небольшую долю (до 10%) в общем содержании компонентов клеточной стенки, они играют большую роль в функционировании растительной клетки. К ним можно отнести структурные белки, обеспечивающие механические свойства клеточной стенки, белки, участвующие в морфогенезе клеточной стенки, а также гликопротены, ответственные за распознавание и передачу сигналов (Jamet, Dunand, 2020). Классификация протеолитических ферментов основана на их гидролитических свойствах (экзо-, эндодействие), оптимуму pH (кислые, щелочные протеазы) или строению активного центра (сериновые, треониновые, цистеиновые, аспартатные, глутаминовые, аспарагиновые и металлопротеазы) (Павлюкова и соавт., 1998). Большинство грибных протеаз представляют из себя сериновые протеазы, которые по субстратной специфичности разделяют на трипсин-подобные (TLP) и субтилизин-подобные (SLP) протеазы (Proteases from phytopathogenic fungi ..., 2016).

Как было указано выше, внеклеточные ферменты, наряду с микотоксинами, являются важным фактором патогенности фитопатогенных

грибов. Стоит заметить, что некоторые внеклеточные ферменты принимают участие в обеспечении жизнедеятельности, тогда как другие необходимы для инфекционного процесса. Известно, что мутантные штаммы по биосинтезу некоторых PCWDE ферментов частично или полностью теряют способность инфицировать растения. Например, удаление у возбудителя спорыньи *S. purpurea* двух генов, ответственных за биосинтез полигалактуроназы (cprpg1 и cprpg2), полностью лишает ее способности инфицировать рожь (Polygalacturonase is a pathogenicity ..., 2002). Также мутации в гене ксиланазы Xyn11A у возбудителя серой гнили *Botrytis cinerea* приводят к значительному снижению способности заражать виноград и томат (Brito et al., 2006). Также, роль внеклеточных протеаз как фактора, необходимого для инфекционного процесса, была продемонстрирована с помощью нокаута соответствующих биосинтетических генов на примере *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Verticillium dahliae*, *Plasmodiophora brassicae*, *Nigrospora oryzae* и *Ustilago maydis* (Proteases from phytopathogenic fungi ..., 2016).

1.2. Химическая защита растений от грибных фитопатогенов

Борьба с фитопатогенами традиционно включает в себя использование химических средств защиты растений (ХСЗР). ХСЗР зарекомендовали себя как надежный и эффективный инструмент в предотвращении болезней растений. Впрочем, борьба с фитопатогенами ведет к увеличению пестицидной нагрузки на агросистемы. По данным FAO, в 2021 году было использовано 3,54 тонн действующих соединений пестицидов что на 11% больше, чем в 2011 году и вдвое больше, чем в 1990. Стоит заметить, что фунгициды и бактерициды уступают лишь гербицидам, и составляют 22% от общего объема всех действующих соединений пестицидов (FAO's Plant Production ..., 2022).

К наиболее распространенным классам фунгицидов относятся триазолы, стробилурины, бензимидазолы, дитиокарбаматы, морфолины и фенилпирролы (Modern Fungicides: Mechanisms ..., 2019). Среди основных механизмов действия фунгицидов можно выделить ингибирование процессов

биосинтеза эргостерола, ключевого компонента плазматической мембраны, и блокирование системы электрон-транспортной цепи на уровне цитохромов *b* и *c*₁ (Fungicide: Modes ..., 2011).

1.2.1. Резистентность к фунгицидам

Как показывает практика, повсеместное использование химических фунгицидов ведет к возникновению и распространению резистентности у фитопатогенных грибов (Hollomon, 2015). В частности, устойчивость к триазолам, наиболее распространенному классу фунгицидов, зафиксирована у 30 видов фитопатогенов в более чем 60 странах мира (Azole fungicides ..., 2015; Jørgensen, Heick, 2021). Также накопились сведения о возникновении резистентности к соединениям другого распространенного класса фунгицидов, стробилуринам. Резистентность к стробилуринам была обнаружена у ряда фитопатогенов, в том числе - *Fusarium* spp., *Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Puccinia horiana*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Phaeosphaeria nodorum* и *Botrytis cinerea* (Hahn, 2014; Fungicide Resistance: Progress ..., 2023).

Риск возникновения резистентности к триазолам и стробилуринам оценивается комитетом по противодействию резистентности к фунгицидам (Fungicide Resistance Action Committee, FRAC) как средний и высокий, соответственно (Hermann, Stenzel, 2019).

Механизмы резистентности к фунгицидам включают в себя возникновение мутации в белке-мишени, повышенную экспрессию гена, кодирующего мишень, повышенную экспрессию АТФ-связывающих кассет (ABC) или MFS-транспортеров, а также эпигенетические изменения, например, модификации хроматина или гистонов, изменяющие экспрессию генов, прямо или косвенно повышающих адаптацию фитопатогена к фунгициду (Hahn, 2014; Fungicide Resistance ..., 2023).

Стоит отметить, что, использование соединений одного и того же класса как в сельском хозяйстве, так и в медицине, как в случае с триазолами, может приводить к риску возникновения резистентности к противогрибковым

препаратам у патогенов человека и животных (Fungicide effects on human..., 2021).

Считается, что низкие концентраций фунгицидов, присутствующие в почве, могут способствовать отбору резистентных форм. Так, Harish с соавторами (2022) показано, что предварительная обработка конидий субингибиторными концентрациями триазолов стимулирует рост культур *Aspergillus fumigatus* в условиях низких концентраций данных фунгицидов (Triazole Priming as ..., 2022). Влияние низких концентраций фунгицидов может приводить к генетической нестабильности фитопатогенов, в частности, возникновению резистентности к ним (Amaradasa, Everhart, 2016; Effects of Agricultural Fungicide ..., 2020).

В последние несколько лет накапливаются случаи устойчивости клинических штаммов возбудителя аспергиллеза *A. fumigatus* к триазолам, используемым как в сельском хозяйстве, так и в медицине (Mechanisms of triazole..., 2020; Exposure to the agricultural ..., 2021).

1.2.2. Токсичность фунгицидов для нецелевых организмов

Стоит также отметить, что нерациональное использование химических может приводить как к нарушению функционирования биоценозов, так и к неблагоприятным последствиям для здоровья человека (Agriculture Development ..., 2021).

Несмотря на то, что химические фунгициды считаются соединениями с низкой фитотоксичностью, имеются данные о том, что они могут влиять на физиологию растений. Побежимова с соавторами (2019) отмечается, что на клеточном уровне обработка триазолами приводит к подавлению биосинтеза гиберрелинов, нарушении процессов окислительного фосфорилирования, увеличении содержания абсциссовой кислоты, полиненасыщенных жирных кислот, усилении биосинтеза дегидринов (Физиологические эффекты ..., 2019). Среди наиболее значимых изменений отмечается торможение роста, повышение устойчивости к неблагоприятным условиям среды, а также увеличение продуктивности растений.

Влияние стробилуринов на физиологию растений также остается неоднозначным. С одной стороны, показано, что стробилурины могут улучшать водный обмен растений, а также повышать адаптацию растений в условиях засухи (Grossman et al., 1999). С другой, отмечается, что стробилурины могут ингибировать процессы окислительного фосфорилирования в растительных клетках (Pedersen, 2016)

Кроме того, фунгициды обладают крайне высокой подвижностью в окружающей среде. Они могут быть обнаружены не только в почве, но также в водоемах. Токсичность фунгицидов имеет место не только в отношении грибов, но также и других, нецелевых организмов. Известно, что триазолы могут оказывать как острое, так и хроническое токсическое действие на позвоночных и беспозвоночных животных, обитающих в почве и водоемах (A review of the toxicity..., 2022). Стробилурины также являются токсичными для обитателей почв и водоемов соединениями. Стробилурины вызывают как физиолого-биохимические, так и морфологические изменения у беспозвоночных, рыб, амфибий и млекопитающих (Ecotoxicology of strobilurin ..., 2020).

Стоит также отметить, что нерациональное использование химических фунгицидов может отражаться на их содержании в пищевой продукции. Поскольку фунгициды являются токсичными соединениями, их остаточные количества в продуктах питания представляют риск для здоровья человека (Chemical Pesticides ..., 2016).

Известно, что триазолы обладают сродством к CYP ферментам млекопитающим. В частности, фунгициды триазольной группы способны ингибировать ферменты стероидогенного пути и нарушать биосинтез стероидных гормонов. Кроме того, триазолы могут быть антагонистами андрогеновых рецепторов, таким образом усиливая нарушения репродуктивной системы (Draskau, Svingen, 2022).

Несмотря на то, что о токсическом действии стробилуринов известно куда меньше, накопились сведения о том, что данные соединения могут

вызывать нарушения репродуктивной, сердечной и иммунной систем (Toxicological impact of ..., 2024).

1.3. Биологическая защита растений от грибных фитопатогенов

В последние десятилетия биологические средства защиты растений (БСЗР) стали альтернативой ХСЗР. Они представляют собой микроорганизмы и/или их вторичные метаболиты, обладающие активностью в отношении широкого спектра фитопатогенов (Structure and Catalytic ..., 2019; Major Biological Control ..., 2022).

Все биологические средства защиты можно разделить на бактериальные и грибные. Среди бактерий выделяют представителей рода *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* и *Streptomyces* (Bacterial and Fungal Biocontrol..., 2023). Наиболее эффективными в борьбе с фитопатогенами принято считать бактерии родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. К грибам, зарекомендовавшим себя в качестве агентов биоконтроля фитопатогенов, относят грибы рода *Trichoderma*, *Aspergillus* и *Penicillium* (Biological control using..., 2018). Грибы рода *Trichoderma* наиболее хорошо себя зарекомендовали в борьбе с фитопатогенами.

К полезным свойствам БСЗР традиционно относят ростостимулирующую активность, усиление устойчивости растений к неблагоприятным факторам окружающей среды, подавление роста фитопатогенов и активацию системного иммунного ответа растений (Advances and Perspectives ..., 2022).

Наибольший интерес БСЗР привлекают в свете биоконтроля фитопатогенов. Среди механизмов, ответственных за реализацию защиты растений от фитопатогенов, выделяют прямой и непрямой антагонизм. Прямой антагонизм заключается в продукции антимикробных соединений и гидролитических ферментов, расщепляющих клетки микроорганизмов, а также секреции низкомолекулярных соединений, препятствующих росту

других микроорганизмов (органические кислоты, аммоний, цианид водорода, углекислый газ). Непрямой антагонизм заключается в конкуренции с фитопатогенными микроорганизмами за экологическую нишу, как физическим вытеснением, так и созданием условий, препятствующих их росту (продукции сидерофоров, усиленному поглощению корневого экссудата). Также к непрямому антагонизму относят активацию иммунитета растений-хозяев путем предоставления патоген-ассоциированных молекулярных паттернов и продукции фитогормонов (Pal, Gardener, 2006).

1.3.1. Роль PGPR-бактерии в биологическом контроле фитопатогенов

Ризосфера представляет собой небольшой (2-3 мм) слой почвы, прилегающий к корням растения (Kuzuakov, Razavi, 2019). Ризосферу можно рассматривать как центр формирования микробных сообществ. Его существование обуславливается выделением в процессе жизнедеятельности растений экссудата, состоящего из углеводов, белков, аминокислот, органических кислот, жирных кислот и факторов роста (Root exudates ..., 2020).

В 1 гр ризосферной почвы содержится 10^9 - 10^{11} клеток микроорганизмов (Berendsen et al., 2012). К их числу относятся бактерии, археи, грибы, оомицеты, протисты и вирусы (The rhizosphere ..., 2009). Важно заметить, что среди них могут быть не только полезные для растения микроорганизмы, но и патогенные. Патогенные микроорганизмы негативно влияют на ростовые процессы растений, что ведет к снижению урожая (Dliamini et al., 2022).

В борьбе с фитопатогенами нашли применение ризосферные бактерии, способствующие росту растений (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR). PGPR-бактерии, с одной стороны, могут колонизировать корни растений и стимулировать их рост, а с другой – способны продуцировать антимикробные соединения, препятствующие росту фитопатогенных микроорганизмов (Bhattacharyya, Jha, 2012).

Изучение микробных взаимодействий на уровне ризосферы привело к пониманию необходимости использования PGPR-бактерии в качестве биологического средства защиты растений (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria ..., 2018).

1.3.2. Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* как потенциальные агенты биоконтроля

Представители рода *Pseudomonas* являются одними из самых изученных PGPR-бактерий. Несмотря на то, что род *Pseudomonas* включает в себя около 200 видов, применение в защите растений нашли лишь представители группы *P. fluorescence* (Murillo et al., 2015; Kohlstedt, Wittmann, 2019).

Внутри данной группы выделяют два кластера, различающихся по активности: кластер CPC (*P. chloraphis*, *P. protegens*, *P. corrugata*), обладающих ярко выраженными свойствами биоконтрольных микроорганизмов, и кластер FMJK (*P. fluorescens*, *P. mandelii*, *P. jensenii*, *P. koreensis*), для которых характерны преимущественно ростостимулирующие свойства (Fluorescent *Pseudomonas* Strains ..., 2016).

Среди прочих PGPR-бактерии представители рода *Pseudomonas* выделяются рядом полезных свойств: способностью колонизировать ризосферу растений, активировать иммунный ответ у растений, конкурировать с другими микроорганизмами за питательные вещества и секретировать в окружающую среду широкий спектр соединений с антимикробной активностью (*Pseudomonas* Strains that ..., 2015).

1.3.3. Вторичные метаболиты ризосферных *Pseudomonas* spp.

Способность представителей рода *Pseudomonas* защищать растения от фитопатогенов обуславливают вторичные метаболиты – соединения, не принимающие непосредственного участия в процессах роста и развития микроорганизма (Maplestone et al., 1992). Вместе с тем, вторичные метаболиты играют важную роль в конкуренции за экологическую нишу (O'Brien, Wright, 2011).

Среди вторичных метаболитов ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* можно обнаружить 2,4-диацетилфлороглюцин, цианистый водород, феназины, пирролнитрин, пиолотеорин, сидерофоры, рамнолипиды и циклические липопептиды (Importance of 2,4-DAPG ..., 2004). Для некоторых представителей ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* также характерно наличие штамм-зависимых вторичных метаболитов, которые были получены вследствие горизонтального переноса биосинтетических генов. К ним относятся ризоксины, промисалин, сессилин и L-фураномицин (Höfte et al., 2021).

1.3.4. 2,4-диацетилфлороглюцин - ключевой антимикробный метаболит *Pseudomonas* spp.

Среди прочих метаболитов стоит выделить 2,4-диацетилфлороглюцин (2,4-ДАФГ), обладающий широким спектром биологической активности, в том числе противобактериальной, противогрибковой, противовирусной, протипротивогельминтной, антипротозойной, противоопухолевой и антиамилоидной активностями (PhlD-based genetic diversity ..., 2006).

Вместе с тем, 2,4-ДАФГ является крайне важным метаболитом ризосферных бактерий рода *Pseudomonas* в аспекте защиты растений от фитопатогенов. Показано, что мутанты, дефектные по генам биосинтеза 2,4-ДАФГ, оказываются бесполезны в биоконтроле фитопатогенов, и напротив, сверхпродуценты 2,4-ДАФГ обеспечивают наилучшую защиту от возбудителей заболеваний растений, по сравнению с дикими штаммами (Importance of 2,4-DAPG ..., 2004; PhlF– mutant of ..., 2014).

2,4-ДАФГ представляет собой низкомолекулярное ароматическое соединение с молекулярной массой в 210,18 г/моль и брутто-формулой $C_{10}H_{10}O_5$. В силу особенностей химической структуры, в частности, наличия одновременно с тремя гидроксильными группами двух ацетильных групп 2,4-ДАФГ обладает амфифильными свойствами, позволяющими соединению проникать через билипидные слои плазматических мембран клеток (Novel synthesized ..., 2016).

Кроме того, наличие в структуре 2,4-ДАФГ нескольких гидроксильных групп обуславливает его антиоксидантные свойства. Prasetyo с соавторами (2024) выяснено, что радикал-связывающая активность 2,4-ДАФГ оказывается в три раза выше, чем у другого распространенного антиоксиданта - аскорбиновой кислоты (Free radical scavenging ..., 2024).

В отличие от прочих противогрибковых метаболитов бактерий рода *Pseudomonas*, в частности, пирролнитрина и пиолотеорина, 2,4-ДАФГ не содержит в структуре атомов хлора, что обеспечивает относительную стабильность при воздействии солнечного света (Microbial Pyrrolnitrin ..., 2019).

Продemonстрировано, что 2,4-ДАФГ способен подавлять рост бактериальных фитопатогенов, в частности, *Erwinia* spp., *Xanthomonas* spp., *Ralstonia solanacearum*, *Clavibacter michiganensis*, *Pectobacterium caratovorum* (Ecological interaction of a biocontrol ..., 2006; Beneficial effects of ..., 2012; Velusamy et al., 2013; Bacterial-Derived Plant ..., 2020). 2,4-ДАФГ также проявляет активность в отношении грамположительных и грамотрицательных представителей нормальной и условно-патогенной микрофлоры человека и животных: *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (Kamei, Isnansetyo, 2003; Improved phloroglucinol production ..., 2011; Bacterial-Derived Plant ..., 2020)

Известно, что 2,4-ДАФГ активен в отношении оомицетов, зигомицетов, аскомицетов и базидиомицетов. Интерес к 2,4-ДАФГ как к потенциальному фунгициду отражается на объеме данных, посвященных его действию против фитопатогенов. Показано, что 2,4-ДАФГ способен подавлять рост и развитие *Phytophthora infestans*, *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria tenuissima*, *Septoria tritici*, *Rhizoctonia solani* и т.д. (Exploitation of gene(s) involved ..., 1992; Shanthi, Vittal, 2013; Fluorescent Pseudomonads ..., 2015; Partial purification ..., 2021). Вместе с тем, данные о противогрибковой активности 2,4-ДАФГ в отношении патогенов человека и животных

немногочисленны. Показано, что 2,4-ДАФГ подавляет рост грибов рода *Trichophyton* (Beneficial effects of ..., 2012).

Механизм действия в отношении бактериальных и грибных клеток различен. Известно, что 2,4-ДАФГ нарушает проницаемость мембран прокариот, что ведет к нарушению клеточного гомеостаза и, как следствие, гибели клеток (Mishra et al., 2022). На это также указывает и показатели минимальной ингибирующей концентрации, которые в случае с грамотрицательными бактериями выше, чем с грамположительными (Bacterial-Derived Plant ..., 2020).

Механизм действия 2,4-ДАФГ в отношении клеток грибов включает как прямые, так и косвенные эффекты. Прямой противогрибковый эффект 2,4-ДАФГ включает в себя разобщение окислительного фосфорилирования путем нарушения мембранного потенциала митохондрий (The bacterial secondary..., 2013). Вторичные эффекты действия 2,4-ДАФГ связаны с избыточной продукцией активных форм кислорода вследствие нарушения работы митохондрий (Kwak, Weller, 2013).

Важно подчеркнуть, что в литературе встречаются единичные случаи фитопатогенов резистентных к 2,4-ДАФГ. Schouten с соавторами (2008) обнаружили у *Botrytis cinerea*, возбудителя серой гнили, два независимых механизма устойчивости к 2,4-ДАФГ. Первый, не прямой, связан с увеличением эффлюкса 2,4-ДАФГ из клетки с помощью ABC транспортеров, тогда как прямой связан с разрушением соединения внутриклеточной лакказы BcLCC2 (Involvement of the ABC ..., 2008).

Вместе с тем, Schouten с соавторами (2004) на примере *Fusarium oxysporum* показано, что устойчивость к 2,4-ДАФГ не влияет на вирулентность грибных фитопатогенов. Статистически достоверных различий в продукции фузариевой кислоты между устойчивыми и чувствительными штаммами *F. oxysporum* обнаружено не было (Defense Responses of ..., 2004).

1.3.5. Биосинтез 2,4-ДАФГ и его регуляция

Флороглюцин и его производные, в том числе 2,4-ДАФГ, принадлежат к классу поликетидных соединений, биосинтез которых идет путем полимеризации ацетил-, малонил- и метилмалонил коэнзима А при участии ферментов поликетид синтаз (PKS) (Katsuyama, Ohnishi, 2012). Известно шесть структурных (phlA, phlC, phlB, phlD, phlE, and phlI) и три регуляторных (phlF, phlG, and phlH) PKS, участвующих в биосинтезе 2,4-ДАФГ (Biosynthesis and regulation ..., 2004).

Первый этап биосинтеза 2,4-ДАФГ катализируется PhlD, ответственным за конденсацию 3 молекул малонилацетила-КоА до флороглюцина (Biessy, Fillion, 2021). В ряде случаев, при конденсации 2 молекул малонилацетила-КоА происходит образование интермедиата моноацетилфлороглюцина (МАФГ). Стоит заметить, что PhlD является ключевым компонентом биосинтеза, поскольку дефектные мутанты оказываются неспособны продуцировать 2,4-ДАФГ (Differential response ..., 2018).

Второй этап биосинтеза 2,4-ДАФГ катализируется кластером PhlABC и заключается в ацетилировании флороглюцина (через МАФГ) до конечного продукта (Biessy, Fillion, 2021). Интересно, что субъединицы кластера PhlACB организованы в комплекс $Phl(A_2C_2)_2B_4$, где четыре субъединицы PhlB связывают два PhlA и два PhlC димера. Впрочем, за ацилтрансферазную активность, перенос ацильной группы на молекулу флороглюцина, ответственны только PhlC субъединицы (Structure and Catalytic ..., 2019).

Расщепление 2,4-ДАФГ до моноацетилфлороглюцина и ацетата происходит при участии цинк-зависимой гидролазы PhlG. Данный фермент строго специфичен к 2,4-ДАФГ, поскольку не может участвовать в деацетилировании других производных флороглюцина (Bottiglieri, Keel, 2006).

Биосинтез 2,4-ДАФГ регулируется на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. На транскрипционном уровне за регуляцию отвечают репрессоры, принадлежащие к семейству белков TetR, PhlF и PhlH (Autoinduction of 2,4-Diacetylphloroglucinol ..., 2000).

Семейство регуляторных белков семейства TetR включает в себя N-терминальный ДНК-связывающий конец и С-терминальный конец. Данные белки связываются с палиндромными последовательностями, локализованные в начале целевого гена и блокируют его экспрессию (Cuthbertson, Nodwell, 2013).

PhlF и PhlH регулируют биосинтез и разрушение 2,4-ДАФГ на различных стадиях роста микроорганизма. Так, PhlF является репрессором биосинтеза 2,4-ДАФГ на ранних стадиях роста культуры, тогда как PhlH-опосредованное ингибирование экспрессии PhlG на ранних стадиях роста является необходимым условием синтеза соединения (Regulation of production of the antifungal ..., 2000; Characterization of interactions between ..., 2002). 2,4-ДАФГ (и в меньшей степени МАФГ) также является фактором регуляции собственного биосинтеза, поскольку способен физически связываться с PhlH и разрывать его комплекс с ДНК (Biessy, Filion, 2021).

На посттранскрипционном уровне за регуляцию биосинтеза 2,4-ДАФГ отвечает сигнальный путь Gas/Rsm (Roles of the Gac-Rsm ..., 2013). Ключевым звеном является двухкомпонентная система GacA/GacS, состоящая из мембраносвязанной киназы GacS и внутриклеточного регулятора GacA. Двухкомпонентная система управляет сигнальным путем при участии малых некодирующих регуляторных РНК (RsmX/Y/Z) и трансляционных репрессоров (RsmA, RsmE). На работу двухкомпонентной системы GacS/GacA влияют как плотность бактериальной популяции, так и доступность питательных веществ (Takeuchi et al., 2012).

Важно заметить, что спонтанные мутации, возникающие в генах *gacA* и *gacS*, приводят к тому, что соответствующие штаммы оказываются бесполезны в биоконтроле фитопатогенов (Characterization of spontaneous ..., 2001; Survival of GacS/GacA mutants ..., 2002).

Помимо 2,4-ДАФГ, ризосферные бактерии рода *Pseudomonas* способны продуцировать и другой метаболит с антимикробными свойствами, пиолитеорин. Однако, между продукцией 2,4-ДАФГ и пиолитеорина

обнаружена отрицательная корреляция. Выяснено, что 2,4-ДАФГ и флороглюцин подавляют экспрессию генов, ответственных за биосинтез пиолитеорина. В свою очередь, пиолитеорин является репрессором PhlA, ответственного за конечный этап биосинтеза 2,4-ДАФГ (Dubuis, Naas, 2007).

1.3.6. Роль 2,4-ДАФГ в защите растений от бактерий, грибов и нематод

Как было указано выше, 2,4-ДАФГ способен подавлять рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Как было указано ранее, бактерий, подобно микромицетам, существуют в окружающей среде преимущественно в виде биоплёнок, сложных структур, состоящих из клеток и внеклеточного матрикса. Julian с соавторами (2020) было показано, что 2,4-ДАФГ снижает метаболическую активность грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*) бактерий (Bacterial-Derived Plant ..., 2020).

Поскольку взаимоотношения ризосферных бактерий *Pseudomonas* и фитопатогенных грибов являются антагонистическими, их коммуникация на уровне вторичных метаболитов имеет важное значение в аспекте защиты растений. Продемонстрировано, что фузариевая кислота, микотоксин фитопатогенных грибов рода *Fusarium*, снижает экспрессию гена биосинтеза PhlA, что также находит отражение в продукции 2,4-ДАФГ у *P. fluorescens* (Fusaric acid-producing ..., 2002).

Говоря о других микроорганизмах, стоит сказать, что 2,4-ДАФГ защищает от протистов, в том числе – хищных амёб (*Acanthamoeba castellanii*), инфузорий (*Centropogon steinii*) и флагеллят (*Neobodo designis*), тем самым обеспечивая преимущество ризосферным бактериям рода *Pseudomonas* (Secondary metabolites help ..., 2006; Müller et al., 2013).

Важно подчеркнуть, что опасность для растений исходит не только со стороны фитопатогенных бактерий и грибов. Немалую роль в поражении растений играют и нематоды, которые не только механически повреждают корни растений, но также влияют на почвенный микробиом: как путем

поедания полезных ризобактерий, так и переноса в ризосферу фитопатогенных микроорганизмов. Продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ также обладает активностью как в отношении фитопатогенных нематод (*Globodera rostochiensis*, *Heterodera glycines*, *Meloidogyne incognita*, *Xiphinema americanum*), так и хищных нематод (*Caenorhabditis elegans*, *Metarhabditis rainai*) (Toxicity of 2,4-diacetylphloroglucinol ..., 2009).

1.3.7. Роль 2,4-ДАФГ в коммуникации с растениями, в т.ч. активации иммунитета

Стоит заметить, что роль 2,4-ДАФГ не ограничивается антагонистическими отношениями с бактериальными и грибными фитопатогенами. 2,4-ДАФГ оказывает разнонаправленное действие на физиологию растений.

В ризосфере 2,4-ДАФГ усиливает концентрацию аминокислот в корневом экссудате пшеницы, кукурузы и люцерны, что, предположительно, связано с влиянием на процессы поглощения питательных веществ корнями (Microbial products trigger ..., 2004). Таким образом, продуценты 2,4-ДАФГ получают преимущество перед другими PGPR-бактериями в конкуренции за питательные вещества.

Кроме того, 2,4-ДАФГ в низких концентрациях (5-20 мкМ), как растительные гормоны ауксины, способен менять архитектуру корней растения, в частности - подавлять рост первичного корня и усиливать ветвление вторичных (2,4-diacetylphloroglucinol alters plant ..., 2008). Вместе с тем, высокие концентрации (<50 мкМ) 2,4-ДАФГ оказывают фитотоксический эффект, что находит отражение как на снижении прорастания семян, так и на некрозе корней растений (2,4-diacetylphloroglucinol alters plant ..., 2008; Factors impacting..., 2012). Влияние 2,4-ДАФГ на рост вторичных корней, повышающее площадь поверхности корневой системы, как и в случае с изменением состава экссудата, создает конкурентное преимущество для продуцентов 2,4-ДАФГ.

Впрочем, содержание 2,4-ДАФГ в почве ризосферы, по некоторым оценкам, является не высоким. Так, Bonsall с соавторами (1997) отмечено, что при прямом выделении 2,4-ДАФГ из ризосферы его концентрация составляет около 2 мкг/г почвы (Bonsall et al., 1997).

Взаимодействие 2,4-ДАФГ с растениями, однако, не заканчивается на корневой системе. Известно, что 2,4-ДАФГ влияет на иммунитет растений, в частности - активирует индуцированную системную устойчивость (Induced Systemic Resistance, ISR). Chae с соавторами (2020) показано, что 2,4-ДАФГ активирует ISR иммунитет через жасмоновая кислота/этилен-зависимый сигнальный путь (Investigating the Induced ..., 2020). В частности, с соавторами (2012) показано, что предварительная обработка *Arabidopsis thaliana* 2,4-ДАФГ усиливает резистентность растения к бактериальному фитопатогену *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Induced systemic resistance ..., 2012).

Вместе с тем, метаболиты растений также оказывают влияние на физиологию ризосферных *Pseudomonas*. Так, индол-3-уксусная кислота, фитогормон из группы ауксинов, стимулирует, а салицилаты, органические кислоты растений, подавляют биосинтез 2,4-ДАФГ (Characterization of interactions between ..., 2002; Dubuis et al., 2007).

1.3.8. Роль 2,4-ДАФГ в коммуникации с микроорганизмами

Влияние 2,4-ДАФГ на механизмы межклеточной коммуникации бактерий и грибов мало изучено. Вместе с тем, 2,4-ДАФГ, предположительно, является сигнальной молекулой межклеточной коммуникации, поскольку способен нарушать процессы, связанные с «чувством кворума» у бактерий (Bacterial-Derived Plant ..., 2020).

Если говорить о взаимодействии *Pseudomonas* spp. с другими PGPR-бактериями, то известно, что ризосфере 2,4-ДАФГ помогает азотфиксирующим бактериям *Azospirillum* spp. проникать в ткани корня, что с одной стороны усиливает образование клубней, а с другой - оказывает ростостимулирующий эффект путем изменения характера корневой экссудации (The *Pseudomonas* secondary metabolite ..., 2011).

Коммуникация 2,4-ДАФГ с бактериями, однако, не ограничивается лишь PGPR-бактериями. Известно, что 2,4-ДАФГ является аутоиндуктором собственного биосинтетического пути. Это создает конкурентное преимущество продуцентам 2,4-ДАФГ перед прочими микроорганизмами. Работы последних лет указывают на то, что гены биосинтеза 2,4-ДАФГ встречаются не только у бактерий рода *Pseudomonas*. Биосинтетические гены 2,4-ДАФГ были получены некоторыми бактериями, в частности, бактериями рода *Chromobacterium* и *Lysobacter*, путем горизонтального переноса (The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol ..., 2008; Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol ..., 2023).

Особенности взаимодействия 2,4-ДАФГ с биоконтрольными грибами изучены на примере *Trichoderma atroviride*. Так, Lutz с соавторами (2004) показано, что с одной стороны, 2,4-ДАФГ усиливает экспрессию гена хитиназы у *T. atroviride*, с другой – вторичные метаболиты *T. atroviride* стимулируют гены биосинтеза 2,4-ДАФГ (Signaling between bacterial ..., 2004).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Штаммы микроорганизмов

В качестве продуцента 2,4-ДАФГ использовали *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.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Культивирование микроорганизмов

Штамм-продуцент *P. protegens* CV3 культивировали жидкой питательной среде LB (мясной пептон - 10 г/л, NaCl - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л) при 27°C в течение суток. Тест-штамм *C. albicans* культивировали на жидкой питательной среде Сабуро (глюкоза 40 г/л, мясной пептон 10 г/л, pH 5,7±0,2) при 28°C в течение 16-18 часов. По истечению времени культуральную жидкость центрифугировали при 8000 g × 10 мин. После осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (PBS) (pH 7,2-7,4). Клетки вновь центрифугировали и отмывали в PBS, после чего использовали для дальнейших экспериментов.

Тест-штаммы грибов рода *Aspergillus* культивировали на плотной питательной среде Чапека-Докса с дрожжевым экстрактом (CYA) (сахароза - 30 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaNO₃ - 3 г/л, K₂HPO₄ - 1 г/л, KCl - 0,5 г/л, MgSO₄·7H₂O - 0,5 г/л, FeSO₄·7H₂O - 0,01 г/л, агар - 15 г/л, pH 7,3±0,2) при 28 °C в течение 5-6 дней. По истечению времени производили смыв конидий стерильной водой с Твин-20 (0,05%), вортексировали и центрифугировали при 5000 g × 10 мин. Суспензию конидий отмывали в стерильной воде, после чего ресуспендировали в стерильном растворе 25% глицерина, и использовали для дальнейших экспериментов.

Тест-штаммы грибов рода *Fusarium* культивировали в КМЦ бульоне (карбоксиметилцеллюлоза - 15 г/л, дрожжевой экстракт - 1 г/л, NH₄NO₃ - 1 г/л,

KH_2PO_4 - 1 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 г/л, pH 6,5±0,2) при 28 °С в течение 4-5 дней. По истечению времени культуральную жидкость пропускали через 3-х слойную стерильную марлю и центрифугировали при 5000 г × 10 мин. Суспензию конидий отмывали в стерильной воде, после чего ресуспендировали в стерильном растворе 25% глицерина, и использовали для дальнейших экспериментов.

Для определения чувствительности к 2,4-ДАФГ методом серийных разведений и оценки биоплёнкообразования использовали жидкую питательную среду RPMI-1640 с глутаматом натрия и феноловым красным (Servicebio, КНР). Для оценки метаболической активности использовали питательную среду Сабуро с трифенилтетразолий хлоридом (ТТХ).

Для экспериментов с *C. albicans* ATCC 10231 использовали жидкую питательную среду YPD (глюкоза - 20 г/л, мясной пептон - 20 г/л, дрожжевой экстракт - 10 г/л, pH 6,8±0,2). Для изучения мицелиально-дрожжевого диморфизма использовали плотную питательную среду Spider (ГРМ-бульон - 10 г/л, маннит - 10 г/л, KH_2PO_4 - 2 г/л, pH 7,2±0,2) и жидкую питательную среду с N-ацетилглюкозамин (N-ацетилглюкозамин - 5 г/л, мясной пептон - 5 г/л, KH_2PO_4 - 0,3 г/л, pH 7,2±0,2).

Для экспериментов с грибами рода *Aspergillus* – картофельно-глюкозный агар (КГА), среду Чапека Докса с дрожжевым экстрактом, для продукции микотоксинов – жидкую питательную среду YES (сахароза - 150 г/л, дрожжевой экстракт - 20 г/л, pH 6,2±0,2).

Для экспериментов с грибами рода *Fusarium* – картофельно-глюкозный агар (КГА), картофельно-глюкозный бульон (КГБ), для продукции микотоксинов – жидкую питательную среду Муго (сахароза - 40 г/л, NaCl - 5 г/л, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - 1 г/л, KH_2PO_4 - 3 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2 г/л, глицерин - 1%, pH 6,2±0,2).

2.2.2. Получение препаративных количеств 2,4-ДАФГ

Для получения антимикробного метаболита штамм-продуцент культивировали в среде LB при температуре 28 °С в течение суток. По

истечению времени культуральную жидкость центрифугировали при 8000 g × 15 минут, после чего пропускали через мембранные фильтры (ø 0,22 мкм). Полученный фильтрат использовали для дальнейшего анализа.

Экстракцию 2,4-ДАФГ из фильтрата культуральной жидкости осуществляли путем твердофазной экстракции. Твердофазная экстракция осуществлялась с использованием обращенно-фазовых картриджей Strata C-18 (Phenomenex, США). Элюирование проводилось 80% раствором ацетонитрила в воде. Полученный элюат высушивали с помощью лиофильной сушки.

Навеску полученного экстракта (100-200 мг) перерастворяли в воде, после чего наносили на колонки препаративной флеш-хроматографии Reveleris X2 (BUCHI, Швейцария). Хроматография осуществлялась в ступенчатом градиенте (хроматография среднего давления). УФ-детектирование вели на длине волны 270 нм. Полученные фракции собирали и лиофилизировали.

Чистоту антимикробного метаболита в полученной фракции оценивали с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии 1260 Infinity II (Agilent, США). Хроматография осуществлялась в градиентном режиме элюирования. УФ-детектирование вели на длине волны 270 нм.

2.2.3. Определение антифунгальной активности 2,4-ДАФГ

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) 2,4-ДАФГ в отношении исследуемых штаммов оценивали общепринятым методом серийных разведений в 96-луночных планшетах. Исследуемые штаммы культивировали в жидкой питательной среде RPMI-1640 в течение 24 (*C. albicans* ATCC 10231) или 72 часов (*Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.) при температуре 28°C в присутствии 2,4-ДАФГ. Каждый час с помощью спектрофотометра измеряли оптическую плотность содержимого лунок при $\lambda=620$ нм. За МИК принимали концентрацию 2,4-ДАФГ, при которой наблюдалось полное отсутствие видимого роста культуры. МИК определяли

как минимальную концентрацию подавляющую видимый рост культуры ($OP_{620} < 90\%$ от контроля).

2.2.4. Оценка влияния 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование грибов

Для оценки влияния 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование дрожжеподобных грибов *C. albicans* ATCC 10231 инкубировали в 24-луночных планшетах в течение 1,5 часов при температуре 37°C. Мицелиальные грибы культивировали в течение 6 часов при температуре 37°C (*A. fumigatus* UTMN) или 28°C (*A. niger* INA 00890, *A. ochraceus* INA 01112, *Fusarium* spp.). По истечению времени лунки два раза промывали PBS, вносили жидкую питательную среду RPMI-1640 и 2,4-ДАФГ в различных концентрациях. 24-луночный планшет с биоплёнками *C. albicans* ATCC 10231 культивировали 24 часа при температуре 37°C. Биоплёнки мицелиальных грибов культивировали 36 часов при температуре 37°C (*A. fumigatus* UTMN) и 48 часов при температуре 28°C (*A. niger* INA 00890, *A. ochraceus* INA 01112, *Fusarium* spp.).

По истечению времени лунки планшета промывали два раза промывали PBS. Биоплёнки окрашивали 0,2% кристаллическим фиолетовым (CV). Оптическую плотность измеряли при 590 нм. В качестве положительного контроля выступала культура свободная от 2,4-ДАФГ.

Для оценки влияния 2,4-ДАФГ на метаболическую активность биоплёнок дрожжеподобные грибы (*C. albicans* ATCC 10231) культивировали 24 часа при температуре 37°C, мицелиальные грибы культивировали 36 часов при температуре 37°C (*A. fumigatus* UTMN) и 48 часов при температуре 28°C (*A. niger* INA 00890, *A. ochraceus* INA 01112, *Fusarium* spp.).

По истечению времени лунки планшета два раза промывали 100 мМ HEPES. Биоплёнки культивировали 3 часа при температуре 37°C в жидкой питательной среде Сабуро, содержащей 0,5% 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ). Оптическую плотность измеряли при 490 нм. В качестве положительного контроля выступала культура свободная от 2,4-ДАФГ.

Для оценки влияния на 2,4-ДАФГ на зрелые биоплёнки исследуемых штаммов 2,4-ДАФГ вносили спустя 24 (*C. albicans* ATCC 10231), 36 (*A. fumigatus* UTMN) или 48 часов (*A. niger* INA 00890, *A. ochraceus* INA 01112, *Fusarium* spp.) и дополнительно культивировали 24 часа.

По истечению времени лунки два раза промывали PBS, вносили жидкую питательную среду RPMI-1640 и исследуемое вещество в различных концентрациях. Общую биомассу биоплёнок и метаболическую активность оценивали с помощью CV и ТТХ, соответственно.

2.2.5. Оценка морфологии биоплёнок грибов

Для оценки морфологии биоплёнок дрожжеподобных грибов *C. albicans* ATCC 10231 культивировали в 24-луночных планшетах в течение 1,5 часов при температуре 37°C. Мицелиальные грибы культивировали в течение 6 часов при температуре 37°C (*A. fumigatus* UTMN) или 28°C (*A. niger* INA 00890, *A. ochraceus* INA 01112, *Fusarium* spp.). Затем лунки промывали два раза PBS, вносили жидкую питательную среду RPMI-1640 и исследуемое вещество в различных концентрациях. 24-луночный планшет с биоплёнками *C. albicans* ATCC 10231 культивировали 24 часа при температуре 37°C. Биоплёнки мицелиальных грибов культивировали 36 часов при температуре 37°C (*A. fumigatus* UTMN) и 48 часов при температуре 28°C (*A. niger* INA 00890, *A. ochraceus* INA 01112, *Fusarium* spp.).

По истечению времени лунки промывали два раза PBS, затем фиксировали биоплёнки путем инкубирования в 4% глутаральдегиде в течение 2 часов при комнатной температуре. По истечению времени биоплёнки обезвоживали при помощи проведения образца через спирты возрастающей концентрации (20% этанол в течение 15 минут, 50% этанол в течение 15 минут, 70% этанол в течение 15 минут, 96% этанол в течение 20 минут). Обезвоженные образцы высушивали в лиофилизаторе при 1,5 мбар. Биоплёнки напыляли наноразмерным золотом, после чего анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа MIRA 3 (TESCAN, Чехия)).

2.2.6. Химический анализ экзополимерного матрикса биоплёнок грибов

Химический анализ экзополимерного матрикса (ЭПМ) формирующихся биоплёнок исследуемых штаммов проводили в соответствии с методом Reichhardt и соавт. (2015) (Analysis of the Aspergillus ..., 2015). Биоплёнки исследуемых штаммов, сформированные в присутствии 2,4-ДАФГ, промывали в PBS, после чего соскребали с поверхности 24-луночного планшета и перерастворяли в PBS. Образцы обрабатывали ультразвуком в щадящем режиме (частота 20 кГц, амплитуда 75%), после чего вортиксировали 30 секунд. Образцы центрифугировали при $3600\text{ g} \times 15\text{ мин}$ при 4°C . Супернатант переносили в чистые пробирки и центрифугировали при тех же условиях для осаждения оставшихся клеток. После супернатант отбирали и ставили на диализ против воды на 2 дня (молекулярная масса отсечения 3,5 кДа). Содержимого диализного мешка отбирали, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Концентрацию углеводов в ЭПМ биоплёнок измеряли после кислотного гидролиза в 3 М HCl (95°C , 2,5 часа) с помощью фенол-сернокислотного метода, концентрацию аминсахаров с помощью п-диметиламинобензальдегида (п-ДМАБА), концентрацию белков измеряли с помощью спектрофотометра NanoPhotometer N120 (Implen, Germany) при $\lambda=280\text{ нм}$. Содержание белков и углеводов в исследуемых образцах определяли по калибровочным кривым бычьего сывороточного альбумина (БСА) и глюкозе, соответственно.

2.2.7. Оценка содержания полисахаридов в клеточной стенке *S. albicans*

Содержание маннанов в клетках *S. albicans* оценивали методом Kocourek и Ballou, 1969 с некоторыми изменениями. *S. albicans* культивировали в питательной среде YPD в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение суток при постоянной при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин.). По истечению времени клетки отделяли от культуральной жидкости с помощью центрифугирования

при $8000\text{ g} \times 25\text{ мин.}$ Осадок промывали водой и вновь центрифугировали при $8000\text{ g} \times 25\text{ мин.}$ Осадок перерастворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Полученный лиофилизат растирали с помощью ступки и пестика в жидком азоте.

Клеточный гомогенизат (150 мг) ресуспендировали в 3 мл воды и автоклавировали при $121\text{ }^{\circ}\text{C} \times 90\text{ мин.}$ По истечению времени образцы охлаждали, смешивали в равных пропорциях (об./об.) с раствором Фейлинга и оставляли на ночь при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Осадок (маннано-медный комплекс) получали с помощью центрифугирования при $5000\text{ g} \times 25\text{ мин} \times 4^{\circ}\text{C}$. Полученный осадок перерастворяли в 2 мл раствора 96% этанол: уксусная кислота (8:1, об/об). После по каплям добавляли 3 М HCl до полного обесцвечивания осадка. Образцы центрифугировали при $5000\text{ g} \times 25\text{ мин} \times 4\text{ }^{\circ}\text{C}$, осадок перерастворяли в 1 мл воды. Маннаны гидролизovali в 3 М HCl в течение 1 часа при 100°C . Концентрацию маннанов (по гексозам) оценивали фенол-сернокислым методом. Содержание маннанов определяли по калибровочной кривой глюкозы.

Содержание бета-глюканов в клетках *C. albicans* оценивали методами Amer и соавт (2021), а также Mahmoud и Yassein, (2024) с некоторыми изменениями. *C. albicans* культивировали в питательной среде YPD в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение суток при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин.). По истечению времени клетки отделяли от культуральной жидкости с помощью центрифугирования при $8000\text{ g} \times 25\text{ мин.}$ Осадок промывали водой и вновь центрифугировали при $8000\text{ g} \times 25\text{ мин.}$ Осадок перерастворяли в небольшом количестве дистиллированной воды, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Полученный лиофилизат растирали с помощью ступки и пестика в жидком азоте.

Клеточный гомогенизат (150 мг) перерастворяли в 3 мл 1 М NaOH и инкубировали при $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов. По истечению времени образцы

центрифугировали при $5000\text{ g} \times 25\text{ мин} \times 4^\circ\text{C}$, осадок два раза промывали дистиллированной водой. Осадок перерастворяли в 3 мл 1 М уксусной кислоты и инкубировали при 80°C в течение 2 часов. По истечению времени образцы центрифугировали при $5000\text{ g} \times 25\text{ мин} \times 4^\circ\text{C}$, осадок перерастворяли в дистиллированной воде. Бета-глюканы гидролизovali в 3 М HCl в течение 1 часа при 100°C . Концентрацию бета-глюканов (по гексозам) оценивали фенол-серноокислым методом. Содержание бета-глюканов определяли по калибровочной кривой глюкозы.

2.2.8. Оценка содержания полисахаридов в мицелии *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp.

Содержание полисахаридов в мицелии грибов рода *Aspergillus* и *Fusarium* оценивали методами Bishop и соавт. (1960) и Kazim и соавт. (2021) с некоторыми изменениями (Bishop et al., 1960; *Aspergillus nidulans* AmyG ..., 2021). Исследуемые штаммы культивировали в жидких питательных средах CYA (*Aspergillus* spp.) или КГБ (*Fusarium* spp.) в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 4 и 7 суток, соответственно, при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин.). Полученный мицелий промывали PBS, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Высушенный мицелий растирали с помощью ступки и пестика в жидком азоте. Растертый мицелий (200 мг) перерастворяли в 1 М NaOH и инкубировали в течение 2 часов при 90°C .

Для экстракции альфа-глюканов образцы, полученные после щелочного гидролиза, центрифугировали при $4500\text{ g} \times 10\text{ мин}$ и отбирали супернатант. pH супернатанта доводили до 5,5 с помощью уксусной кислоты. Альфа-глюканы получали путем центрифугирования образцов при $10000\text{ g} \times 10\text{ мин.}$, после чего осадок промывали дистиллированной водой. Альфа-глюканы гидролизovali в 3 М H_2SO_4 в течение 1 часа при 100°C . После образцы охлаждали и центрифугировали при $10000\text{ g} \times 10\text{ мин}$. Концентрацию альфа-глюканов (по гексозам) оценивали с помощью антрона. Для этого 100 мкл супернатанта смешивали с 1 мл раствора антрона (0,2% раствор, 75% H_2SO_4).

Образцы инкубировали в течение 10 минут при 100°C, после чего охлаждали, и измеряли оптическую плотность ($\lambda=620$ нм) с помощью спектрофотометра.

Для экстракции хитина и бета-глюканов осадок, полученный в результате щелочного гидролиза и последующего центрифугирования при 4500 g $\times$ 10 мин перерастворяли в 2 М уксусной кислоте и инкубировали в течение 4 часов при 60°C для удаления хитозана. По истечению времени образцы центрифугировали при 4500 g $\times$ 10 минут, супернатант удаляли, осадок промывали в дистиллированной воде. Образец перерастворяли в 6 М HCl и инкубировали в течение 3 часов при 100°C. Образцы охлаждали и центрифугировали при 15000 g $\times$ 10 мин. Концентрацию хитина (по N-ацетилглюкозамину) оценивали с помощью п-ДМАБА ($\lambda=630$ нм). Концентрацию бета-глюканов (по гексозам) оценивали с фенол-сернокислотным методом ($\lambda=490$ нм). Содержание альфа- и бета-глюканов определяли по калибровочной кривой глюкозы. Содержание хитина определяли по калибровочной кривой N-ацетилглюкозамина.

2.2.9. Оценка содержания эргостерола в планктонных клетках *C. albicans* и мицелии *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp.

Содержание эргостерола в планктонных клетках и мицелии исследуемых культур оценивали методом Breivik и Owades (1957) (Breivik, Owades, 1957). *C. albicans* культивировали в жидкой питательной среде YPD в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение суток при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин.). Исследуемые штаммы *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp. культивировали в жидких питательных средах CYA и КГБ, соответственно, в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 4 или 7 суток при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин.). Планктонные клетки и мицелий промывали PBS, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Лиофилизированные культуры растирали с помощью ступки и пестика в жидком азоте.

Гомогенизированные планктонные клетки или мицелий (50 мг) смешивали с 3 мл спиртового раствора 25% КОН и вортиксировали 1 минуту. После образцы переносили в стеклянные пробирки и инкубировали в течение 1,5 часов при 85°C. По истечению времени образцы охлаждали до комнатной температуры. Эргостерол экстрагировали путем добавления к образцам 1 мл PBS и 3 мл н-гексана, и тщательного перемешивания в течение 3 минут. После полного разделения фаз гексановую фракцию отбирали, переносили в кварцевые кюветы и считывали УФ спектр поглощения в диапазоне 240-300 нм. Содержание эргостерола определяли в процентах от сухого веса мицелия по формуле:

$\% \text{ содержания эргостерола} = [\% \text{ эргостерола} + \% \text{ 24(28)-дигидроэргостерола}] - \% \text{ 24(28)-дигидроэргостерола}$, где

$\% \text{ эргостерола} = [(\text{ОП}_{281.5}/290) \times F]/\text{сухой вес мицелия}$,

$\% \text{ 24(28)-дигидроэргостерола} = [(\text{ОП}_{230}/518) \times F]/\text{сухой вес мицелия}$,

F - фактор разведения образца

290 и 518 - коэффициенты молярной экстинкции (ε) (в процентах на см), определенные для кристаллических форм эргостерола и 24(28)-дигидроэргостерола, соответственно.

2.2.10. Оценка гидрофобных свойств клеточной стенки планктонных клеток *C. albicans* и конидии *Aspergillus* spp.

Влияние 2,4-ДАФГ на гидрофобность клеточной стенки планктонных клеток *C. albicans* и конидий *Aspergillus* spp. оценивали методом Gupta и соавт. (2022) (Isoeugenol affects expression ..., 2022). *C. albicans* ATCC 10231 культивировали в питательной среде YPD в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 24 часов при температуре 28°C. По истечению времени планктонные клетки центрифугировали при 8000 g × 10 мин, осадок перерастворяли в PBS.

Культуры *Aspergillus* spp. культивировали на картофельно-глюкозном агаре в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 5 суток при температуре 37 °C (*A. fumigatus* UTMN) или 7 суток при температуре

28°C (*A. niger* INA 00890, *A. ochraceus* INA 01112). По истечению времени осуществляли смыв конидий с помощью PBS, содержащего 0,05% Твин-20. Суспензию конидий центрифугировали при 4500 g × 10 мин, осадок перерастворяли в PBS.

Оптическую плотность планктонных клеток или конидий доводили до оптической плотности $0,3 \pm 0,02$ ($\lambda=630$ нм). Суспензию планктонных клеток или конидий смешивали с н-гексаном в соотношении 4:1, вортексировали 2 минуты и инкубировали 10 минут при комнатной температуре для полного разделения фаз. После этого измеряли оптическую плотность водной фазы ($\lambda=600$ нм).

Гидрофобность клеточной стенки оценивали по формуле:

% гидрофобности = $[(A_1 - A_2)/A_1] \times 100$, где A_1 и A_2 – это значения оптической плотности ($\lambda=600$ нм) клеточной культуры до и после смешивания с н-гексаном, соответственно.

2.2.11. Оценка гидрофобных свойств мицелия *Fusarium* spp.

Гидрофобность мицелия *Fusarium* spp. оценивали методом Gurdaswani и соавт. (2020) с некоторыми изменениями (Gurdaswani et al., 2020). *F. solani* VKPM F-890, *F. culmorum* MFG 102100 и *F. sporotrichioides* MFG 11039 культивировали на картофельно-глюкозном агаре (Ø 90 мм) в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 7 дней при температуре 28°C. По истечению времени на край агаризованных культур *Fusarium* spp. наносили 10 мкл 0,1% водного раствора кристаллического фиолетового и инкубировали 15 минут при комнатной температуре. По истечению времени оценивали состояние красителя на поверхности культуры.

2.2.12. Анализ мицелиально-дрожжевого диморфизма *C. albicans*

Влияние 2,4-ДАФГ на мицелиально-дрожжевой диморфизм *C. albicans* ATCC 10231 оценивали методом Liu и соавт. (1994) (Liu et al., 1994). 10 мкл инокулюма *C. albicans* ATCC 10231 с титром $1-2 \times 10^6$ КОЕ/мл наносили на поверхность агаризованной питательной среды (Ø 60 мм), содержащей субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ. Культуры инкубировали 4 суток

при температуре 37°C. По истечению времени оценивали морфологию колоний с помощью стереомикроскопа Stemi 508 (Zeiss, Германия).

Влияние 2,4-ДАФГ на формирование ростовой трубки *C. albicans* ATCC 10231 оценивали с помощью метода Silva-Dias и соавт. (2015) (Adhesion, biofilm formation ..., 2015). *C. albicans* культивировали в питательной среде, содержащей N-ацетилглюкозамин, в течение 3 часов при постоянной температуре (37°C) и перемешивании (150 об./мин). По истечению времени производили подсчёт клеток с помощью светового микроскопа (PrimoStar, Zeiss), после чего рассчитывали процент клеток, сформировавших ростовую трубку по формуле Okamoto и соавт. (1993) (Germ tube formation ..., 1993):

$$\% \text{ образования ростовой трубки (РТ)} = \frac{\text{Число клеток, сформировавших РТ}}{\text{Общее число клеток}} \times 100$$

2.2.13. Оценка спороношения *Aspergillus* spp.

Для оценки спороношения исследуемые культуры грибов рода *Aspergillus* инкубировали на агаризованной среде Чапека-Докса с дрожжевым экстрактом (Ø 90 мм) при температуре 28°C в течение 5 суток. По истечению времени осуществляли смыв конидий с поверхности культур с помощью PBS, содержащего Твин-20 (0,05%). Полученные конидии перерастворяли в 1 мл PBS. Количество конидий в исследуемом образце оценивали в камере Горяева с помощью светового микроскопа PrimoStar (Zeiss, Германия). Интенсивность спороношения выражали как количество конидий на 1 мм² культуры.

2.2.14. Оценка содержания меланинов в конидиях *Aspergillus* spp.

Содержание 1,8-дигидрокси-нафталина (ДГН-меланина) и меланина в конидиях *A. fumigatus* UTMN и *A. niger* INA 00890, соответственно, оценивали методом Medina и соавт. (2018) (Identification of an intermediate ..., 2018). Конидии, полученные путем смыва с поверхности исследуемых перерастворяли в 5 мл 1 М NaOH и автоклавировали при 121°C в течение 20 минут. Образцы охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 4500 g × 10 минут. Супернатант отбирали и доводили pH до 2 с помощью 3 М HCl. Для осаждения меланина супернатант инкубировали 18 часов при

4°C. По истечению времени образцы центрифугировали при 4500 g × 10 мин, после чего промывали дважды водой для достижения нейтрального pH. Осадок подсушивали в сухожаре при 40°C и ставили на кислотный гидролиз в 6 М HCl (100°C, 2 часа) для удаления углеводов и белков. Для получения меланина образцы охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 4500 g × 10 мин. Осадок перерастворяли в 1 М NaOH и измеряли оптическую плотность ($\lambda=400$ нм) с помощью спектрофотометра.

2.2.15. Оценка морфологии конидий *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp.

Для оценки морфологии конидий исследуемые культуры инкубировали на картофельно-глюкозном агаре (Ø 90 мм) при температуре 28°C (*A. niger* INA 00890, *A. ochraceus* INA 01112, *Fusarium* spp.) или 37°C (*A. fumigatus* UTMN) в течение 5-7 суток. По истечению времени делали смыв конидий с поверхности исследуемых культур. Полученные суспензии центрифугировали при 4500 g × 10 мин и инкубировали в 4% глутаральдегиде в течение 2 часов при комнатной температуре. По истечению времени конидии вновь центрифугировали и обезвоживали при помощи проведения образцов через спирты возрастающей концентрации (20% этанол (об./об.) в течение 10 минут, 50% этанол (об./об.) в течение 10 минут, 70% этанол (об./об.) в течение 10 минут, 96% этанол в течение 15 минут). Обезвоженные образцы наносили на покровное стекло. Образцы напыляли наноразмерным золотом, после чего анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа MIRA 3 (TESCAN, Чехия).

2.2.16. Оценка содержания нафтохиноновых пигментов в мицелии *Fusarium* spp.

Содержание нафтохиноновых пигментов в мицелии *Fusarium* spp. оценивали методом Wong и соавт. (1981) с некоторыми изменениями (Wong et al., 1981). Исследуемые штаммы культивировали в КГБ в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 7 суток при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин.). Полученный мицелий промывали PBS, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Высушенный мицелий растирали с помощью ступки и пестика в жидком азоте.

Растертый мицелий (15 мг) перерастворяли в ДМСО и вортиксовали в течение 5 минут. Образцы центрифугировали при 10000 g × 10 мин. Супернатант отбирали, измеряли оптическую плотность ($\lambda=500$ нм) с помощью спектрофотометра.

2.2.17. Оценка продукции молекул «чувства кворума» *C. albicans*

Для количественного анализа молекул «чувства кворума» (фарнезол, тирозол) *C. albicans* ATCC 10231 культивировали 100 мл питательной среды YPD (погруженная культура) или RPMI-1640 (биоплёнки) в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ при 28°C в течение суток. В качестве контроля выступала культура *C. albicans* ATCC 10231, свободная от 2,4-ДАФГ.

Для экстракции тирозола культуральную жидкость *C. albicans* ATCC 10231 подкисляли 0,4 мл 0,1 М серной кислотой и экстрагировали методом твердофазной экстракции (ТФЭ). Картриджи Strata C-18 предварительно промывали 10 мл чистого ацетонитрила, уравнивали 10 мл 1 мМ серной кислотой. Подкисленную культуральную жидкость загружали в картриджи, элюировали 10 мл 7,5% ацетонитрила в 1 мМ серной кислоте, после чего замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Сухой остаток перерастворяли в 1 мл ДМСО и анализировали с помощью ВЭЖХ.

Тирозол определяли в образцах методом обращенно-фазовой ФЭЖХ с использованием колонок Luna C-18 250 × 4,6 мм (Phenomenex, США) с размером частиц 5 мкм в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (Б), содержащие 0,1% ТФУ. Устанавливали следующий режим элюирования: 0-5 мин от 0 до 5% Б, 5-10 мин от 5 до 10% Б, 10-15 мин при 10% Б, 15-25 мин от 10 до 20% Б, 25-30 мин от 20 до 70% Б, 30-35 мин при 70% Б, 35-40 мин от 70 до 0% Б. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Температура термостата колонки 40°C, объем вводимой пробы 20 мкл. Определение тирозола проводили с УФ-детекцией при длине волны 225 нм.

2.2.18. Оценка продукции глиотоксина и фумагиллина *A. fumigatus*

Для количественного анализа глиотоксина и фумагиллина в культуральной жидкости и мицелии *A. fumigatus* UTMN культивировали в питательной среде YES в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 4 суток при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин). Супернатант отделяли от биомассы и центрифугировали при 8000 g × 15 мин. Супернатант фильтровали через мембрану $\varnothing$ 0,22 мкм, после чего смешивали с хлороформом в соотношении (3:1, об./об.) и инкубировали в течение 1 часа при 300 об./мин. После разделения фаз хлороформную фракцию отбирали, упаривали досуха и перерастворяли в ДМСО.

Мицелий, полученный культивированием *A. fumigatus* UTMN в вышеуказанных условиях, промывали PBS, замораживали в жидком азоте и лиофилизировали. Высушенный мицелий растирали с помощью ступки и пестика в жидком азоте. Растертый мицелий (1 гр) смешивали с хлороформом (10 мл) и инкубировали в течение 1 часа при 300 об./мин. После разделения фаз хлороформную фракцию отбирали, упаривали досуха и перерастворяли в ДМСО.

Для оценки содержания глиотоксина и фумагиллина в культуральной жидкости и мицелии *A. fumigatus* UTMN, полученные экстракты анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Глиотоксин и фумагиллин определяли в образцах методом обращенно-фазовой ФЭЖХ с использованием колонок Luna C-18 250 × 4,6 мм (Phenomenex, США) с размером частиц 5 мкм в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (Б), содержащие 0,1% ТФУ. Устанавливали следующий режим элюирования: 0-30 мин от 0 до 50% Б, 30-40 мин от 50 до 70% Б, 40-45 мин от 70 до 90% Б, 45-50 мин от 90 до 100% Б, 50-60 мин от 100 до 0% Б.

Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Температура термостата колонки 40°C, объем вводимой пробы 50 мкл. Определение глиотоксина и фумагиллина проводили с УФ-детекцией при длине волны 254 и 335 нм,

соответственно. Количественное определение глиотоксина и фумагиллина проводили с УФ-детектированием при длине волны 254 и 336 нм, соответственно.

2.2.19. Оценка продукции охратоксина А *A. ochraceus*

Для количественного анализа охратоксина А в культуральной жидкости *A. ochraceus* INA 01112 культивировали в жидкой питательной среде YES в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 9 суток при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин). Супернатант отделяли от биомассы и центрифугировали при 8000 g × 15 мин. Супернатант фильтровали через мембрану Ø 0,22 мкм, после чего смешивали с хлороформом в соотношении (3:1, об./об.) и инкубировали в течение 1 часа при 300 об./мин. После разделения фаз хлороформную фракцию отбирали, упаривали досуха и перерастворяли в ДМСО.

Для оценки содержания охратоксина А в культуральной жидкости *A. ochraceus* INA 01112, полученные экстракты анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Охратоксин А определяли в образцах методом обращенно-фазовой ФЭЖХ с использованием колонок Luna C-18 250 × 4,6 мм (Phenomenex, США) с размером частиц 5 мкм в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (Б), содержащие 0,1% ТФУ. Устанавливали следующий режим элюирования: 0-30 мин от 0 до 50% Б, 30-45 мин от 50 до 70% Б, 45-50 мин от 70 до 90% Б, 50-55 мин при 90% Б, 55-65 мин от 90 до 70% Б, 65-55 мин от 70 до 0% Б. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Температура термостата колонки 40°C, объем вводимой пробы 50 мкл. Определение охратоксина А проводили с УФ-детекцией при длине волны 331 нм.

2.2.20. Оценка продукции Т-2 токсина и зеараленона *Fusarium* spp.

Для количественного анализа Т-2 токсина и зеараленона в культуральной жидкости *F. sporotrichioides* MFG 11039 и *F. culmorum* MFG 102100, соответственно, культивировали в жидкой питательной среде Муго в

присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 9 суток при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин). Супернатант отделяли от биомассы и центрифугировали при 8000 g × 15 мин. После супернатант фильтровали через мембрану $\varnothing$ 0,22 мкм. Микотоксины из фильтрата культуральной жидкости получали путем твердофазной экстракции. Твердофазная экстракция (ТФЭ) осуществлялась с использованием обращенно-фазовых картриджей Strata C-18 (Phenomenex, США). Элюирование проводилось раствором ацетонитрил-вода (84:16, по объему). Полученный элюат высушивали с помощью лиофильной сушилки. Высушенный экстракт перерастворяли в 1 мл ДМСО.

Для оценки содержания Т-2 токсина и зеараленона в культуральной жидкости *F. sporotrichioides* MFG 11039 и *F. culmorum* MFG 102100, соответственно, полученные экстракты анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Т-2 токсин определяли в образцах методом обращенно-фазовой ФЭЖХ с использованием колонок Luna C-18 250 × 4,6 мм (Phenomenex, США) с размером частиц 5 мкм в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (Б), содержащие 0,1% ТФУ. Устанавливали следующий режим элюирования: 0-10 мин от 0 до 55% Б, 10-15 мин при 55%, 15-20 мин от 55 до 5% Б, 20-22 мин от 5 до 0% Б. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Температура термостата колонки 40°C, объем вводимой пробы 50 мкл. Определение Т-2 токсина проводили с УФ-детекцией при длине волны 217 нм.

Зеараленон определяли в образцах методом обращенно-фазовой ФЭЖХ с использованием колонок Luna C-18 250 × 4,6 мм (Phenomenex, США) с размером частиц 5 мкм в режиме градиентного элюирования. В качестве подвижной фазы использовали воду (А) и ацетонитрил (Б), содержащие 0,05% ТФУ. Устанавливали следующий режим элюирования: 0-1 мин от 0 до 50% Б, 1-31 мин при 50% Б, 31-32 мин от 50 до 0% Б. Скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Температура термостата колонки 40°C, объем вводимой пробы

50 мкл. Определение зеараленона проводили с УФ-детекцией при длине волны 236 нм.

2.2.21. Оценка продукции внеклеточных нафтохиноновых пигментов *Fusarium* spp.

Продукцию нафтохиноновых пигментов в культуральной жидкости *Fusarium* spp. оценивали методом Soumya и соавт. (2018) (Characterization of a red ..., 2018). *F. solani* VKPM F-890, *F. culmorum* MFG 102100 и *F. sporotrichioides* MFG 11039 культивировали в КГБ в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 7 суток при постоянной температуре (28°C) и перемешивании (110 об./мин). Культуральную жидкость отбирали, центрифугировали при 8000 g × 10 мин. Отбирали супернатант, измеряли оптическую плотность ($\lambda=500$ нм) с помощью спектрофотометра.

2.2.22. Оценка продукции внеклеточных протеолитических ферментов грибов

Протеазную активность исследуемых штаммов оценивали методом Shemesh и соавт. (2017) (Phenotypic and proteomic ..., 2017). Исследуемые штаммы культивировали в жидких питательных средах YPD (*C. albicans* ATCC 10231), CYA (*Aspergillus* spp.) или КГБ (*Fusarium* spp.) в присутствии 0,2% БСА и субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ в течение 36, 72 или 96 часов, соответственно, при постоянной температуре (28°C или 37 °C) и перемешивании (110 об./мин). Культуральную жидкость отбирали, центрифугировали при 8000 g × 10 мин. Супернатант использовали для дальнейшего анализа. Биоплёнки исследуемых штаммов культивировали в питательной среде RPMI-1640 в присутствии ингибиторных и субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ в течение 36 часов при температуре 37°C. (*C. albicans* ATCC 10231, *A. fumigatus* UTMN) или 48 часов при температуре 28°C (*A. niger* INA 00890, *A. ochraceus* INA 01112, *Fusarium* spp.). Культуральную жидкость отбирали, центрифугировали при 8000 g × 10 мин. Супернатант использовали для дальнейшего анализа.

Раствор азоказеина (400 мкл) смешивали с 100 мкл супернатанта и инкубировали 1,5 часа при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 150 мкл 10% ТХУ (об./об.), после чего оставляли на 30 минут при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали при 8000 g × 5 мин. Супернатант отбирали и смешивали с 1 М NaOH в соотношении 1:1. Протеазную активность оценивали по высвободившимся в ходе реакции хромофорам с помощью спектрофотометра ($\lambda=436$ нм). За единицу активности фермента принималось количество, которое приводило к увеличению оптической плотности на 0,01 ед. ($\lambda=436$ нм) при за 90 мин при температуре 37°C.

2.2.23. Анализ структуры почвенного микробиома

Структуру почвенного микробиома изучали с помощью ампликонового секвенирования почвенных образцов, обработанных и свободных от 2,4-ДАФГ.

Из навески почвы (250 мг) выделяли ДНК с помощью набора Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Kit (Zymo Research, США) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию ДНК оценивали с помощью Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США). Качество ДНК ($\lambda=260/280$ нм) оценивали с помощью спектрофотометра NanoPhotometer N120 (Implen, США). Приготовление библиотеки для секвенирования проводилось в соответствии с протоколом (16S Metagenomic Sequencing Library preparation) для MiSeq, Illumina. Для ампликонового секвенирования использовали переменный участок гена ITS грибов. Качество полученной библиотеки проверялось на микрофлюидном анализаторе BioAnalyzer 2100 набором RNA 6000 pico chip (Agilent Technologies, США).

Процедуру секвенирования осуществляли с помощью MiSeq с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Kit v2 (600 cycle, 2×300 пн) согласно рекомендациям производителя (Illumina, США).

Качество FASTQ файлов оценивалось с помощью программы falco 1.2.1. Для удаления последовательностей праймеров и адаптеров использовалась

программа Cutadapt 4.4. Прочтения демультимплексировались, обрезались и объединялись, после чего удалялись химерные последовательности с помощью программы DADA2 1.28.0. Полученным вариантам последовательностей ампликонов (ASV) присваивали таксономию с использованием UNITE5 (25.07.2023). Полученные ASV выравнивали с помощью MAFFT v7.4906, а потом триммировали с помощью trimAl v1.4.rev157.

Филогению реконструировали с помощью IQ-TREE 2.2.58 используя модель TIM3e+I+R10. Анализ альфа-разнообразия (индексы Шеннона, Чao1) и подсчет видового богатства осуществляли с помощью программного обеспечения MicrobiotaProcess 1.12.410.

2.2.24. Анализ ферментативной активности почвенного микробиома

Ферментативную активность β -d-1,4-целлобиозы (ЦЛ), β -1,4-глюкозидазы (ГЛ), β -1,4-ксилозидазы (КС), кислой фосфатазы (КФ), β -1,4-N-ацетил-глюкозаминидазы (N-АГ) и лейцинаминопептидазы (ЛАП) в почвенных образцах, обработанных и свободных от 2,4-ДАФГ, определяли с помощью флуоресцентно-меченных субстратов.

Навеску почвы (1 г) смешивали с 50 мл стерильной воды. Почвенную суспензию гомогенизировали ультразвуком (частота 20 кГц, амплитуда 75%), и встряхивали на горизонтальном шейкере в течение 30 минут при 300 об/мин. Для субстратов, меченных по 4-метилумбеллиферону (4-МУБ) готовили 0,5 М ацетатный буфер с pH 5,5. Для субстратов, меченных по 7-амино-4-метилкумарину (АМК) готовили 0,05 М трис-буфер с pH 7,5 (0,985 г трис(гидроксиметил)аминометана и 2,66 г трис-HCl помещали в одну мерную колбу вместимостью 500 мл и добавляли дистиллированную воду до достижения объема). Затем готовили растворы стандартов (4-МУБ и АМК) и субстратов определенной концентраций.

В 96-ти луночный черный планшет вносили по 50 мкл гомогената. Затем, во все лунки добавляли по 50 мкл буфера (ацетатный или трис-буфер) и по 100 мкл стандарта (4-МУБ или АМК) (стандарт) или по 100 мкл субстрата

(опытные образцы). Конечный реакционный объем в лунке 200 мкл. Необходимыми контролями являются: почва (150 мкл буфера, 50 мкл почвенного гомогената), субстрат (100 мкл субстрата, 100 мкл буфера (ацетатный или трис-буфер), флуоресцентный стандарт (100 мкл 4-МУБ (или АМК), 100 мкл буфера (ацетатный или трис-буфер)). Флюоресценцию полученных растворов в микропланшетах измеряли в момент внесения субстрата, через 30, 60, 120 и 180 мин (время инкубации, Т, ч). Длина волны возбуждения 360 нм и длина волны излучения 450 нм. Для каждого повторяющегося мезокосма ($n = 5$) было рассчитано 6 аналитических повторов.

2.2.25. Статистическая обработка

Все эксперименты проводили минимум в трех независимых повторностях. Гипотеза о нормальности распределения проверялась критерием Шапиро-Уилка. Статистическую обработку полученных данных осуществляли методом параметрической статистики (парный t -критерий Стьюдента) с помощью StatSoft Statistica 10. Статистически значимыми считали различия при значении $p < 0,05$. Для оценки взаимосвязи между двумя выборками использовали коэффициент корреляции Пирсона, изменения считали достоверными при значении $> 0,75$. Визуализацию полученных данных проводили в OriginPro v.2022 (OriginLab, США).

ГЛАВА 3. ОСОБЕННОСТИ АНТИФУНГАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНА

3.1. Спектр антифунгальной активности 2,4-ДАФГ

Для оценки противогрибковой активности 2,4-диацетилфлороглюцина использовали метод серийных разведений в 96-луночном планшете. Показано, что минимальная ингибирующая концентрация (МИК) 2,4-диацетилфлороглюцина (2,4-ДАФГ) в отношении *S. albicans* и грибов рода *Aspergillus* составила 125 мкг/мл, в отношении грибов рода *Fusarium* – 62 мкг/мл (таблица 1).

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 *C. albicans*

Было показано, что 2,4-ДАФГ подавляет биоплёнкообразование у *C. albicans*. В частности, 2,4-ДАФГ в концентрациях 62-250 мкг/мл ($1/2 \cdot \text{МИК}$ - $2 \cdot \text{МИК}$) снижает биомассу и метаболическую активность формирующихся биоплёнок на 14,5-62,5% и 21,4-64,7%, соответственно, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2022; Stepanov et al., 2022) (рисунок 1).

Выяснено, что 2,4-ДАФГ в ингибиторных концентрациях способен оказывать влияние на зрелые, сформированные биоплёнки *C. albicans* ATCC 10231, что находит отражение в метаболической активности биоплёнок, но не в общей биомассе. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 125-250 мкг/мл ($1 \cdot \text{МИК}$ - $2 \cdot \text{МИК}$) снижает метаболическую активность зрелых биоплёнок на 17,4-34,8%, соответственно, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2022; Stepanov et al., 2022; Степанов, Васильченко, 2023) (рисунок 1).

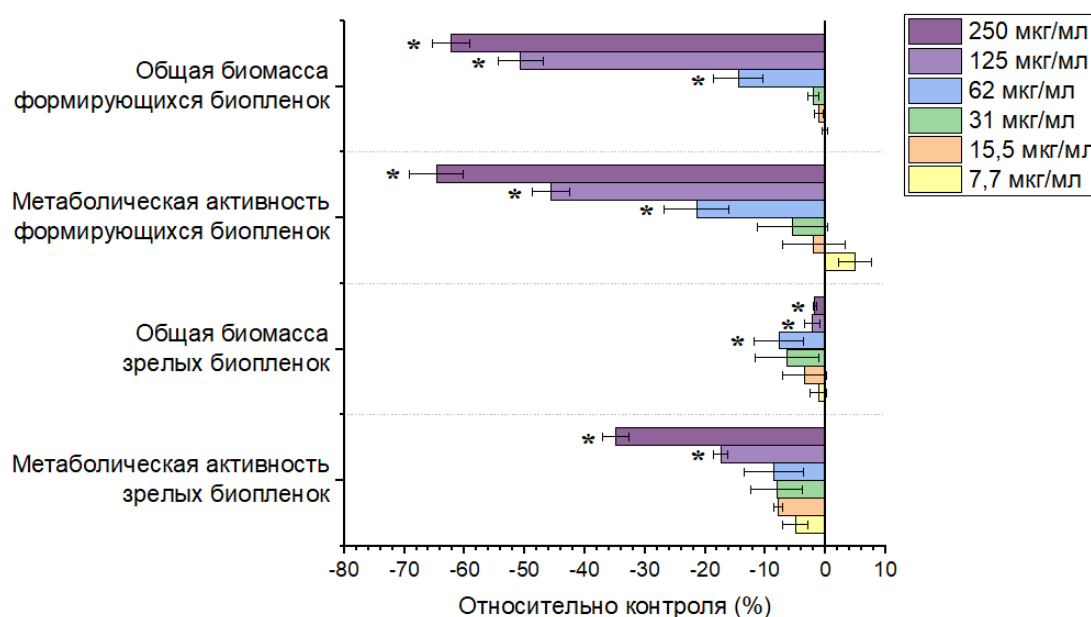


Рисунок 1 - Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся (24 ч) и зрелые (24+24 ч) биоплёнки *C. albicans* ATCC 10231 (Stepanov et al., 2022).

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

Также продемонстрировано, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ влияют как на содержание экзополимерного матрикса (ЭПМ) формирующихся биоплёнок, так и на количественный состав его компонентов. Так, 2,4-ДАФГ в концентрации 62 мкг/мл ($1/2 \cdot \text{МИК}$) снижает сухой вес ЭПМ биоплёнок на $10,7 \pm 3,4\%$, по сравнению с контролем (рисунок 2). Вместе с тем, 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-62 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) снижает количественное содержание белков в ЭПМ биоплёнок на 53,6-66,1%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2022; Степанов, Васильченко, 2023) (рисунок 2). Статистически значимых различий в количественном содержании углеводов в ЭПМ биоплёнок обнаружено не было (рисунок 2).

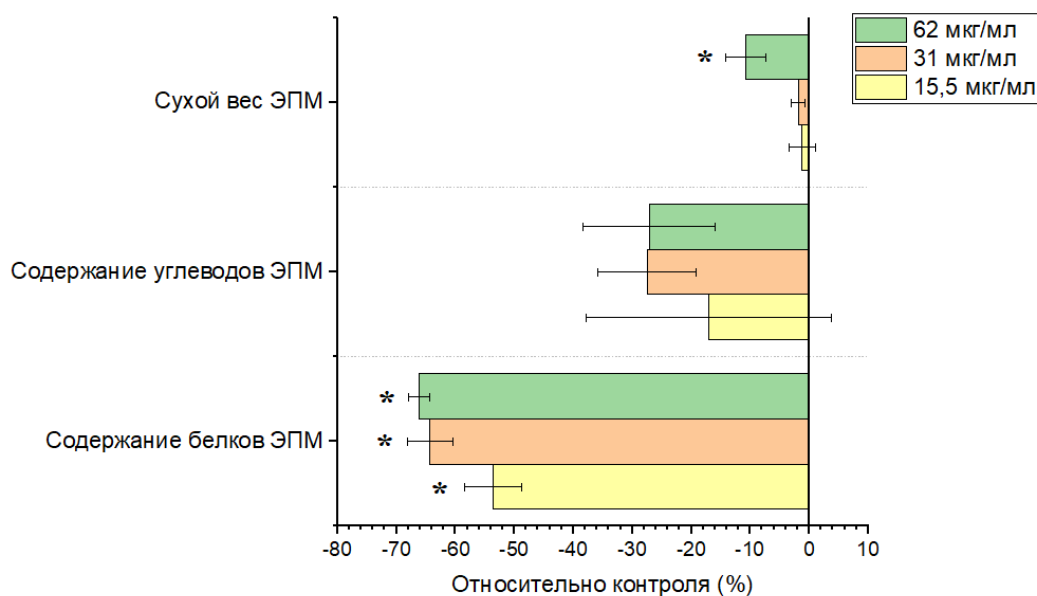


Рисунок 2 - Влияние 2,4-ДАФГ на экзополимерный матрикс формирующихся биоплёнок (24 ч) *C. albicans* ATCC 10231 (Stepanov et al., 2022)

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

Морфология формирующихся биоплёнок *C. albicans* ATCC 10231 была изучена с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). Было выяснено, что ингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ (2·МИК) вызывают изменения в ультраструктуре гиф (Stepanov et al., 2022; Степанов, Васильченко, 2023) (рисунок 3). На изображениях биоплёнок, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ, можно увидеть наноразмерные структуры, напоминающие поры, функция которых предположительно связана с секрецией протеолитических ферментов. Стоит отметить, что подобные изменения в ультраструктуре не описаны в литературе, и их функция по-прежнему остается неясной. Также данный эффект, по всей видимости, характерен только для дрожжеподобных грибов, поскольку не был отмечен в экспериментах с мицелиальными грибами.

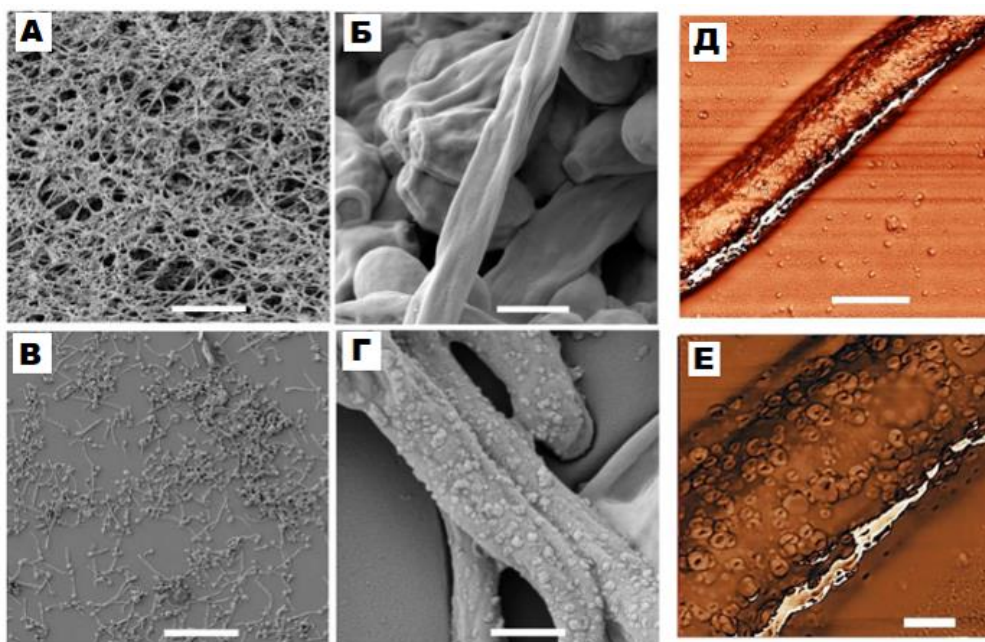


Рисунок 3 - Изображения биоплёнок *Candida albicans* ATCC 10231, сформированных на RPMI-1640 (24 ч) в присутствии 2,4-ДАФГ. А, В – контроль (СЭМ), С, D – 250 мкг/мл (СЭМ), Е, F – АСМ изображения (250 мкг/мл). Масштабная линейка —50 мкм (А, С); 2 мкм (В, D, Е); 200 нм (F) (Stepanov et al., 2022).

3.3. Влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование *Aspergillus* spp.

Было продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ подавляет процессы биоплёнкообразования у грибов рода *Aspergillus*.

Показано, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-125 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ – $1 \cdot \text{МИК}$) снижает общую биомассу и метаболическую активность формирующихся биоплёнок *A. fumigatus* UTMN на 10,8-39,7 и 33,7-54,9%, соответственно, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023) (рисунок 4).

Вместе с тем, 2,4-ДАФГ оказывает влияние на зрелые, сформированные биоплёнки *A. fumigatus* UTMN. 2,4-ДАФГ не способен разрушать сформированные биоплёнки (что отражается в показателе общей биомассы), но может снижать их жизнеспособность. Так, при обработке биоплёнок 2,4-ДАФГ в концентрациях 31-125 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$ – $1 \cdot \text{МИК}$) их метаболическая

активность снижалась на 35,3-72,1%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023) (рисунок 4).

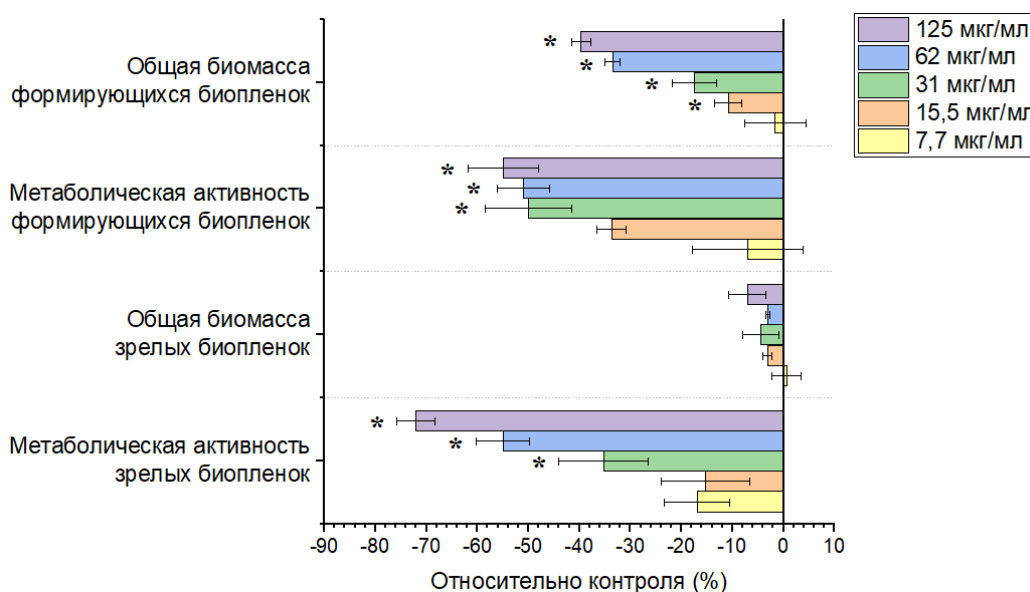


Рисунок 4 - Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся (36 ч) и зрелые (36+24 ч) биоплёнки *A. fumigatus* UTMN (Stepanov et al., 2023).

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

Кроме того, с помощью сканирующей электронной микроскопии изучена структура формирующихся в присутствии 2,4-ДАФГ биоплёнок *A. fumigatus* UTMN (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023) (рисунок 5). Показано, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях ($1/16 \cdot \text{МИК}$ – $1/2 \cdot \text{МИК}$) нарушает трехмерную структуру биоплёнок, а в ингибиторных ($1 \cdot \text{МИК}$) – практически полностью подавляет рост биоплёнок.

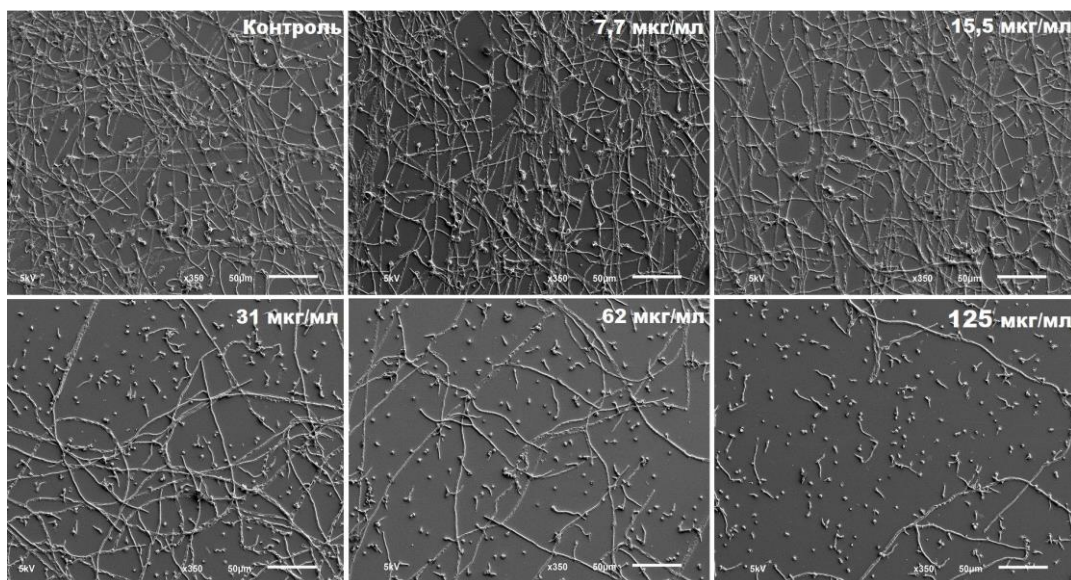


Рисунок 5 – Внешний вид биоплёнок (36 ч) *Aspergillus fumigatus* UTMN, сформированных на RPMI-1640 в присутствии 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 50 мкм (Stepanov et al., 2023).

Показано, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных и ингибиторных концентрациях оказывает влияние на биоплёнкообразование *A. niger* INA 00890. В концентрациях 7,7-125 мкг/мл (1/16·МИК-1·МИК) 2,4-ДАФГ снижает биомассу и метаболическую активность биоплёнок на 56,6-91,0 и 37,4-77,4%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (Степанов, Васильченко, 2024; Stepanov et al., 2024) (рисунок 6).

Стоит заметить, что 2,4-ДАФГ способен разрушать зрелые биоплёнки *A. niger* INA 00890. 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-125 мкг/мл (1/8·МИК-1·МИК) снижает биомассу биоплёнок на 26,5-41,4%, по сравнению с контролем (рисунок 6). Как и в случае с *A. fumigatus* UTMN, 2,4-ДАФГ достоверно снижает метаболическую активность зрелых биоплёнок *A. niger* INA 00890. Показано, что в концентрациях 7,7-125 мкг/мл (1/16·МИК-1·МИК) 2,4-ДАФГ снижает метаболическую активность на 28,4-81,1%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2024; Stepanov et al., 2024) (рисунок 6).

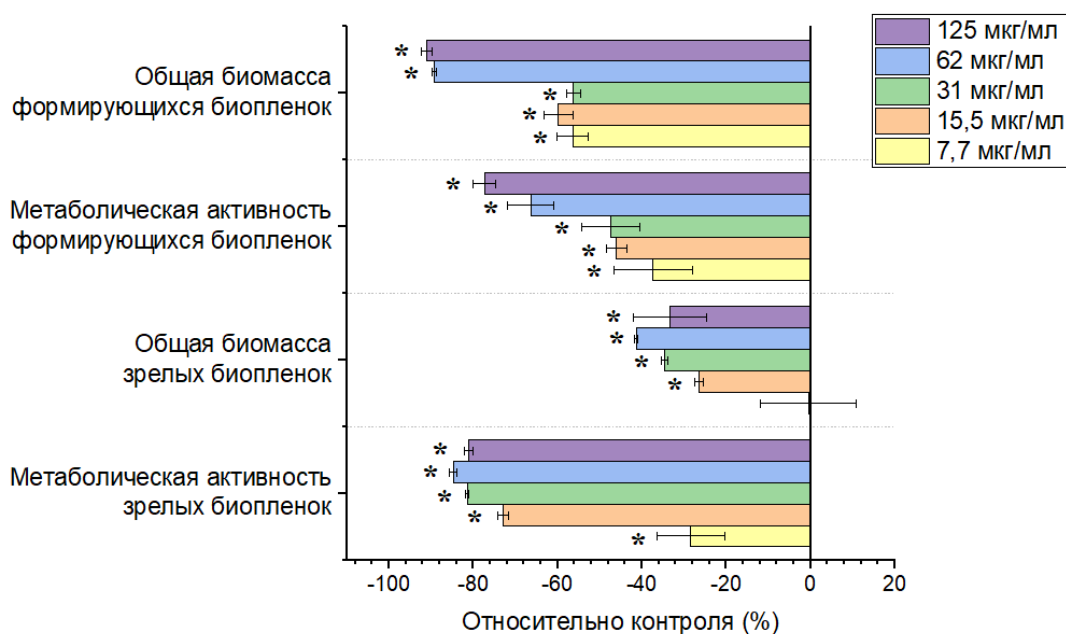


Рисунок 6 - Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся (48 ч) и зрелые (48+24 ч) биоплёнки *A. niger* INA 00890 (Stepanov et al., 2024).

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

С помощью сканирующей электронной микроскопии изучена структура формирующихся в присутствии 2,4-ДАФГ биоплёнок *A. niger* INA 00890 (Stepanov et al., 2024) (рисунок 7). 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях ($1/16 \cdot \text{МИК}$ - $1/4 \cdot \text{МИК}$) меняет структуру биоплёнок, а в концентрациях близких к ингибиторным ($1/2 \cdot \text{МИК}$ - $1 \cdot \text{МИК}$) практически полностью подавляет прорастание конидий *A. niger* INA 00890.

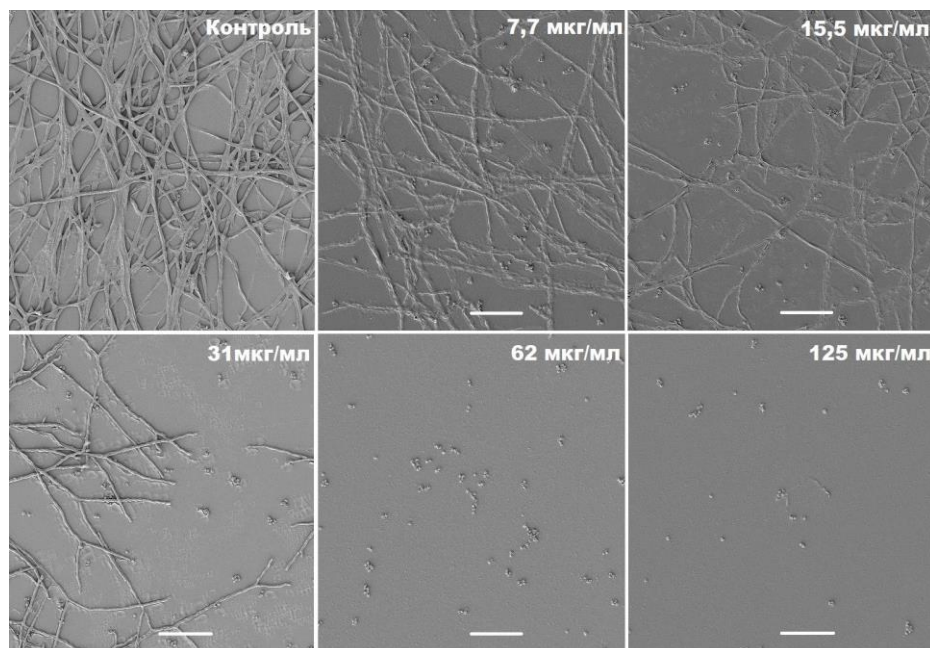


Рисунок 7 – Внешний вид биоплёнок (48 ч) *A. niger* INA 00890, сформированных на RPMI-1640 в присутствии 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 50 мкм (Stepanov et al., 2024).

Продemonстрировано, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных и ингибиторных концентрациях оказывает влияние на биоплёнкообразование *A. ochraceus* INA 01112. В концентрациях 7,7-125 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК} - 1 \cdot \text{МИК}$) 2,4-ДАФГ снижает биомассу и метаболическую активность формирующихся биоплёнок на 19,3-88,3 и 31,7-89,7%, соответственно, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2024; Stepanov et al., 2024) (рисунок 8).

Как и в случае с *A. niger* INA 00890, 2,4-ДАФГ способен разрушать зрелые, сформированные биоплёнки *A. ochraceus* INA 01112. 2,4-ДАФГ в концентрациях 31-125 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК} - 1 \cdot \text{МИК}$) снижает биомассу зрелых биоплёнок на 51,5-60,1%, соответственно, по сравнению с контролем (рисунок 8). Также 2,4-ДАФГ концентрациях 7,7-125 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК} - 1 \cdot \text{МИК}$) снижает метаболическую активность зрелых биоплёнок на 15,2-91,9%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2024; Stepanov et al., 2024) (рисунок 8).

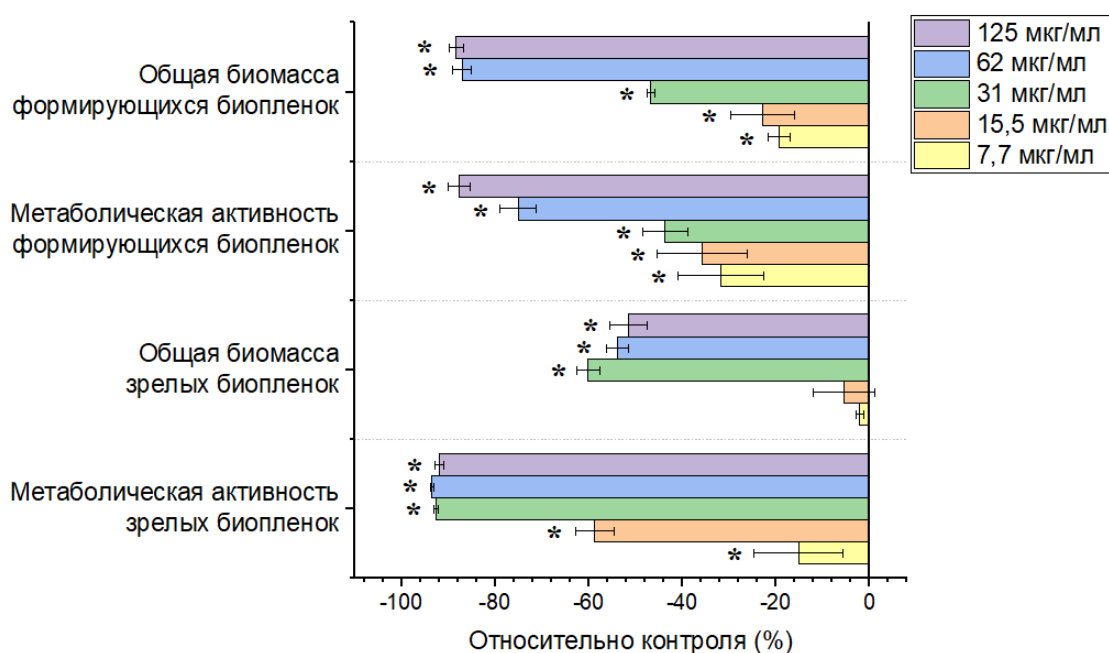


Рисунок 8 - Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся (24 ч) и зрелые (48+24 ч) биоплёнки *A. ochraceus* INA 01112 (Stepanov et al., 2024).

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

Также с помощью сканирующей электронной микроскопии изучена структура формирующихся в присутствии 2,4-ДАФГ биоплёнок *A. ochraceus* INA 01112 (Stepanov et al., 2024) (рисунок 9). Как и в случае с *A. niger* INA 00890, 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях ($1/16 \cdot \text{МИК}$ – $1/4 \cdot \text{МИК}$) негативно влияет на структуру формирующихся биоплёнок, а в концентрациях близким к ингибиторным ($1/2 \cdot \text{МИК}$ – $1 \cdot \text{МИК}$) – практически полностью нарушает прорастание конидий *A. ochraceus* INA 01112.

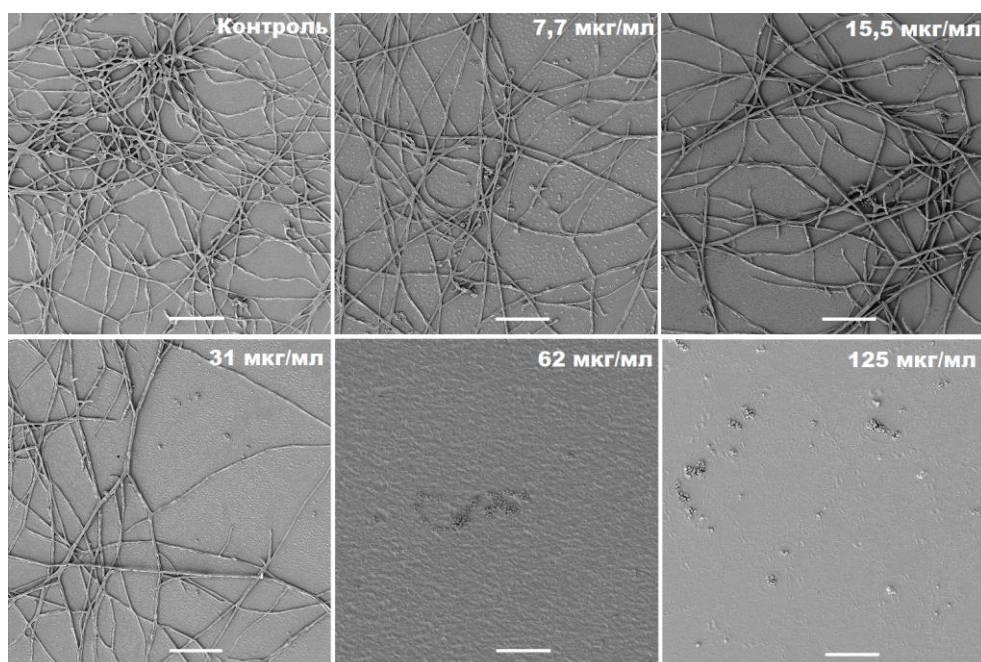


Рисунок 9 – Внешний вид биоплёнок (48 ч) *A. ochraceus* INA 01112, сформированных на RPMI-1640 в присутствии 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 50 мкм (Stepanov et al., 2024).

Стоит отметить, что влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование грибов рода *Aspergillus* согласуется с данными о количественном содержании ЭПМ. Так, в биоплёнках *A. fumigatus* UTMN, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-125 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1 \cdot \text{МИК}$), сухой вес ЭПМ увеличивался на 4,8-7,2%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2023) (рисунок 10). В свою очередь, 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК}$ - $1 \cdot \text{МИК}$) снижал содержание ЭПМ в биоплёнках *A. niger* INA 00890 и *A. ochraceus* INA 01112 на 21,2-36,9 и 21,3-42,2%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунки 11 и 12).

Кроме того, был проанализирован количественный состав ЭПМ формирующихся биоплёнок грибов рода *Aspergillus*. Показано, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК}$ - $1 \cdot \text{МИК}$) снижает содержание углеводов в ЭПМ формирующихся биоплёнок *A. fumigatus* UTMN на 11,7-68,3%, по сравнению с контролем (рисунок 10). При соинкубировании биоплёнок *A. fumigatus* UTMN с 2,4-ДАФГ в концентрациях 62 и 125 мкг/мл

(1/2·МИК - 1·МИК) содержание белков снижалось на 13,7-39,1%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023) (рисунок 10). Достоверные изменения в количественном содержании аминокислот в ЭПМ формирующихся биоплёнок *A. fumigatus* UTMN были обнаружены лишь в концентрации 125 мкг/мл (1·МИК). Содержание аминокислот было снижено на $10,9 \pm 0,9\%$, по сравнению с контролем (рисунок 10).

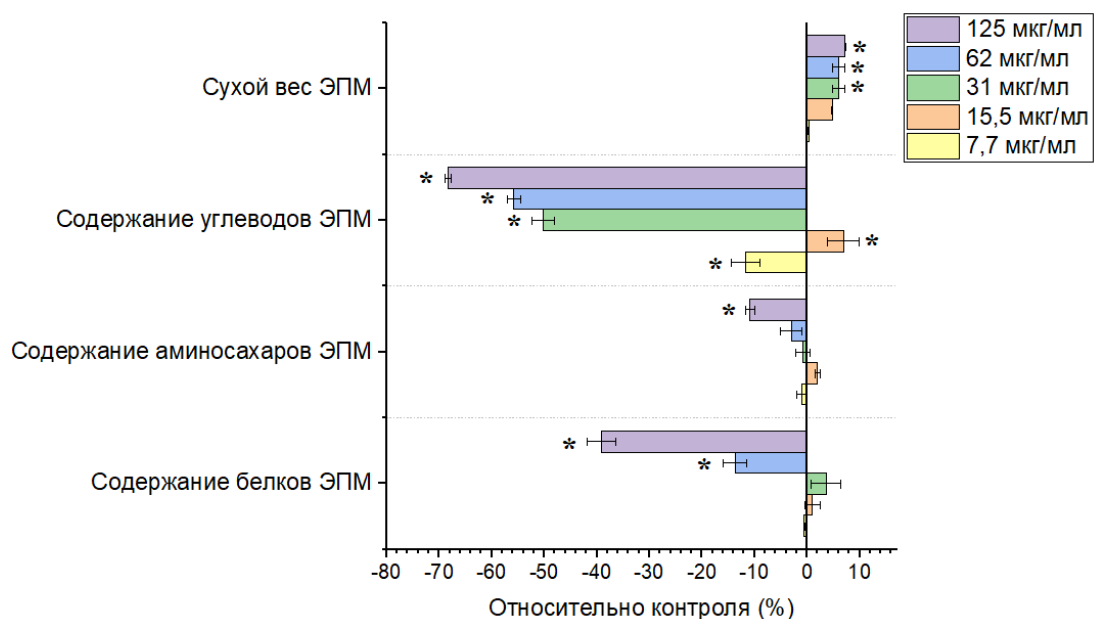


Рисунок 10 - Влияние 2,4-ДАФГ на экзополимерный матрикс формирующихся биоплёнок (48 ч) *A. fumigatus* UTMN (Stepanov et al., 2023).

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

Продemonстрировано, что 2,4-ДАФГ изменяет количественное содержание компонентов ЭПМ формирующихся биоплёнок *A. niger* INA 00890. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл (1/16·МИК-1·МИК) снижает содержание углеводов и белков в ЭПМ формирующихся биоплёнок на 16,5-56,3 и 38,1-69,4%, соответственно, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2024; Stepanov et al., 2024) (рисунок 11).

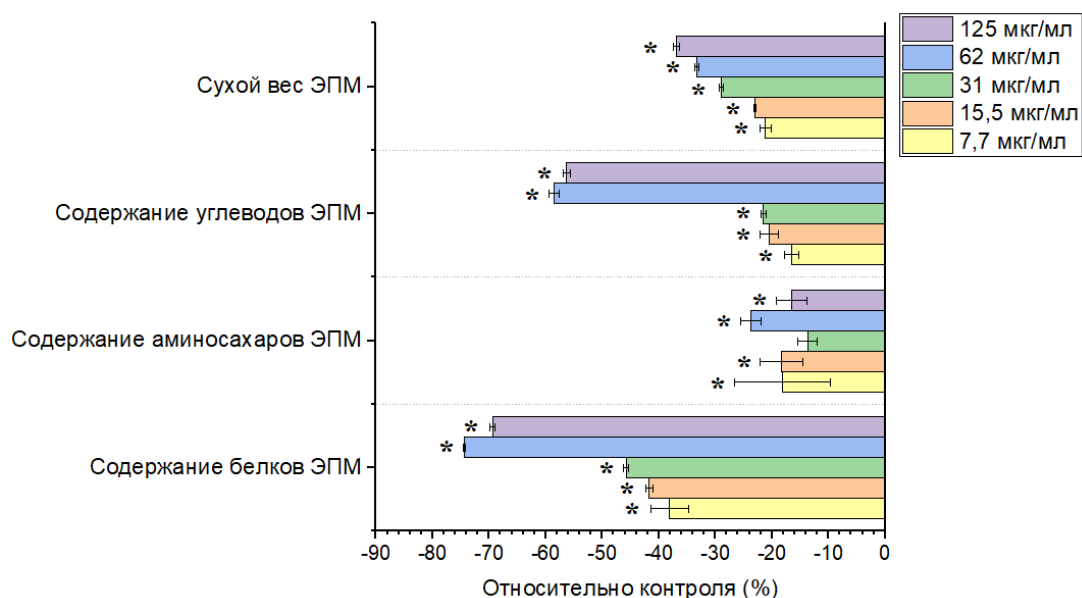


Рисунок 11 - Влияние 2,4-ДАФГ на экзополимерный матрикс формирующихся биоплёнок (48 ч) *A. niger* INA 00890 (Stepanov et al., 2024).

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

Изменения также отмечены в количественном составе компонентов ЭПМ формирующихся биоплёнок *A. ochraceus* INA 01112. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 62-125 мкг/мл ($1/2 \cdot \text{МИК} - 1 \cdot \text{МИК}$) снижает содержание углеводов в ЭПМ формирующихся биоплёнок на 32,8-77,9%, по сравнению с контролем (рисунок 12). В концентрациях 15,5-125 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК} - 1 \cdot \text{МИК}$) содержание белков в ЭПМ формирующихся биоплёнок оказывается снижено на 8,4-59,8%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2024; Stepanov et al., 2024) (рисунок 12)

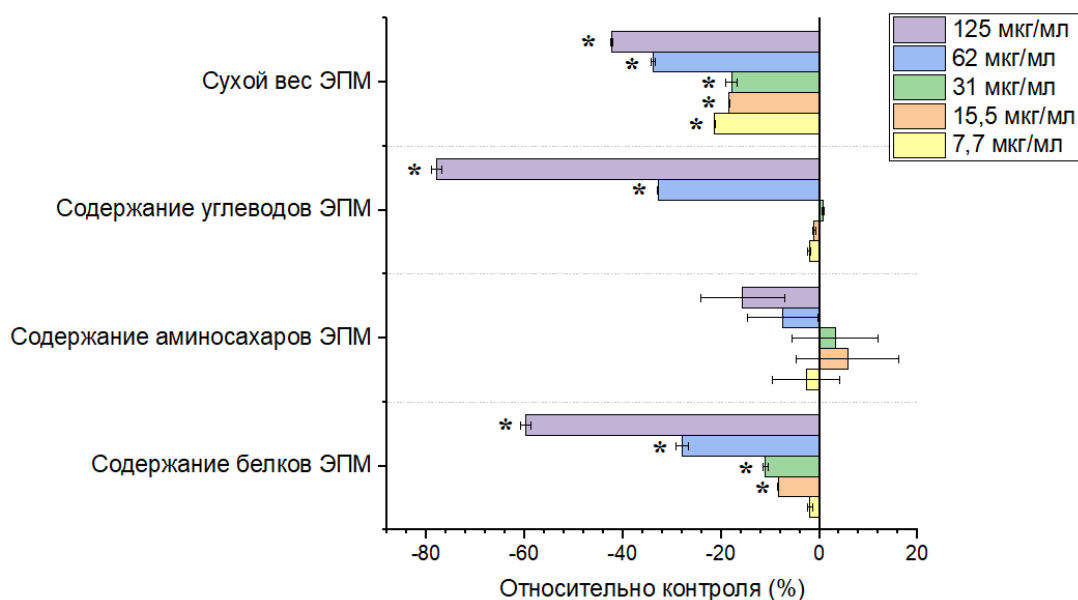


Рисунок 12 - Влияние 2,4-ДАФГ на экзополимерный матрикс формирующихся биоплёнок (48 ч) *A. ochraceus* INA 01112 (Stepanov et al., 2024).

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

3.4. Влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование *Fusarium* spp.

2,4-ДАФГ также способен подавлять процессы биоплёнкообразования у грибов рода *Fusarium*. Впрочем, эффект менее выражен, по сравнению с грибами рода *Aspergillus*.

Так, 2,4-ДАФГ лишь в концентрации 125 мкг/мл (2·МИК) достоверно снижает биомассу формирующихся биоплёнок у *F. solani* VKPM F-890 на $10,0 \pm 4,2\%$, по сравнению с контролем (рисунок 13). Впрочем, 2,4-ДАФГ способен проникать внутрь формирующихся биоплёнок и снижать их жизнеспособность. Так, метаболическая активность биоплёнок, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл (1/8·МИК-2·МИК), была снижена на 30,9-68,0%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 13).

Схожая ситуация наблюдается в действии 2,4-ДАФГ на зрелые, сформированные биоплёнки *F. solani* VKPM F-890. Так, 2,4-ДАФГ снижает общую биомассу зрелых биоплёнок в концентрациях 15,5-125 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $2 \cdot \text{МИК}$) на 1,2-7,9% (рисунок 13). Метаболическая активность зрелых биоплёнок, обработанных 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл, оказывается снижена на 17,8-34,2%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 13).

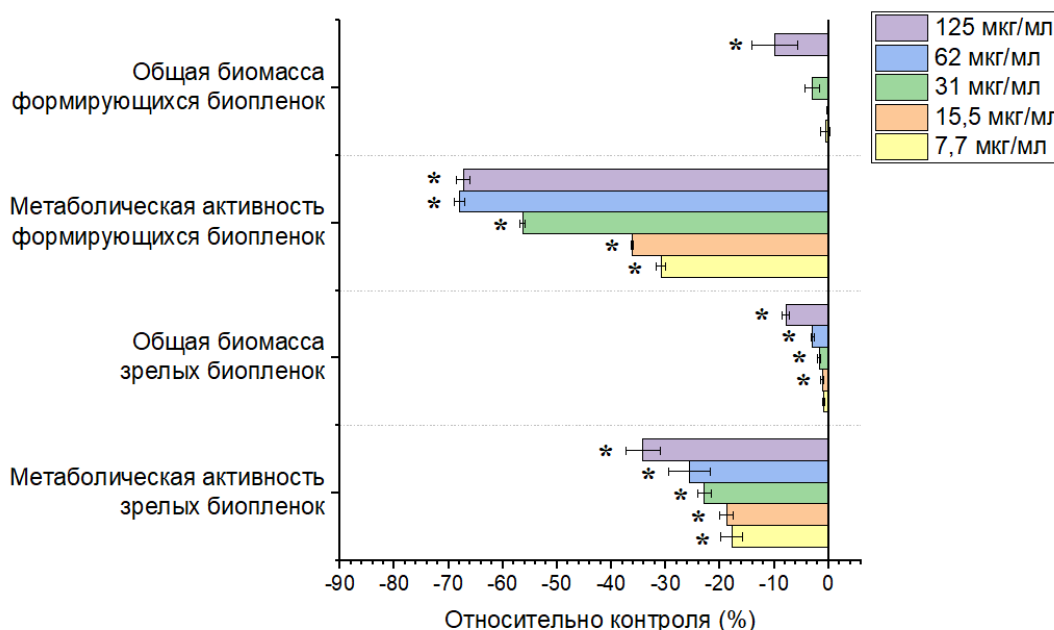


Рисунок 13 - Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся (48 ч) и зрелые (48+24 ч) *F. solani* VKPM F-890 (Stepanov et al., 2024).

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

С помощью сканирующей электронной микроскопии изучена структура сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ биоплёнок *F. solani* VKPM F-890 (Stepanov et al., 2024) (рисунок 14). Показано, что 2,4-ДАФГ способен снижать плотность формирующихся биоплёнок, но лишь в концентрациях близких к ингибиторным ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $1 \cdot \text{МИК}$).

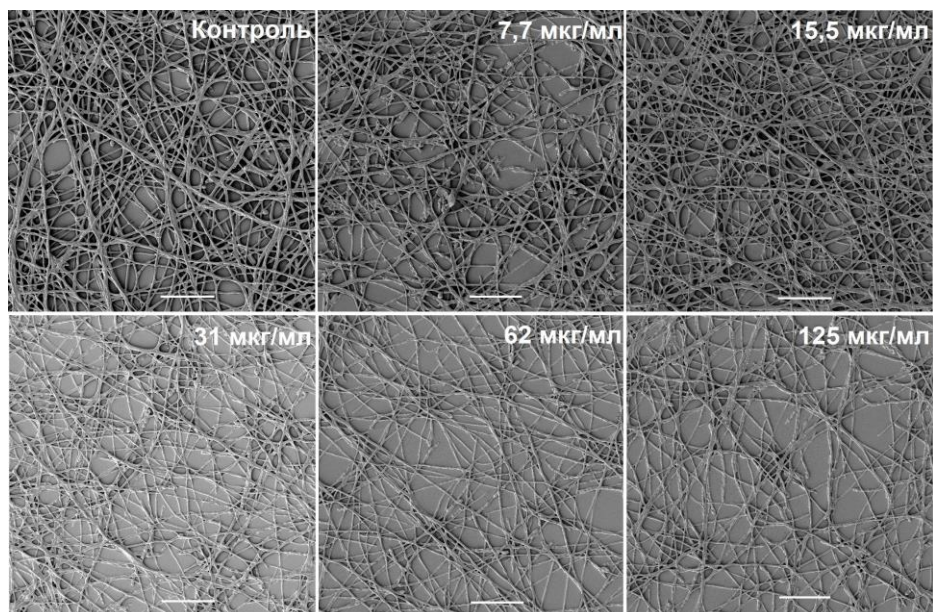


Рисунок 14 – Внешний вид биоплёнок (48 ч) *Fusarium solani* VKPM F-890, сформированных на RPMI-1640 в присутствии 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 50 мкм (Stepanov et al., 2024).

2,4-ДАФГ также подавляет процессы биоплёнкообразования у *F. culmorum* MFG 102100. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 62-125 мкг/мл (1·МИК-2·МИК) снижает общую биомассу формирующихся биоплёнок на 1,7-17,9%, по сравнению с контролем (рисунок 15). В концентрациях 7,7-125 мкг/мл (1/8·МИК-2·МИК) 2,4-ДАФГ снижает метаболическую активность формирующихся биоплёнок на 7,6-60,2%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 15).

Схожая картина наблюдается в действии 2,4-ДАФГ на зрелые биоплёнки. 2,4-ДАФГ не нарушает структуру зрелых, сформированных биоплёнок, но способен проникать через ЭПМ и снижать их жизнеспособность. 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл (1/8·МИК-2·МИК) снижает метаболическую активность зрелых биоплёнок на 21,6-47,0%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 15).

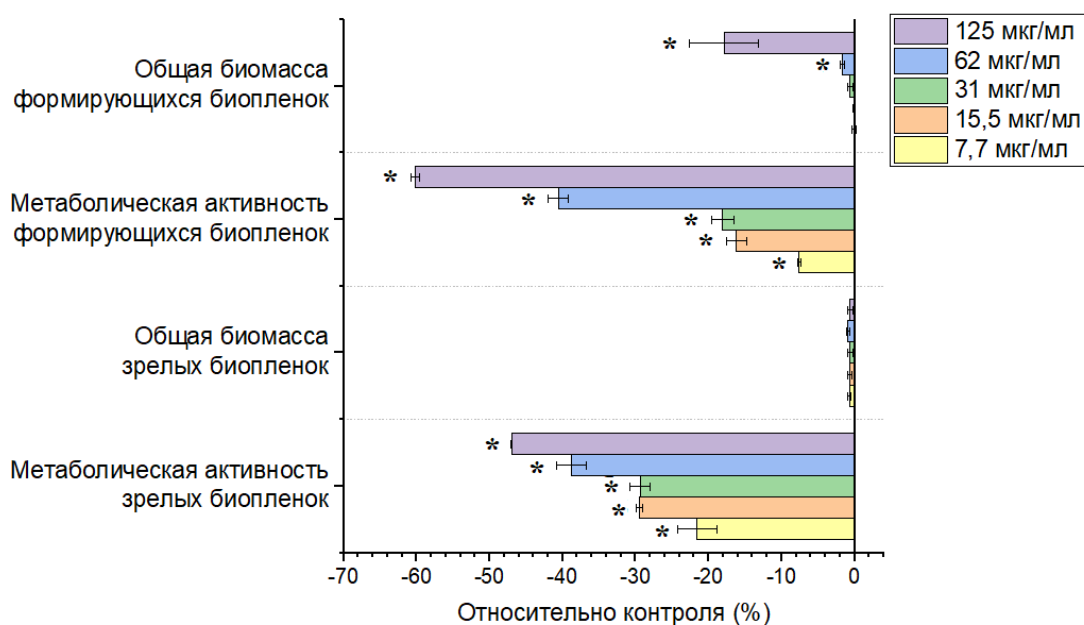


Рисунок 15 - Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся (48 ч) и зрелые (48+24 ч) биоплёнки *F. culmorum* MFG 102100 (Stepanov et al., 2024).

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

С помощью сканирующей электронной микроскопии была изучена структура сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ биоплёнок *F. culmorum* MFG 102100 (Stepanov et al., 2024) (рисунок 16). Как и в случае с *F. solani* VKPM F-890, 2,4-ДАФГ уменьшает плотность формирующихся биоплёнок лишь в концентрациях близких к ингибиторным ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $1 \cdot \text{МИК}$).

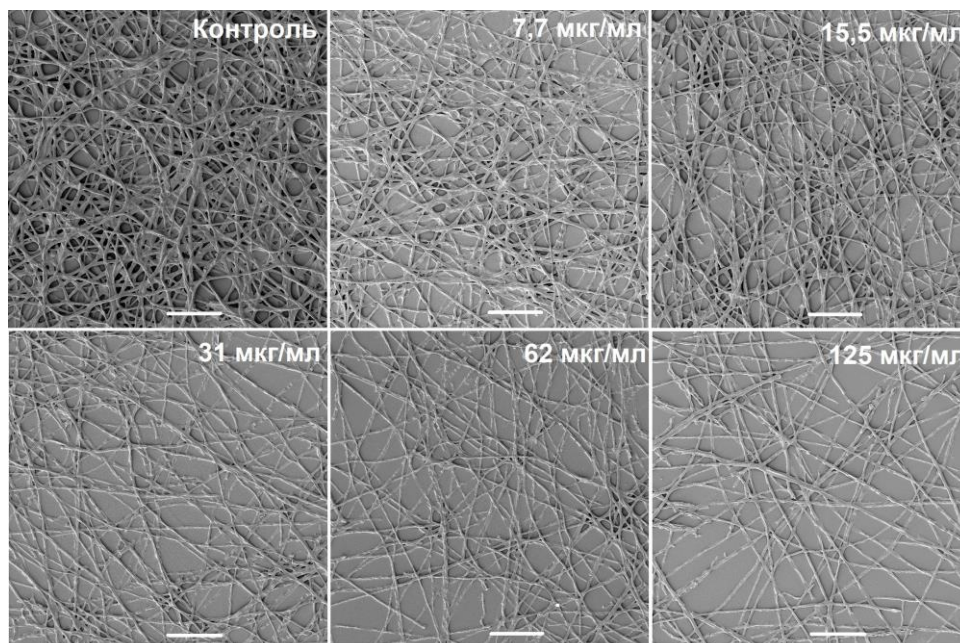


Рисунок 16 – Внешний вид биоплёнок (48 ч) *Fusarium culmorum* MFG 102100, сформированных на RPMI-1640 в присутствии 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 50 мкм (Stepanov et al., 2024).

Влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование *F. sporotrichioides* MFG 11039 оказывается еще менее выраженным. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $2 \cdot \text{МИК}$) снижает общую биомассу и метаболическую активность формирующихся биоплёнок на 2,1-2,9 и 16,8-33,8%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 17).

Аналогично, 2,4-ДАФГ не способен разрушать зрелые биоплёнки *F. sporotrichioides* MFG 11039. Достоверных изменений в показателе общей биомассы у зрелых биоплёнок, обработанных 2,4-ДАФГ, по сравнению с контролем, обнаружено не было. Более того, 2,4-ДАФГ лишь в концентрации 125 мкг/мл ($2 \cdot \text{МИК}$) снижает метаболическую активность зрелых биоплёнок на $10,8 \pm 4,5\%$, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 17).

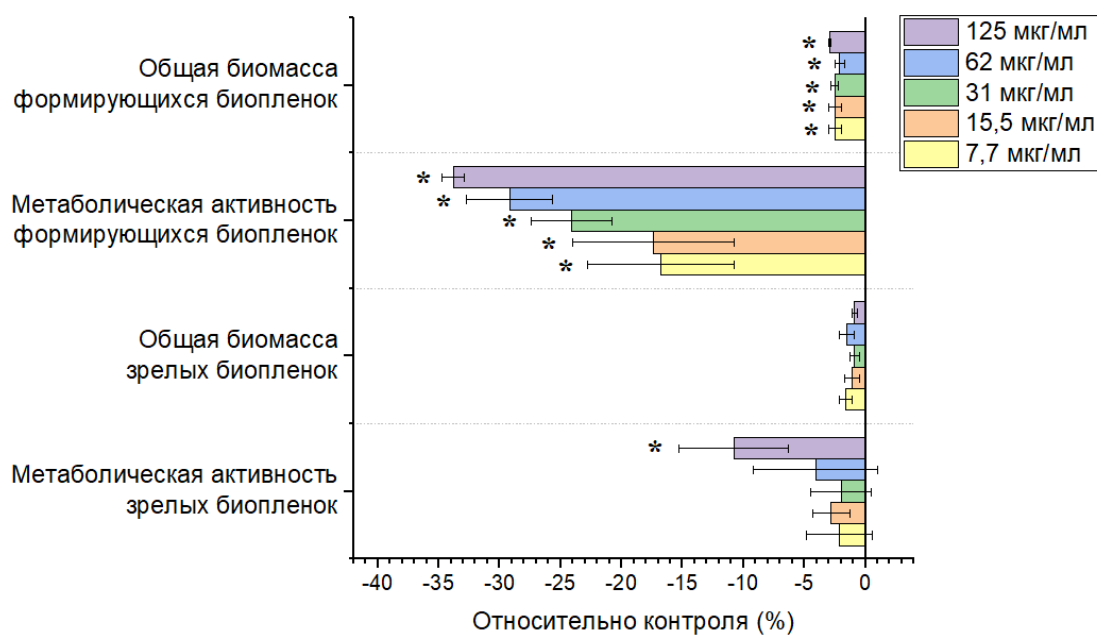


Рисунок 17 - Влияние 2,4-ДАФГ на формирующиеся (48 ч) и зрелые (48+24 ч) биоплёнки *F. sporotrichioides* MFG 11039 (Stepanov et al., 2024).

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

Также с помощью сканирующей электронной микроскопии изучена морфология сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ биоплёнок *F. sporotrichioides* MFG 11039 (Stepanov et al., 2024) (рисунок 18). Эффект был менее выражен, по сравнению с другими штаммами, что коррелировало с показателем общей биомассы формирующихся биоплёнок *F. sporotrichioides* MFG 11039.

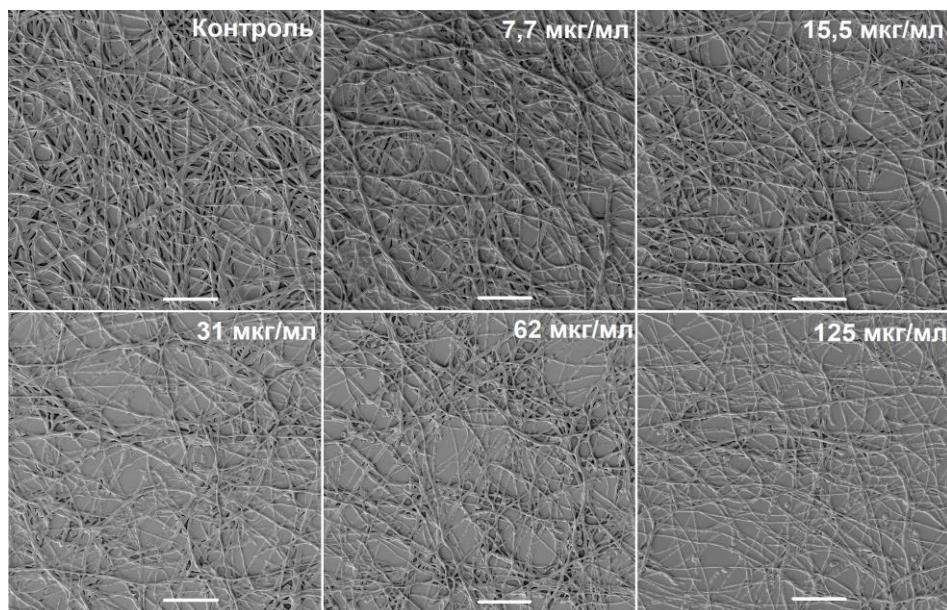


Рисунок 18 – Внешний вид формирующихся биоплёнок (48 ч) *Fusarium sporotrichioides* MFG 11039, сформированных на RPMI-1640 в присутствии 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 50 мкм (Stepanov et al., 2024).

Важно отметить, что влияние 2,4-ДАФГ на биоплёнкообразование грибов рода *Fusarium* согласуется с данными о количественном содержании ЭПМ формирующихся биоплёнок и его компонентов.

Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $2 \cdot \text{МИК}$) снижает сухой вес ЭПМ формирующихся биоплёнок *F. solani* VKPM F-890 на 7,5-33,4%, по сравнению с контролем (рисунок 19). Также продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-125 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $2 \cdot \text{МИК}$) снижает количественное содержание углеводов и белков в ЭПМ биоплёнок на 13,1-33,2 и 8,1-49,8%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 19). Отмечено, что количественное содержание аминокислот в ЭПМ биоплёнок, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 31 и 125 мкг/мл, было меньше на $5,4 \pm 1,8$ и $7,7 \pm 0,3\%$, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 19).

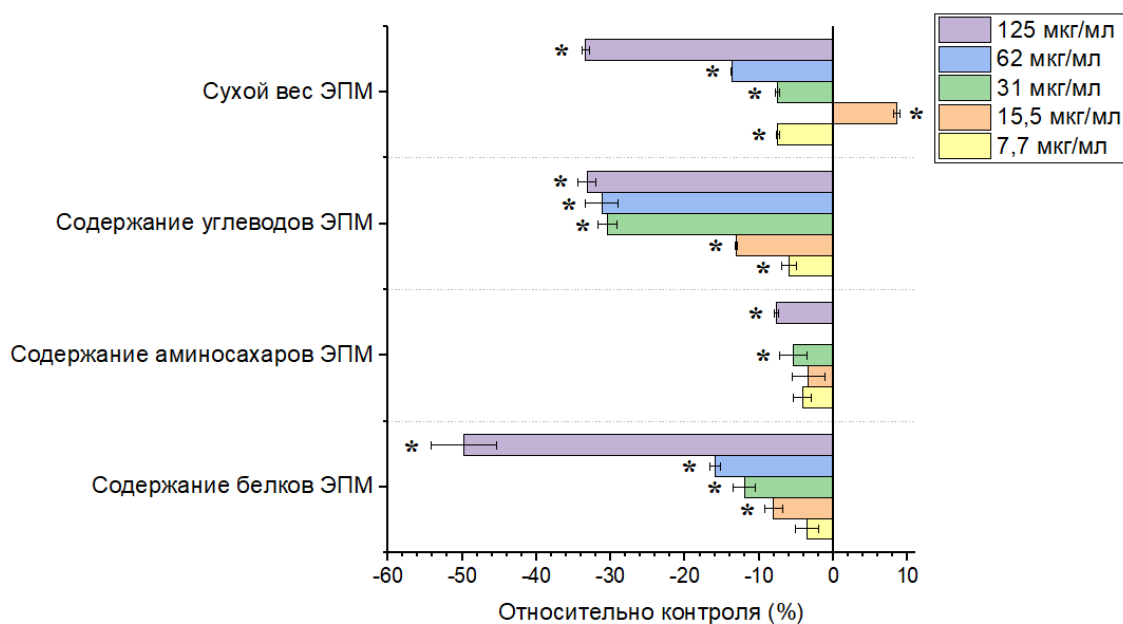


Рисунок 19 - Влияние 2,4-ДАФГ на экзополимерный матрикс формирующихся биоплёнок (48 ч) *Fusarium solani* VKPM F-890 (Stepanov et al., 2024).

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

Влияние 2,4-ДАФГ на содержание экзополимерного матрикса *F. culmorum* MFG 102100 оказывается более выраженным. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 31-125 мкг/мл ($1/2 \cdot \text{МИК} - 2 \cdot \text{МИК}$) снижает сухой вес ЭПМ формирующихся биоплёнок *F. culmorum* MFG 102100 на 17,4-49,4%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 20). Схожие изменения прослеживаются в количественном содержании компонентов ЭПМ биоплёнок. 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-125 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК} - 2 \cdot \text{МИК}$) снижает содержание углеводов и белков в ЭПМ на 29,0-52,5 и 8,3-43,6%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 20). Достоверных изменений в содержании аминсахаров в ЭПМ биоплёнок не было обнаружено.

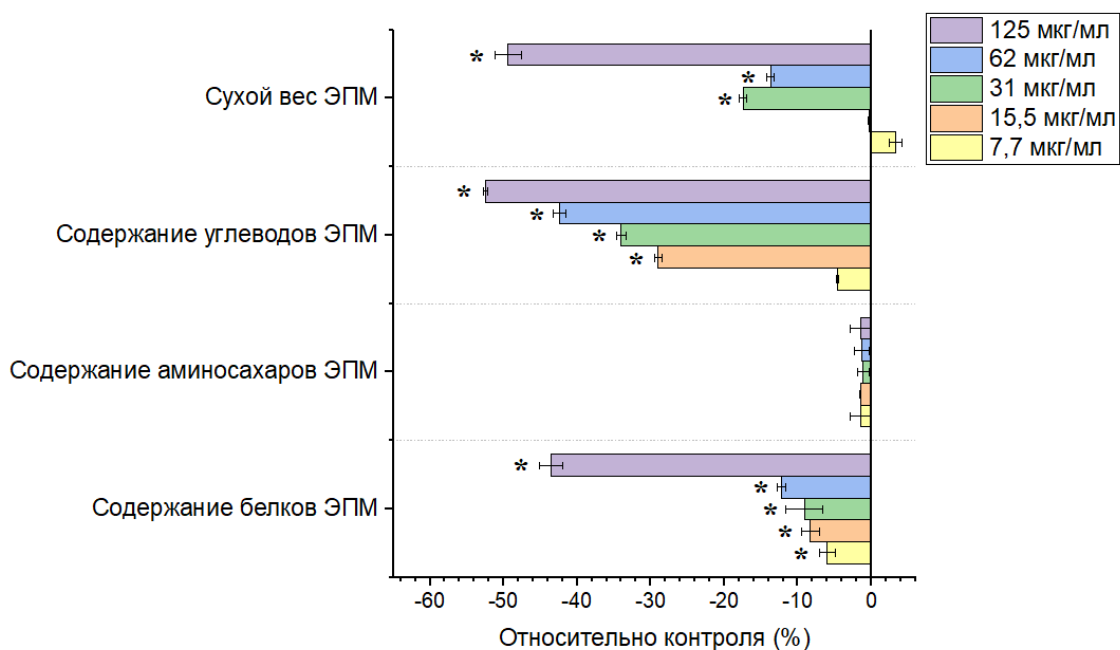


Рисунок 20 - Влияние 2,4-ДАФГ на экзополимерный матрикс формирующихся биоплёнок (48 ч) *Fusarium culmorum* MFG 102100 (Stepanov et al., 2024).

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

Выяснено, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях не способен снижать содержание ЭПМ формирующихся биоплёнок *F. sporotrichioides* MFG 11039. Так, 2,4-ДАФГ лишь в концентрации 125 мкг/мл (2·МИК) снижает сухой вес ЭПМ биоплёнок *F. sporotrichioides* MFG 11039 на $13,9 \pm 0,1\%$, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 21). Тем не менее, можно обнаружить изменения в количественных изменениях структурных компонентов ЭПМ биоплёнок. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл (1/8·МИК-2·МИК) снижает содержание углеводов и белков в ЭПМ биоплёнок на 41,8-48,9 и 10,1-24,3%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 21). Достоверных изменений в содержании аминсахаров в ЭПМ биоплёнок обнаружено не было.

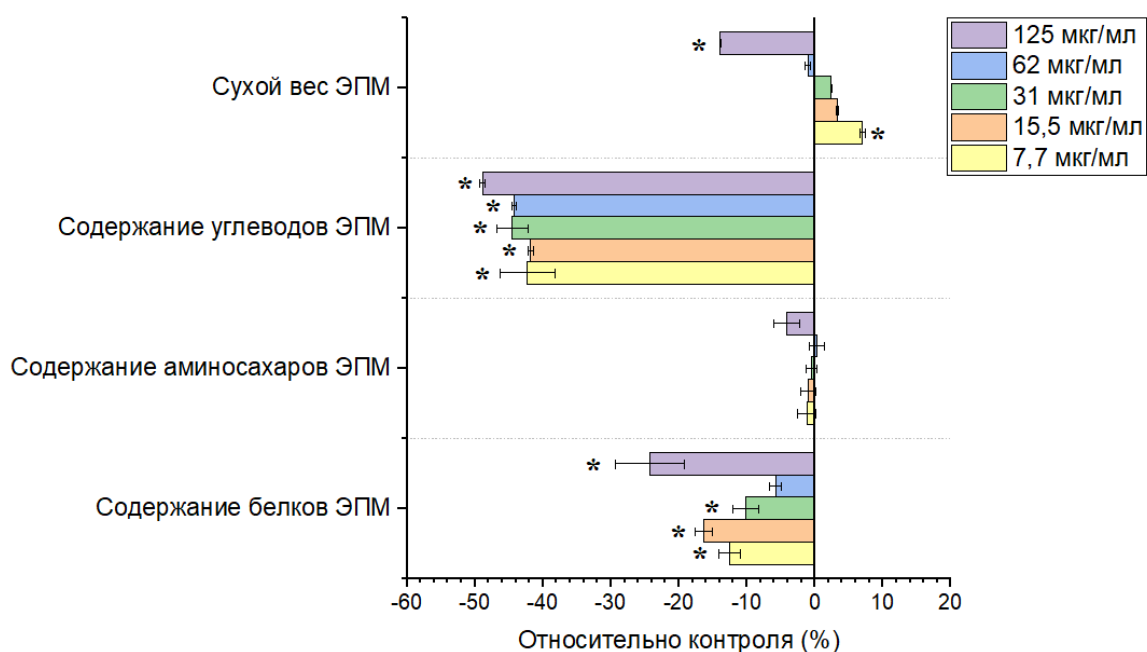


Рисунок 21 - Влияние 2,4-ДАФГ на экзополимерный матрикс формирующихся биоплёнок (48 ч) *Fusarium sporotrichioides* MFG 11039 (Stepanov et al., 2024).

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

Таким образом, выяснено, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ снижают общую биомассу и метаболическую активность формирующихся и зрелых, сформированных биоплёнок грибов рода *Aspergillus* и *Fusarium*. 2,4-ДАФГ не способен разрушать зрелые биоплёнки грибов, но способен проникать в них, нарушая ростовые процессы, что отражается на сниженной жизнеспособности биоплёнок *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp., обработанных 2,4-ДАФГ.

Известно, что соединения с антифунгальной активностью способны подавлять процессы образования биоплёнки у грибов рода *Candida*, *Aspergillus* и *Fusarium* (Antifungal activity of ..., 2015; Synergistic association of clioquinol ..., 2020; Azole-Based Compounds ..., 2022; Natural Compounds ..., 2022).

Выяснено, что 2,4-ДАФГ не способен разрушать зрелые, сформированные биоплёнки, но способен проникать через ЭПМ и снижать их метаболическую активность. Также отмечено, что эффект в отношении зрелых биоплёнок патогенов человека и животных, в частности, *C. albicans* и *A. fumigatus*, был менее выражен. Это можно объяснить тем фактом, что биоплёнкообразование у данных видов является ключевым фактором в адаптации к условиям окружающей среды, в том числе – к внутренней среде организма-хозяина.

Стоит заметить, что изменения затрагивали не только микробную биомассу, но также и ЭПМ биоплёнок. Субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ снижали содержание ЭПМ формирующихся биоплёнок у всех штаммов, за исключением *C. albicans* и *A. fumigatus*. Вместе с тем, было выяснено, что 2,4-ДАФГ снижает количественное содержание углеводов, белков и аминокислот во ЭПМ биоплёнок. Однако, эффект варьировал от штамма к штамму. Так, у биоплёнок *C. albicans*, сформированных в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ, было отмечено снижение содержания только белков, тогда как у грибов рода *Aspergillus* и *Fusarium* – углеводов и белков. По-видимому, 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях подавляет не только рост микробной биомассы, но также и продукцию ЭПМ, обеспечивающего защиту от абиотических факторов.

3.5. Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства культур *C. albicans*

Кроме того, 2,4-ДАФГ влияет на физиолого-биохимические свойства планктонных клеток *C. albicans*. В частности, 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях подавляет процессы мицелиально-дрожжевого диморфизма у *C. albicans*. В частности, это проявляется в подавлении формирования ростовой трубки у дрожжеподобных клеток. 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-62 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) снижает процент сформировавшихся ростовых трубок на 19,6-98,5%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко,

2022; Stepanov et al., 2022; Степанов, Васильченко, 2023) (рисунок 22). Влияние субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ на мицелиально-дрожжевой диморфизм *C. albicans* также находит отражение в отсутствии мицелиального роста культуры на агаризованной питательной среде (рисунок 23).

Стоит заметить, что способность сочетать дрожжеподобный и мицелиальный рост не является уникальной для патогенов человека и животных. Считается, что мицелиально-дрожжевой диморфизм может быть фактором вирулентности в том числе у ряда фитопатогенных грибов, таких как *Mycosphaerella graminicola*, *Taphrina deformans* и *Ophiostoma ulmi* (Nadal et al., 2008).

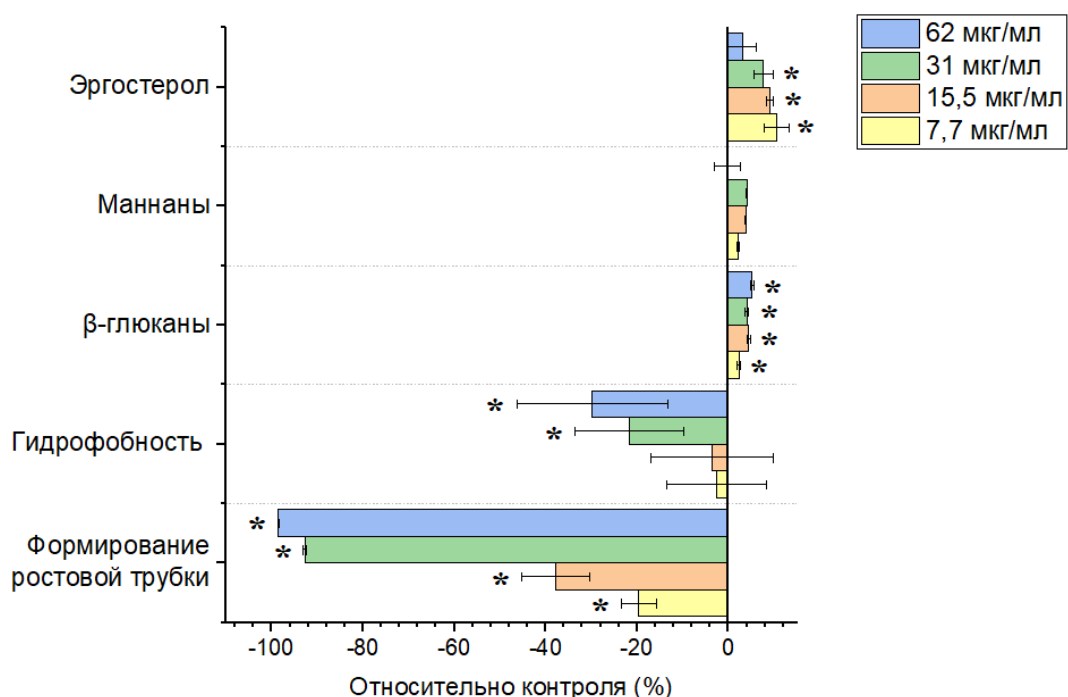


Рисунок 22 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства планктонных культур *C. albicans* ATCC 10231 (Stepanov et al., 2022).

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

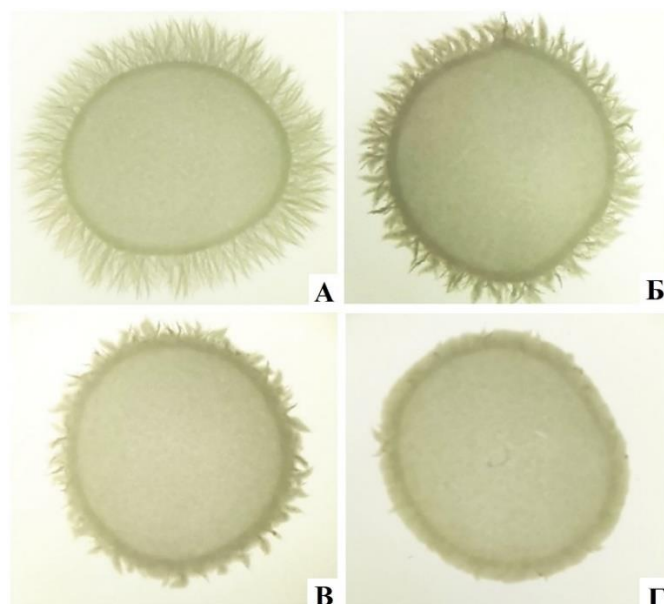


Рисунок 23 - Влияние субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ на мицелиально-дрожжевой диморфизм *C. albicans* ATCC 10231 (среда Spider, 4 сут): А – контроль, Б – 7,7 мкг/мл, В – 15,5 мкг/мл, Г – 31 мкг/мл; звездочкой (*) отмечены статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно контроля (парный t -критерий Стьюдента). (Stepanov et al., 2022).

Вместе с тем, 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях оказывал влияние на гидрофобность клеточной стенки планктонных клеток *C. albicans*. 2,4-ДАФГ в концентрациях 31-62 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) снижал гидрофобность клеточной стенки, по сравнению с контролем, на 21,7-29,8%, соответственно (Степанов, Васильченко, 2022; Stepanov et al., 2022; Степанов, Васильченко, 2023) (рисунок 22).

Также продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях влияет на количественное содержание эргостерола в плазматической стенке *C. albicans*. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-62 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) повышал содержание эргостерола на 3,3-10,5%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2022; Степанов, Васильченко, 2023) (рисунок 22).

2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях также повышает количественное содержание полисахаридов в клеточной стенке планктонных

клеток *C. albicans*. 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-62 мкг/мл (1/16·МИК-1/2·МИК) увеличивает содержание бета-глюканов на 2,3-5,2%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2022; Степанов, Васильченко, 2023) (рисунок 22). Достоверных изменений в количественном содержании маннанов обнаружено не было.

Полученные результаты коррелируют с литературными данными о том, что ингибиторы окислительного фосфорилирования могут влиять на полисахаридный состав клеточной стенки у грибов рода *Candida* (Inhibition of Respiration..., 2020).

3.6. Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства культур *Aspergillus* spp.

Продemonстрировано, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях негативно влияет на гидрофобность клеточной стенки и меланиногенез конидий поверхностных культур *A. fumigatus* UTMN. Так, гидрофобность конидий *A. fumigatus* UTMN, сформированных на КГА в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл (1/16·МИК-1/4·МИК) была достоверно ниже на 19,6-39,6%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023) (рисунок 24).

Помимо этого, содержание меланина в конидиях культур *A. fumigatus* UTMN, сформированных на КГА в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл (1/16·МИК-1/4·МИК), было достоверно ниже на 76,4-82,9%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023) (рисунок 24).

Вместе с тем, достоверных изменений в спороношении *A. fumigatus* UTMN выявлено не было.

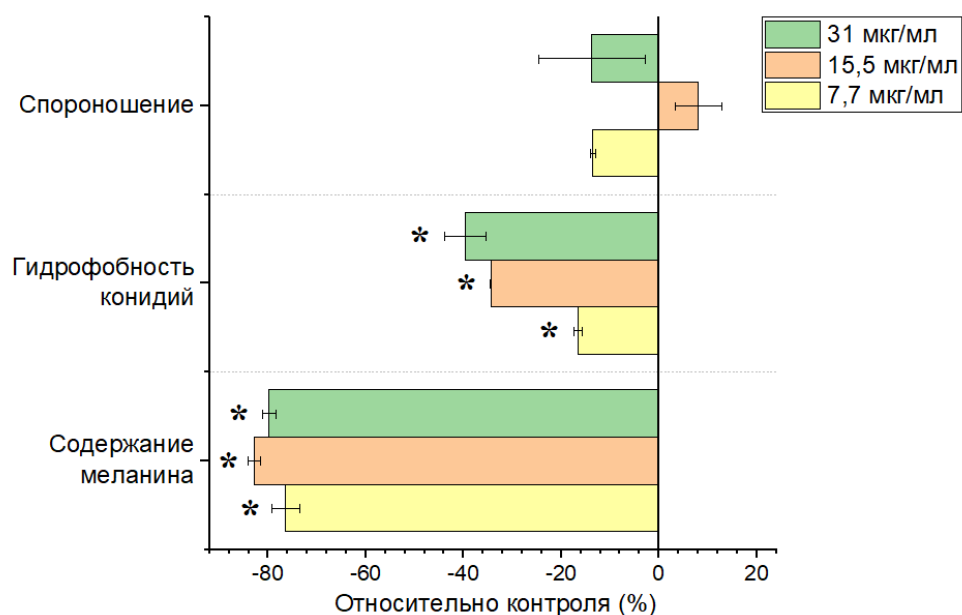


Рисунок 24 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства поверхностных культур (КГА, 5 сут) *A. fumigatus* UTMN (Stepanov et al., 2023).

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

Влияние 2,4-ДАФГ на меланиногенез *A. fumigatus* UTMN также находит отражение на морфологии конидий. На изображениях, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии, можно увидеть различия в структуре клеточной стенки *A. fumigatus* UTMN между культурами, сформированными на КГА в присутствии 2,4-ДАФГ, и свободными от 2,4-ДАФГ культурами (Stepanov et al., 2023) (рисунок 25). Если в контроле поверхность клеточной стенки конидий выглядит шероховатой, то в случае со сформированными в присутствии 2,4-ДАФГ конидиями поверхность является более гладкой. Меланин, обуславливающий шероховатость клеточной стенки конидий, ответственен за их механическую прочность, устойчивость к УФ излучению, а также предположительно связан с вирулентностью (PKSP-dependent reduction ..., 1997; Melanin is an essential ..., 2009). Известно, что фунгициды в субингибиторных концентрациях способны подавлять процессы биосинтеза меланина, в частности 1,8-дигидроксинафталена, у грибов рода *Aspergillus* и *Penicillium* (de la Cruz et al., 2022).

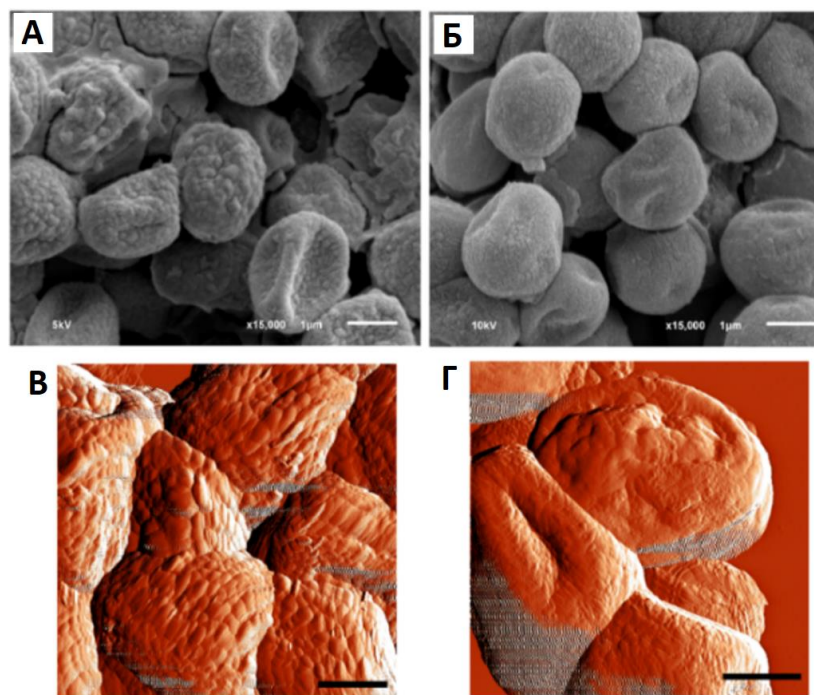


Рисунок 25 - Морфология конидий *A. fumigatus* UTMN, сформированных на КГА (5 сут) в присутствии 2,4-ДАФГ. А, В – контроль, Б, Г – конидии культур, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрации 31 мкг/мл. Масштабная линейка: 1 мкм. (Stepanov et al. 2023).

Сходным образом 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл (1/16·МИК-1/4·МИК) снижает гидрофобность клеточной стенки конидии *A. niger* INA 00890 и *A. ochraceus* INA 01112 на 14,9-28,6 и 9,0-20,1%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунки 26 и 27).

Кроме того, было оценено влияние субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ на меланиногенез *A. niger* INA 00890. Выяснено, что содержание меланина в конидиях, сформированных на КГА в концентрациях 7,7-31 мкг/мл (1/16·МИК-1/4·МИК), снижено на 56,6-85,1%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (Stepanov et al., 2024) (рисунок 26).

Также, 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях подавляет спороношение поверхностных культур *A. niger* INA 00890 и *A. ochraceus* INA 01112. Выяснено, что спороношение у культур *A. niger* INA 00890 и *A. ochraceus* INA 01112, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в

концентрациях 15,5-31 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1/4 \cdot \text{МИК}$), снижено на 51,5-69,1 и 31,1-38,2%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунки 26 и 27).

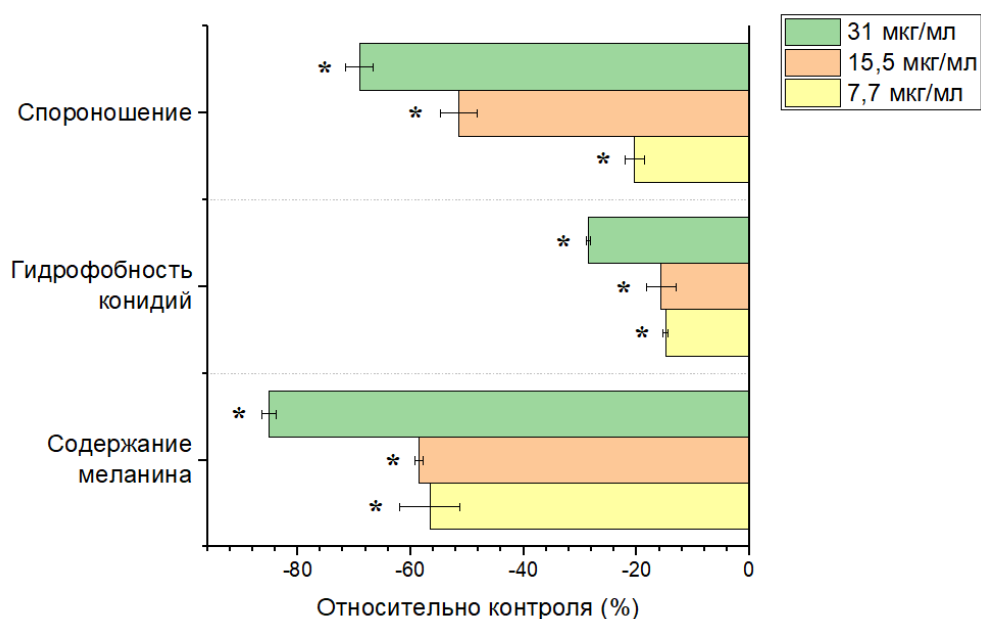


Рисунок 26 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства поверхностных культур (КГА, 5 сут) *A. niger* INA 00890 (Stepanov et al., 2024).

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

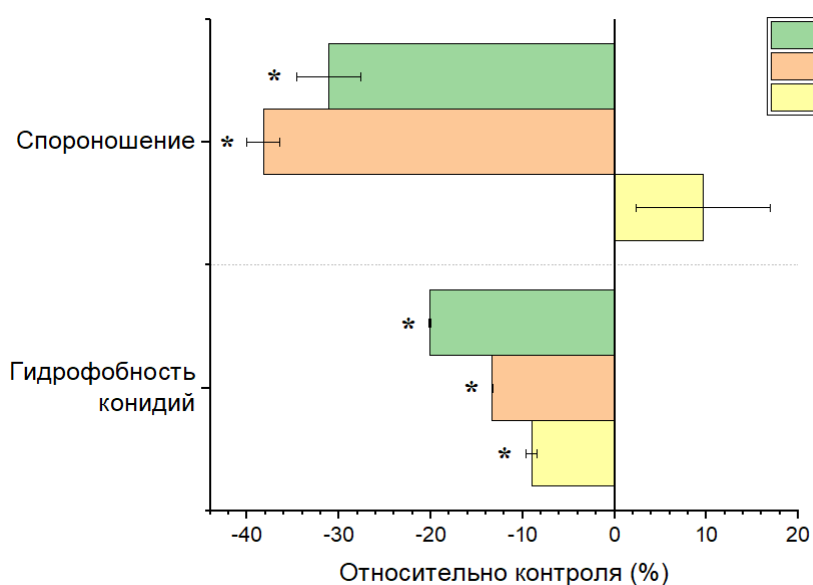


Рисунок 27 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства поверхностных культур (КГА, 5 сут) *A. ochraceus* INA 01112 (Stepanov et al., 2024).

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

Также была проанализирована морфология конидий *A. niger* INA 00890 и *A. ochraceus* INA 01112 (Stepanov et al., 2024) (рисунки 28 и 29). Несмотря на снижение гидрофобности клеточной стенки у конидий, сформированных на КГА в присутствии 2,4-ДАФГ, достоверных изменений в их морфологии, по сравнению с контролем, выявлено не было.

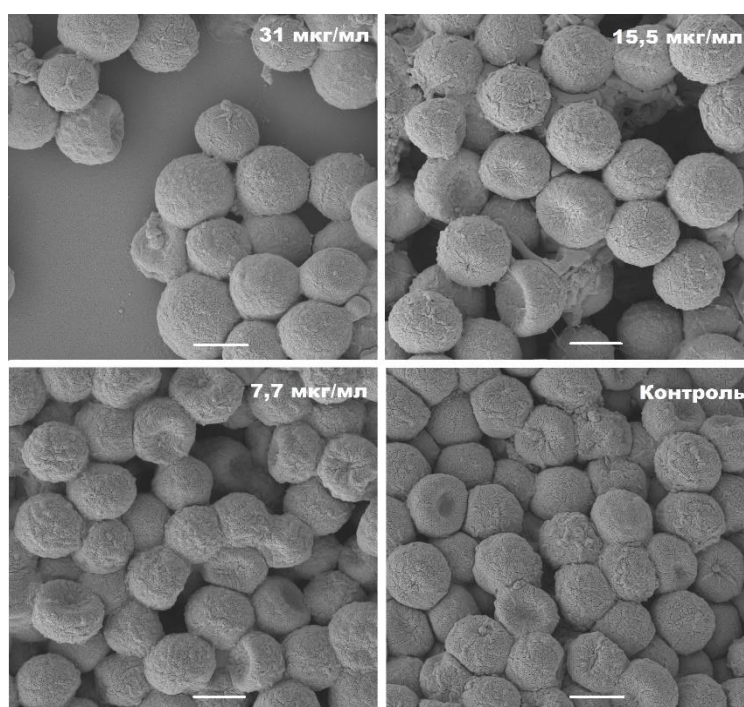


Рисунок 28 - Морфология конидий *Aspergillus niger* INA 00890, сформированных на КГА (5 сут) в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 2 мкм (Stepanov et al., 2024).

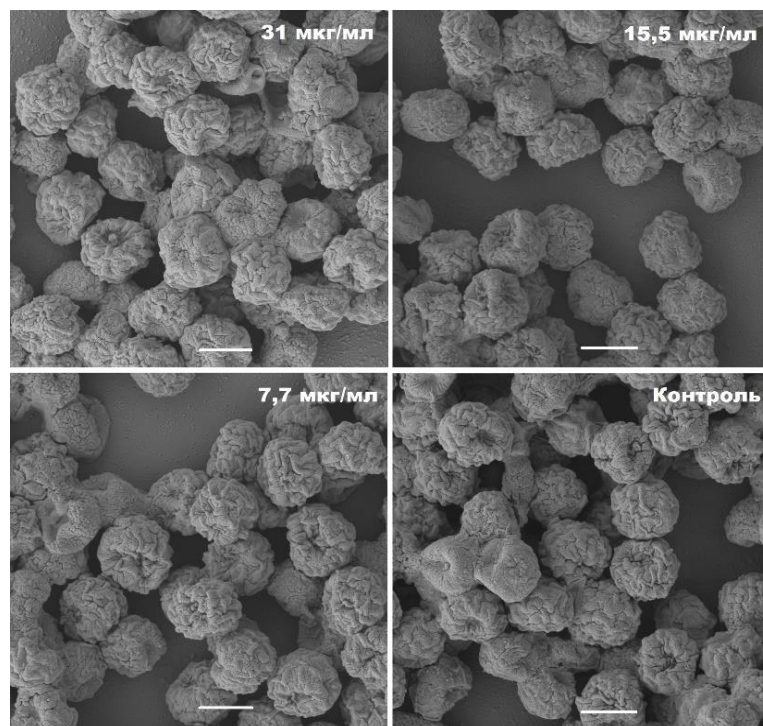


Рисунок 29 - Морфология конидий *Aspergillus ochraceus* INA 01112, сформированных на КГА (5 сут) в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 2 мкм (Stepanov et al., 2024).

2,4-ДАФГ оказывает влияние также на физиолого-биохимические показатели погруженных культур грибов рода *Aspergillus*. Отмечено, что содержание эргостерола, ключевого компонента плазматической мембраны грибов, в культурах *A. fumigatus* UTMN, сформированных в среде СУА в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл (1/16·МИК-1/4·МИК), больше на 12,1-43,8%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023) (рисунок 30). Изменения в содержании эргостерола у культур *A. niger* INA 00890 обнаружены лишь в концентрации 31 мкг/мл (1/4·МИК). У сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ культур *A. niger* содержание эргостерола оказывается выше на $13,0 \pm 4,3\%$, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 31). В случае с *A. ochraceus* INA 01112 достоверных изменений в содержании эргостерола, по сравнению с контролем, выявлено не было (рисунок 32).

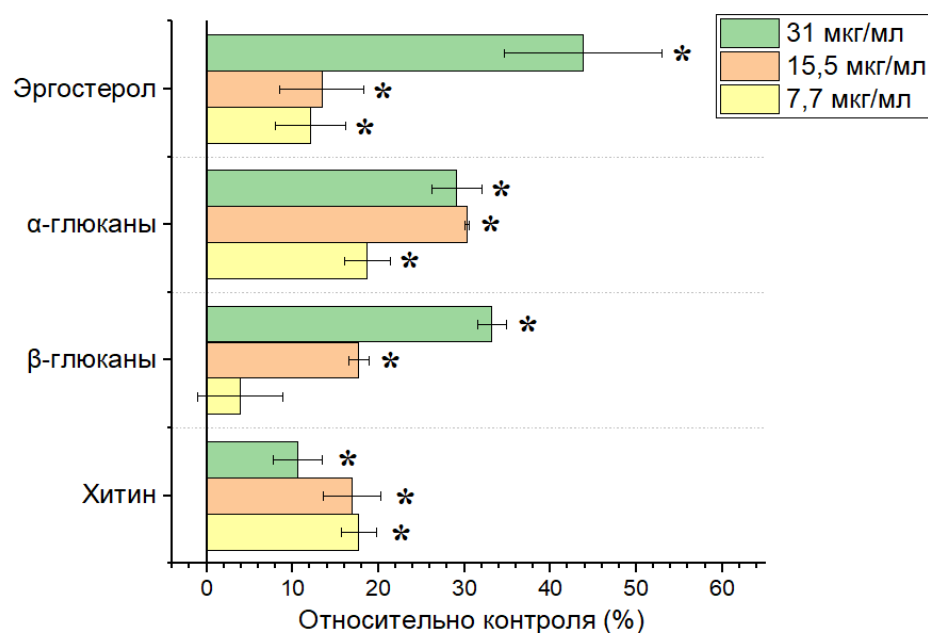


Рисунок 30 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства погруженных культур (среда СYA, 4 сут) *A. fumigatus* UTMN (Stepanov et al., 2023).

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

Физиолого-биохимические изменения в погруженных культурах *A. fumigatus* UTMN, *A. niger* INA 00890 и *A. ochraceus* INA 01112, вызванные действием 2,4-ДАФГ, также находят отражение и в содержании ключевых полисахаридов клеточной стенки мицелия.

Содержание альфа-глюканов, матричных полисахаридов клеточной стенки грибов, в культурах *A. fumigatus* UTMN и *A. niger* INA 00890, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК}$ - $1/4 \cdot \text{МИК}$), было достоверно выше на 18,7-30,3 и 7,5-10,0%, соответственно, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023; Stepanov et al., 2024) (рисунки 30 и 31). Увеличение содержания альфа-глюканов в культурах *A. ochraceus* INA 01112 отмечено только в концентрации 31 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$) и составляет $17,3 \pm 0,1\%$, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 32).

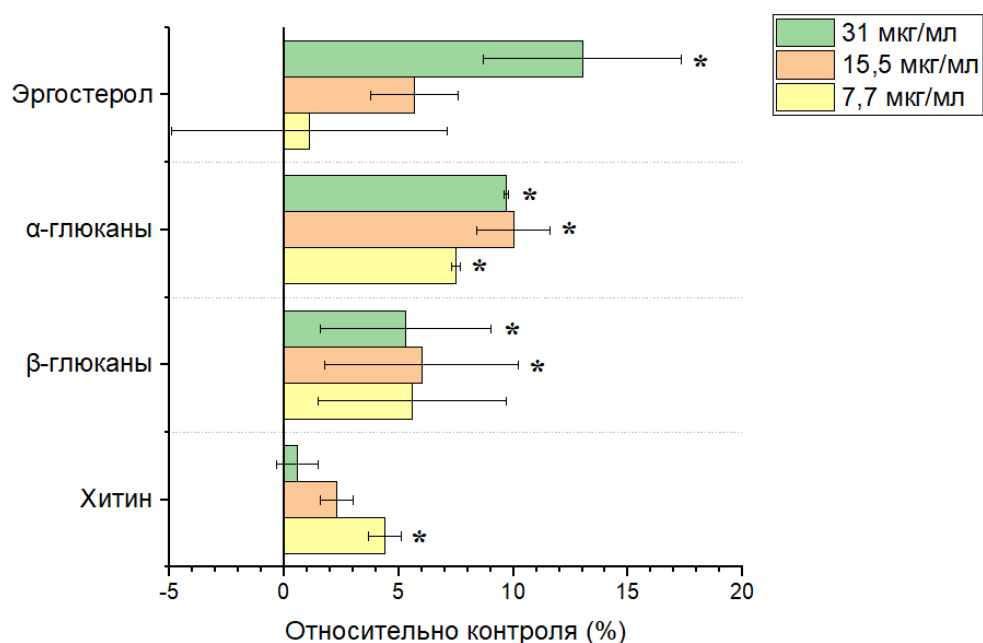


Рисунок 31 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства погруженных культур (среда CYA, 4 сут) *A. niger* INA 00890 (Stepanov et al., 2024).

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

Содержание бета-глюканов, структурных полисахаридов клеточной стенки грибов, в культурах *A. fumigatus* UTMN и *A. niger* INA 00890, обработанных 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-31 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1/4 \cdot \text{МИК}$) было выше на 17,7-33,2 и 5,3-6,0%, соответственно (рисунок 30 и 31). В случае с *A. ochraceus* INA 01112 увеличение содержания бета-глюканов было отмечено лишь в концентрации 31 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$) и составило $23,5 \pm 3,9\%$ относительно контроля (рисунок 32).

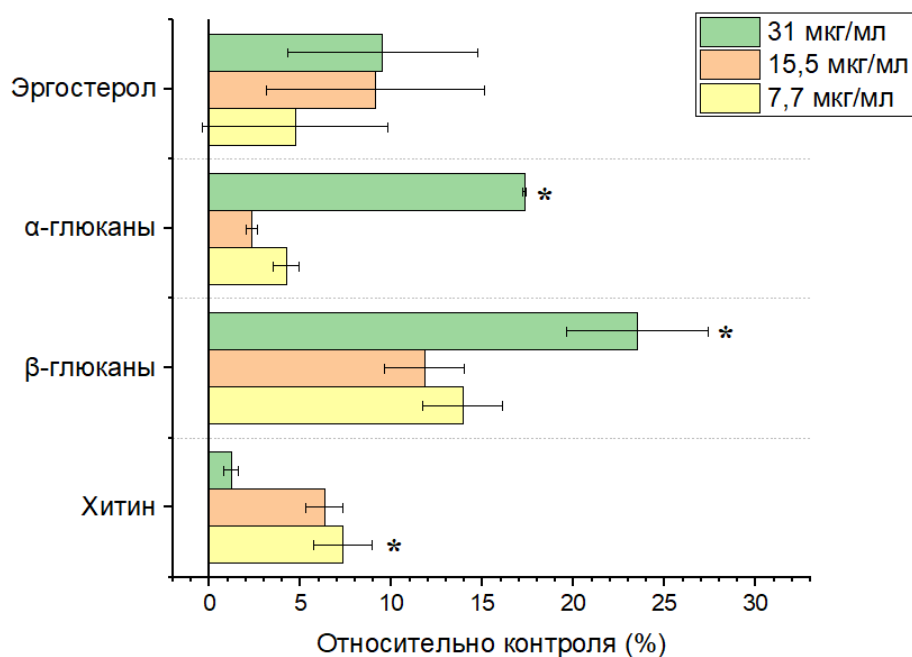


Рисунок 32 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства погруженных культур (среда СYA, 4 сут) *A. ochraceus* INA 01112 (Stepanov et al., 2024).

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

Содержание хитина, ключевого структурного полисахарида клеточной стенки грибов, в культурах *A. fumigatus* UTMN, сформированных 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК}$ - $1/4 \cdot \text{МИК}$), было больше на 10,6-17,7%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2023) (рисунок 30). Стоит отметить, что 2,4-ДАФГ в концентрации 7,7 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК}$) увеличивает содержание хитина в культурах *A. niger* INA 00890 и *A. ochraceus* INA 01112 на $4,4 \pm 0,7$ и $7,3 \pm 1,6\%$, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 31 и 32).

Грибы рода *Aspergillus* являются космополитами, приспособленными к существованию в различных условиях окружающей среды, и обладают выраженной пластичностью физиолого-биохимических адаптации. Известно, что увеличение содержания эргостерола в плазматической мембране и полисахаридов в клеточной стенке может быть следствием адаптации

микровицетов к стресс-факторам, в том числе – субингибиторным концентрациям фунгицидов (The cell wall ..., 2004; Состав и содержание ..., 2006; Sterol Composition of ..., 2018; Satish, Perlin, 2019; Ильина и соавт., 2020; Chitin biosynthesis in *Aspergillus* ..., 2023; Latgé, 2023).

3.7. Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства культур *Fusarium* spp.

Было оценено влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические показатели поверхностных и погруженных культур грибов рода *Fusarium*.

Так, 2,4-ДАФГ способен нарушать гидрофобные свойства мицелия поверхностных культур грибов рода *Fusarium*. Выяснено, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-31 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) снижает гидрофобность мицелия поверхностной культуры *F. solani* VKPM F-890, что отразилось в его смачиваемости водными растворами красителей (Stepanov et al., 2024) (рисунок 33). Достоверных различий в показателе гидрофобности мицелия у культур *F. culmorum* MFG 102100 и *F. sporotrichioides* MFG 11039, сформированных в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ, обнаружено не было (Stepanov et al., 2024) (рисунки 34 и 35).

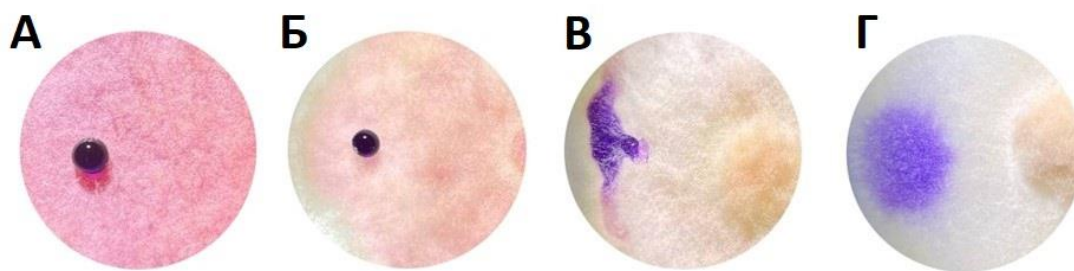


Рисунок 33 - Гидрофобность клеточной стенки мицелия *Fusarium solani* VKPM F-890, сформированного на КГА (7 сут) в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ. А – контроль, В – 7,7 мкг/мл, С – 15,5 мкг/мл, D – 31 мкг/мл (Stepanov et al., 2024).

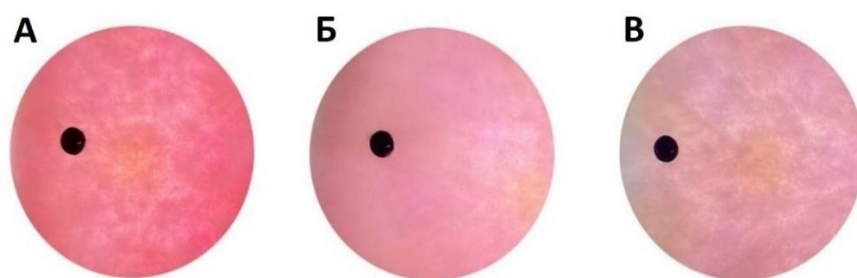


Рисунок 34 - Гидрофобность клеточной стенки мицелия *Fusarium culmorum* MFG 102100, сформированного на КГА (7 сут) в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ. А – контроль, Б – 7,7 мкг/мл, В – 15,5 мкг/мл (Stepanov et al., 2024).

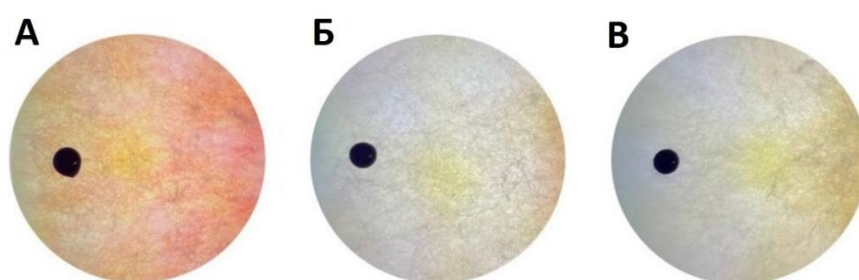


Рисунок 35 - Гидрофобность клеточной стенки мицелия *Fusarium sporotrichioides* MFG 11039, сформированного на КГА (7 сут) в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ. А – контроль, Б – 7,7 мкг/мл, В – 15,5 мкг/мл (Stepanov et al., 2024).

С помощью сканирующей электронной микроскопии была оценена морфология конидий, сформированных в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ (Stepanov et al., 2024) (рисунок 36).

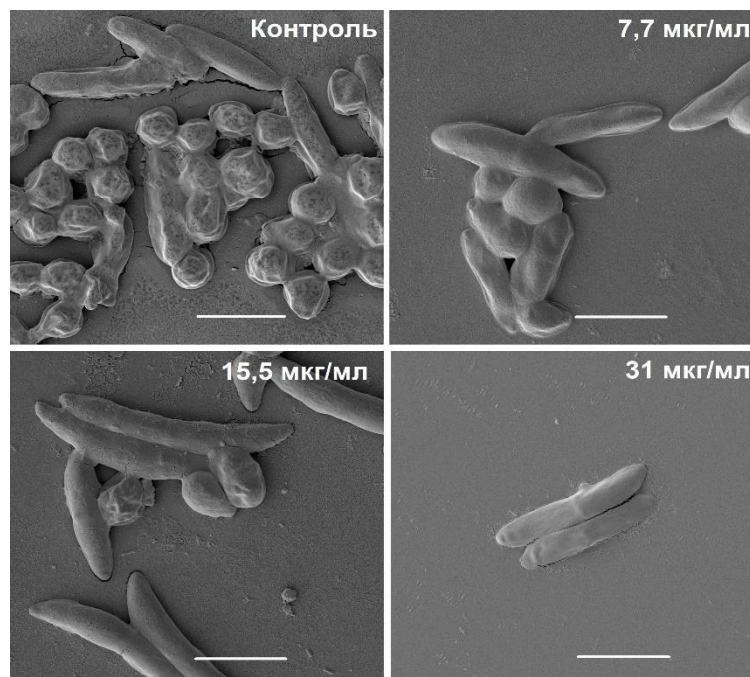


Рисунок 36 - Морфология конидий культур *Fusarium solani* VKPM F-890, сформированных на КГА (7 сут) в присутствии субингибиторных концентраций 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 10 мкм. (Stepanov et al. 2024).

Продemonстрировано, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ не влияют на морфологию конидий, но нарушают процессы конидиогенеза. Так, у культур *F. solani* VKPM F-890, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$), наблюдаются преимущественно макроконидии, тогда как в контроле встречаются главным образом микроконидии (рисунок 37).

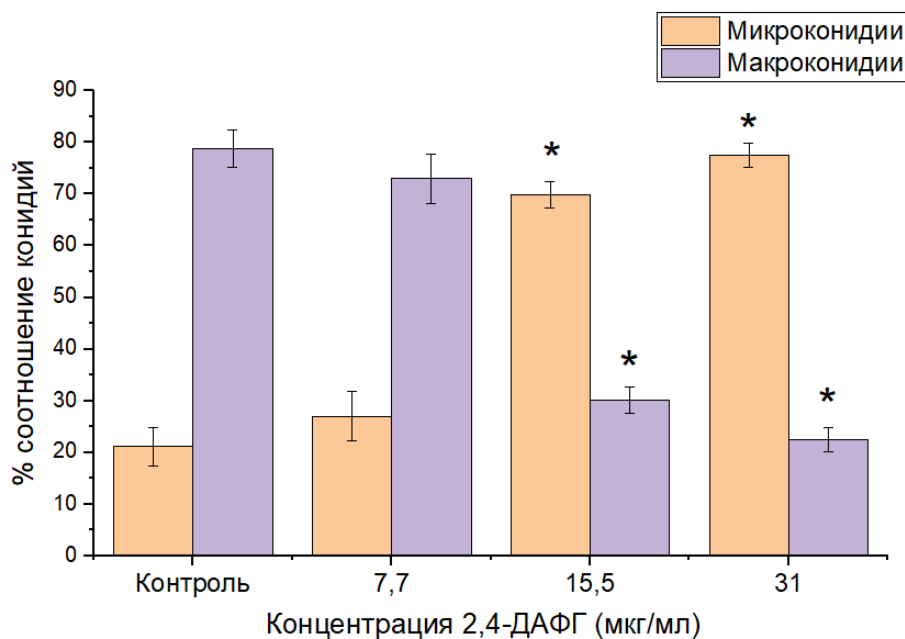


Рисунок 37 – Влияние 2,4-ДАФГ на конидиогенез культур (КГА, 7 сут) *Fusarium solani* VKPM F-890.

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

Вышеуказанные эффекты 2,4-ДАФГ в отношении *F. solani* VKPM F-890, 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 мицелия и паттерна конидиогенеза (FvVE1 regulates filamentous ..., 2006).

Достоверных изменений в морфологии конидии *F. culmorum* MFG 102100 и *F. sporotrichioides* MFG 11039, сформированных в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ, по сравнению с контролем, обнаружено не было (Stepanov et al., 2024) (рисунки 38 и 39).

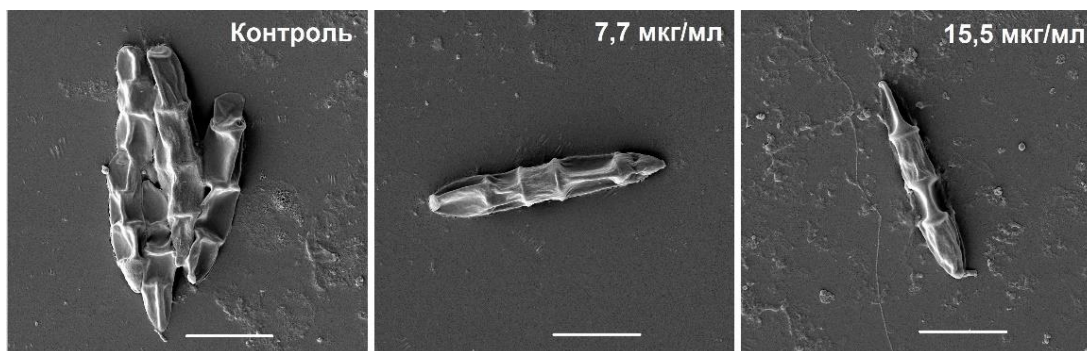


Рисунок 38 - Морфология конидий культур *Fusarium culmorum* MFG 102100, сформированных на КГА (7 сут) в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 10 мкм (Stepanov et al., 2024).

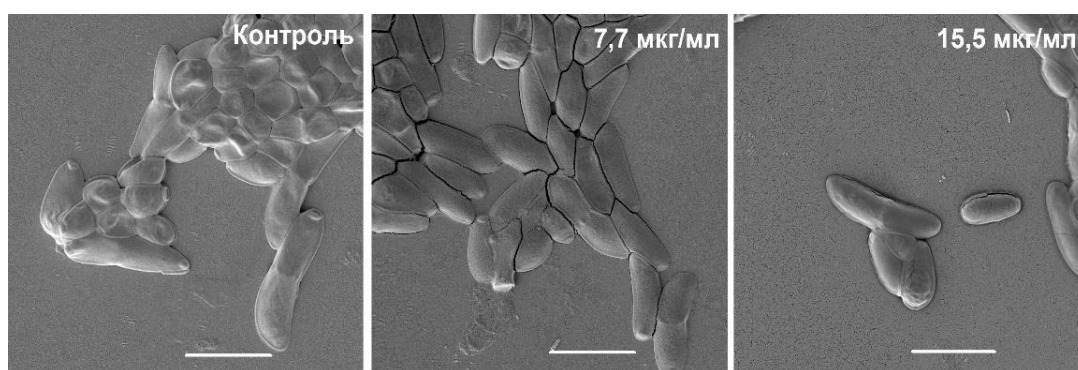


Рисунок 39 – Морфология культур конидий *Fusarium sporotrichioides* MFG 11039, сформированных на КГА (7 сут) в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ. Масштабная линейка: 10 мкм (Stepanov et al., 2024).

2,4-ДАФГ также оказывает влияние на физиолого-биохимические параметры погруженных культур грибов рода *Fusarium*.

Выяснено, что количественное содержание эргостерола у культур, сформированных в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ, оказывается меньше, по сравнению с контролем. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) снижает содержание эргостерола *F. solani* VKPM F-890 и *F. sporotrichioides* MFG 11039 на 9,0-56,3 и 6,7-9,6%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунки 40 и 42). 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-31 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) снижает содержание эргостерола у *F. culmorum* MFG 102100 на 24,0-24,4%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 41).

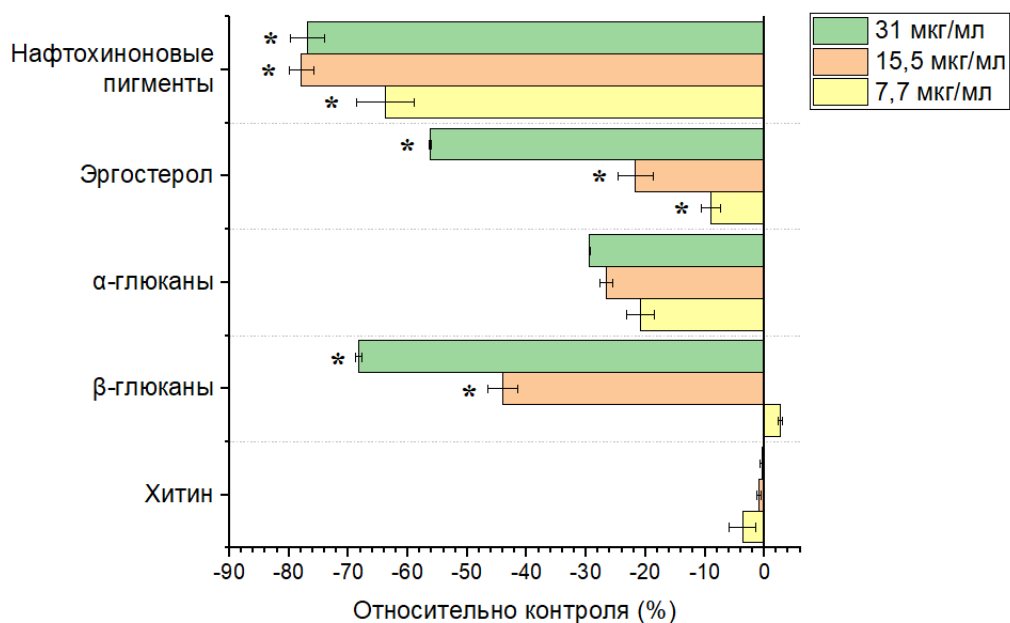


Рисунок 40 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства погруженных культур (КГБ, 7 сут) *F. solani* VKPM F-890 (Stepanov et al., 2024).

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

Изменения, вызванные действием субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ, находят отражение в содержании ключевых полисахаридов клеточной стенки мицелия культур грибов рода *Fusarium*. В частности, содержание альфа- и бета-глюканов, а также хитина, в мицелии культур *Fusarium* spp., сформированных в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ, оказывается достоверно ниже, по сравнению с контролем.

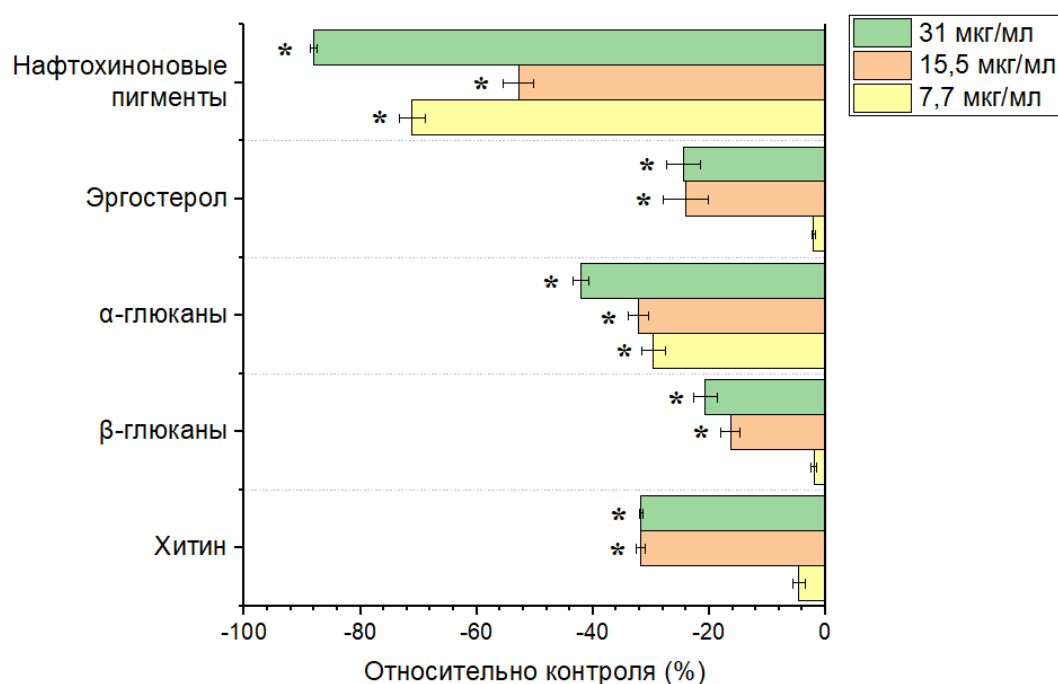


Рисунок 41 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства погруженных культур (КГБ, 7 сут) *F. culmorum* MFG 102100 (Stepanov et al., 2024).

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

2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-31 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) увеличивает содержание альфа-глюканов у *F. sporotrichioides* MFG 11039 и бета-глюканов у *F. solani* VKPM F-890 на 36,2-40,3 и 44,1-68,3%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунки 40 и 42). В случае с *F. culmorum* MFG 102100 соинкубирование с 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-31 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) ведет к увеличению содержания альфа- и бета-глюканов, а также хитина на 32,2-42,1, 16,4-20,7 и 31,6-31,8%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 41).

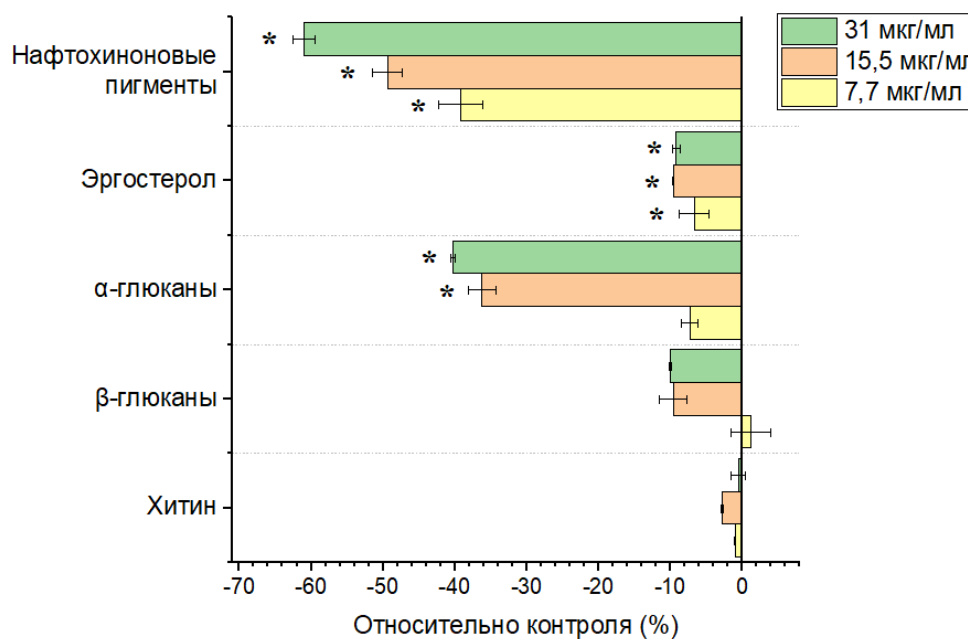


Рисунок 42 - Влияние 2,4-ДАФГ на физиолого-биохимические свойства погруженных культур (КГБ, 7 сут) *F. sporotrichioides* MFG 11039 (Stepanov et al., 2024).

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

Отмечено, что 2,4-ДАФГ снижает содержание нафтохиноновых пигментов, соединений, обладающих антимикробной и антиоксидантной активностью, в мицелии грибов рода *Fusarium*. Продemonстрировано, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл (1/8·МИК-1/2·МИК) снижает содержание нафтохиноновых пигментов *F. solani* VKPM F-890, *F. culmorum* MFG 102100 и *F. sporotrichioides* MFG 11039 на 63,8-77,9, 39,2-61,0 и 52,8-88,1%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунки 40, 41 и 42).

Изменения, обнаруженные у грибов рода *Aspergillus* и *Fusarium*, могут быть обусловлены их принадлежностью к различным экологическим группам. Известно, что соединения с антифунгальной активностью могут уменьшать содержание полисахаридов в клеточной стенке у грибов рода *Fusarium*

(Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium ..., 2021; Chitin biosynthesis in *Aspergillus* ..., 2023; Natural product osthole ..., 2023).

Таким образом, было выяснено, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях способен влиять на физиолого-биохимические характеристики культур микромицетов. Показано, что данные изменения в определенной степени зависят от эколого-трофической принадлежности микромицетов.

3.8. Влияние 2,4-ДАФГ на вторичный метаболизм *C. albicans*

Продemonстрировано, что 2,4-ДАФГ модулирует вторичный метаболизм *C. albicans*. Это наблюдается в изменении продукции молекулы «чувства кворума» тирозола и секреции внеклеточных протеолитических ферментов.

Было выяснено, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-31 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1/4 \cdot \text{МИК}$) снижает продукцию тирозола планктонными клетками *C. albicans* на 62,1-76,2%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2022) (рисунок 43). Аналогично, 2,4-ДАФГ в концентрациях 62-250 мкг/мл ($1/2 \cdot \text{МИК}$ - $2 \cdot \text{МИК}$) снижает продукцию тирозола биоплёнками *C. albicans* на 24,1-76,2%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2022) (рисунок 43).

Межклеточная коммуникация, осуществляемая низкомолекулярными соединениями, т.н. система «чувства кворума» является фактором патогенности микроорганизмов, в том числе - грибов (Хайтович, Мурейко, 2018; Ларюшина, 2020). Известно, что некоторые вторичные метаболиты микроорганизмов, в том числе с антимикробной активностью, обладают способностью нарушать систему «чувства кворума» (Fungal Quorum-Sensing ..., 2019; Rosier et al., 2021). По-видимому, 2,4-ДАФГ является может играть роль мессенджера, и таким образом влиять на жизнедеятельность микроорганизмов, нарушая их межклеточную коммуникацию.

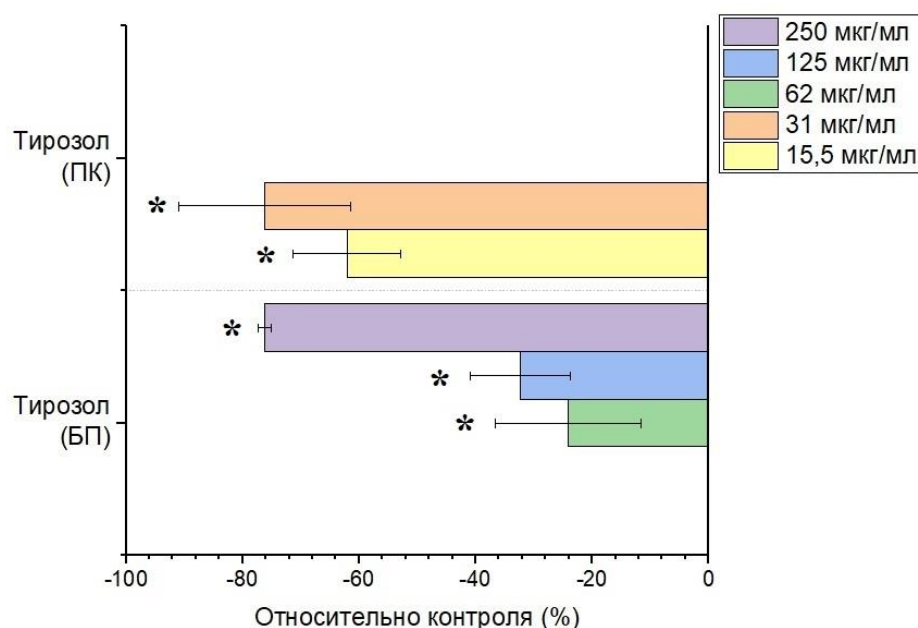


Рисунок 43 - Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию тирозола у культур *C. albicans* ATCC 10231 (среда YPD, 24 ч) (Stepanov et al., 2022).

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

Показано, что 2,4-ДАФГ усиливает продукцию внеклеточных протеолитических ферментов в концентрациях выше 31 мкг/мл. концентрации 62 мкг/мл ($1/2 \cdot \text{МИК}$) 2,4-ДАФГ повышает секрецию внеклеточных протеаз у планктонных клеток *C. albicans* на $16,1 \pm 4,5\%$, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2022; Stepanov et al., 2022) (рисунок 44). В случае с биоплёнками эффект был более выраженным. 2,4-ДАФГ в концентрациях 62-250 мкг/мл ($1/2 \cdot \text{МИК}$ - $2 \cdot \text{МИК}$) повышал секрецию внеклеточных протеаз у биоплёнок *C. albicans* на 107,1-330,0%, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2022; Stepanov et al., 2022) (рисунок 44).

Данный эффект прослеживается у всех без исключения исследуемых тест-штаммов. Увеличение продукции внеклеточных протеолитических ферментов предположительно является общей, неспецифической реакцией грибов на стресс-факторы. Известно, что субингибиторные концентрации антифунгальных соединений могут повышать активность внеклеточных

ферментов у некоторых грибов. Так, на примере грибов рода *Candida* показано, что триазолы могут повышать протеазную активность *in vitro* (Azole antifungals induce ..., 2008; Guimarães et al., 2019).

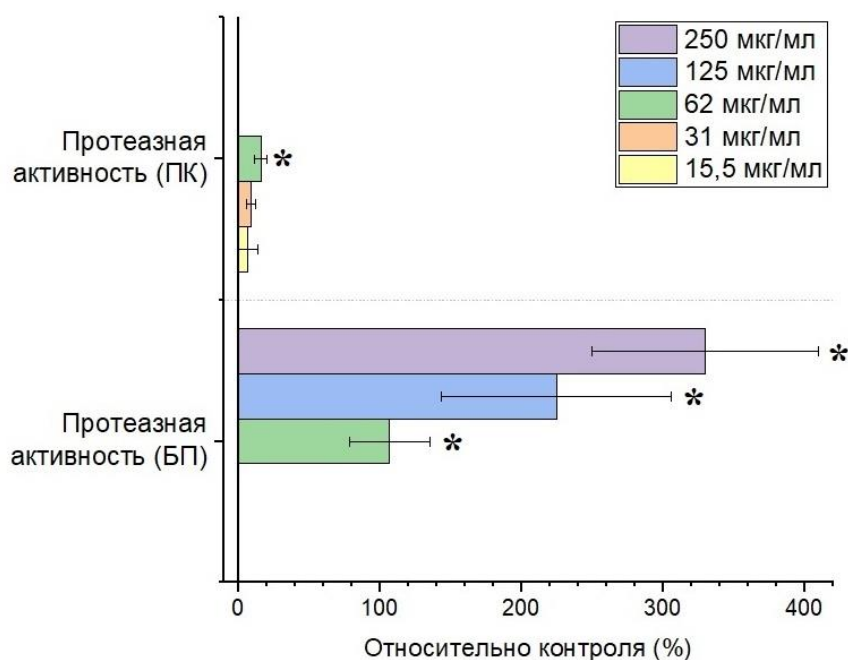


Рисунок 44 - Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию внеклеточных протеолитических ферментов у культур *C. albicans* ATCC 10231 (среда YPD + 0,2% БСА, 24 ч) (Stepanov et al., 2022).

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

3.9. Влияние 2,4-ДАФГ на вторичный метаболизм *Aspergillus* spp. и *Fusarium* spp.

Было изучено влияние 2,4-ДАФГ на продукцию вторичных метаболитов, в том числе – микотоксинов и внеклеточных ферментов, грибами рода *Aspergillus* и *Fusarium*.

Продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ оказывает влияние на продукцию микотоксинов у грибов рода *Aspergillus*. Так, содержание глиотоксина в погруженных культурах *A. fumigatus* UTMN, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК}$ - $1/4 \cdot \text{МИК}$), было меньше на 25,4-68,4%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2023; Степанов,

Васильченко, 2024) (рисунок 45). В случае с фумагиллином, в погруженных культурах *A. fumigatus* UTMN, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-15 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК}$ - $1/8 \cdot \text{МИК}$) содержание микотоксина было меньше на 42,4-64,3%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2023; Степанов, Васильченко, 2024) (рисунок 45). Глиотоксин и фумагиллин служат фактором конкурентного преимущества в борьбе за экологическую нишу (Fumagillin, а Mycotoxin ..., 2019; Production, stability ..., 2021). Также глиотоксин и фумагиллин являются важнейшими факторами вирулентности *A. fumigatus*. Продукция данных микотоксинов обуславливает апоптоз тканей организма-хозяина и снижение его иммунной защиты (*Aspergillus fumigatus* suppresses ..., 2005; Глиотоксин..., 2015; Gliotoxin Suppresses ..., 2016).

Также выяснено, что 2,4-ДАФГ в субингибиторных концентрациях влияет на продукцию охратоксина А, ключевого микотоксина *A. ochraceus*. Так, содержание охратоксина А в погруженных культурах *A. ochraceus* INA 01112, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл ($1/16 \cdot \text{МИК}$ - $1/4 \cdot \text{МИК}$), было меньше на 40,4-47,7%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2023; Степанов, Васильченко, 2024) (рисунок 45). Охратоксин А является одним из важнейших контаминантов пищевой продукции, в частности, продовольственного и кормового зерна, масличных и плодовых культур, кофе- и какао-бобов (Reddy, Bhoola, 2010).

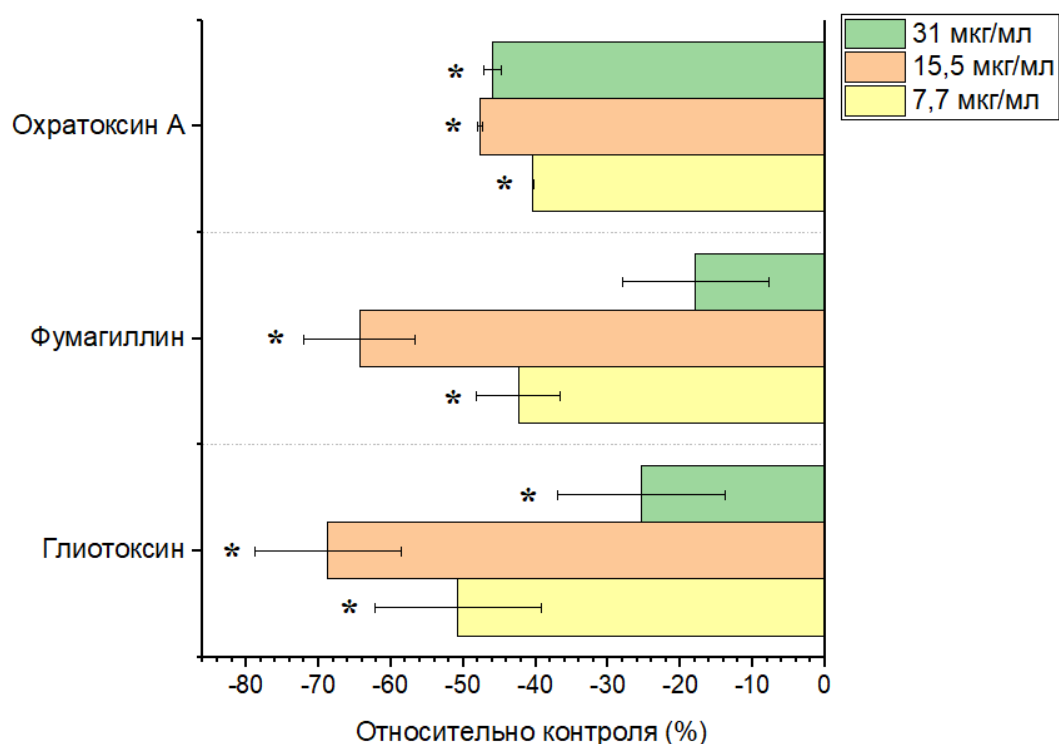


Рисунок 45 - Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию микотоксинов фумагиллина и глиотоксина *A. fumigatus* UTMN (среда YES, 4 сут) и охратоксина А *A. ochraceus* INA 01112 (среда YES, 9 сут) (Stepanov et al., 2023).

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

Как и в случае с физиолого-биохимическими изменениями, влияние 2,4-ДАФГ на продукцию микотоксинов является следствием принадлежности к экологической группе. Продукция микотоксинов, по-видимому, не является ключевым фактором, обеспечивающим выживание грибов рода *Aspergillus*, в окружающей среде. Известно, что соединения с антифунгальной активностью, в том числе ингибиторы электрон-транспортной цепи, способны снижать продукцию микотоксинов у грибов рода *Aspergillus* (In vitro effect ..., 2011; Inhibitory effects of ..., 2014; Assessment of azole ..., 2017).

Также показано, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ способны влиять на продукцию микотоксинов Т-2 токсина *F. sporotrichioides* MFG 11039 и зеараленона у *F. culmorum* MFG 102100.

В частности, 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) повышает продукцию Т-2 токсина у *F. sporotrichioides* MFG 11039 и зеараленона у *F. culmorum* MFG 102100 на 25,2-66,7 и 73,5-87,8%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 46).

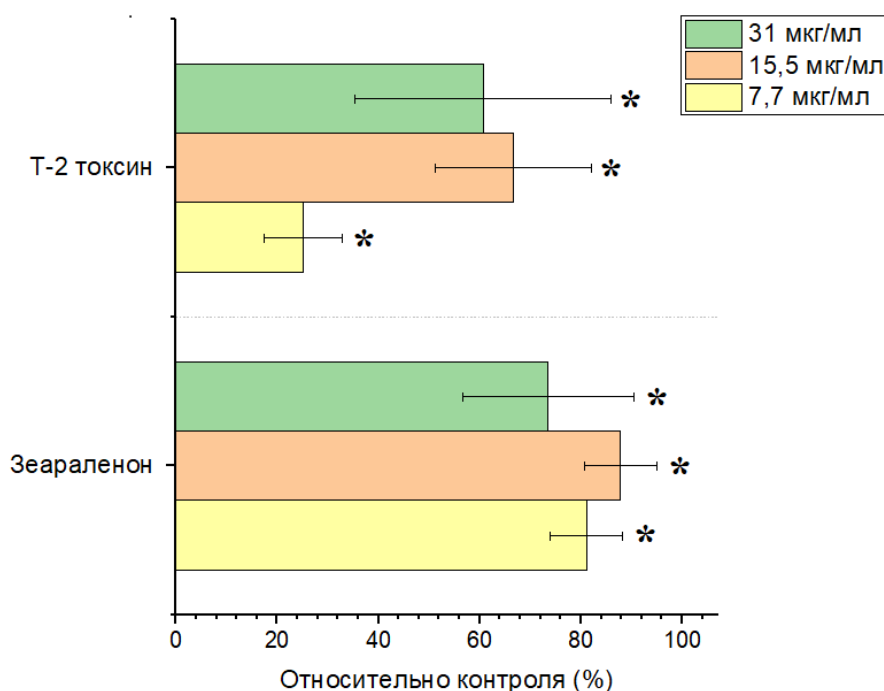


Рисунок 46 - Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию Т-2 токсина *sporotrichioides* MFG 11039 и зеараленона *F. culmorum* MFG 102100 (среда Муро, 9 сут) (Stepanov et al., 2024).

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

Микотоксины грибов рода *Fusarium* представляют собой одни из важнейших контаминантов пищевой продукции. Т-2 токсин и зеараленон являются крайне токсичными соединениями, чье содержание в растительном сырье строго регламентируется (Левитин, Джавахия, 2020). Также известно, что микотоксины грибов рода *Fusarium* являются важным компонентом стресс-реакции на различные биотические и абиотические факторы (Perincherry et al., 2019). В первую очередь, на повышенное содержание

активных форм кислорода, присутствие которых запускает усиленную продукцию микотоксинов (Ponts, 2015). Грибы рода *Fusarium* будучи фитопатогенами реагируют на неблагоприятные факторы, в том числе со стороны растения-хозяина, повышением продукции микотоксинов. Известно, что микотоксины являются ключевым фактором патогенности *Fusarium* spp., а потому повышение их продукции в ответ на действие 2,4-ДАФГ видится неспецифической стресс-реакцией на действие фунгицида. В частности, показано, что фунгициды могут усиливать продукцию микотоксинов у грибов рода *Fusarium* (Nakajima, 2010; Effect of fungicides commonly ..., 2021).

Продemonстрировано, что субингибиторные концентрации 2,4-ДАФГ влияют на секрецию внеклеточных нафтохиноновых пигментов у грибов рода *Fusarium*. Так, 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-31 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) снижает продукцию нафтохиноновых пигментов у *F. solani* VKPM F-890 и *F. sporotrichioides* MFG 11039 на 18,1-74,6 и 11,8-63,0%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 47).

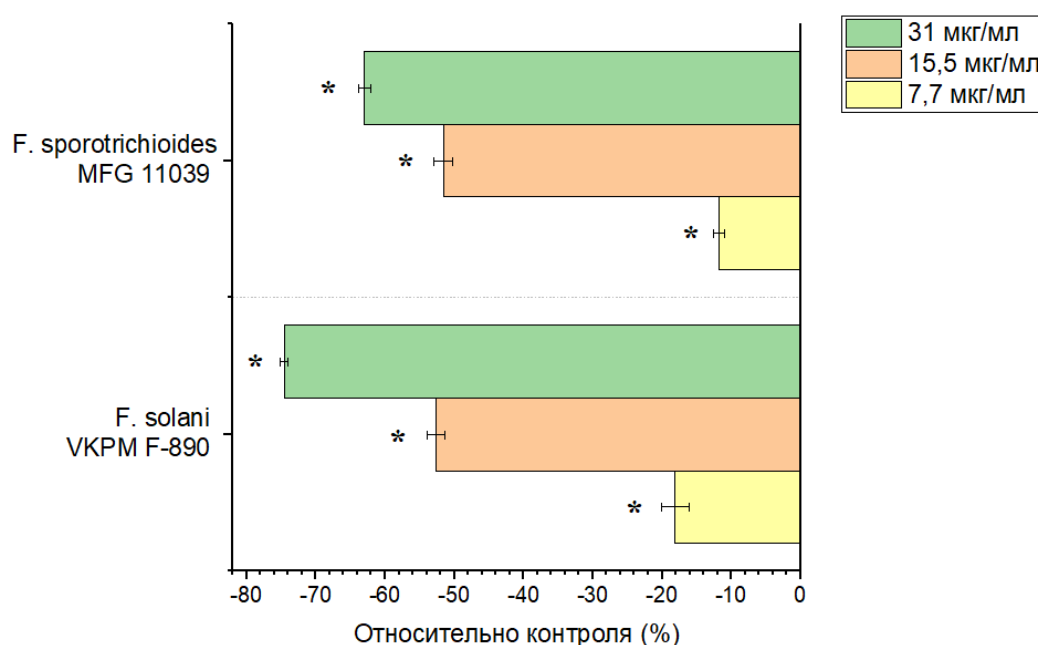


Рисунок 47 – Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию внеклеточных нафтохиноновых пигментов у культур *F. solani* VKPM F-890 и *F. sporotrichioides* MFG 11039 (КГБ, 7 сут) (Stepanov et al., 2024).

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

Снижение содержания нафтохиноновых пигментов в мицелии и культуральной жидкости у грибов рода *Fusarium* в присутствии субингибиторных концентрации 2,4-ДАФГ может быть связана с продукцией микотоксинов. Известно, что биосинтез 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).

Показано, что 2,4-ДАФГ оказывает влияние на протеазную активность погруженных культур и биоплёнок у грибов рода *Aspergillus* и *Fusarium*, обработанных 2,4-ДАФГ.

Выяснено, что соинкубирование *A. fumigatus* UTMN, *A. niger* INA 00890 и *A. ochraceus* INA 01112 с 2,4-ДАФГ в концентрации 31 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$) увеличивает протеазную активность на $20,0 \pm 2,6$, $63,4 \pm 9,9$ и $68,5 \pm 7,8\%$, соответственно, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023; Степанов, Васильченко, 2024; Stepanov et al., 2024) (рисунок 48).

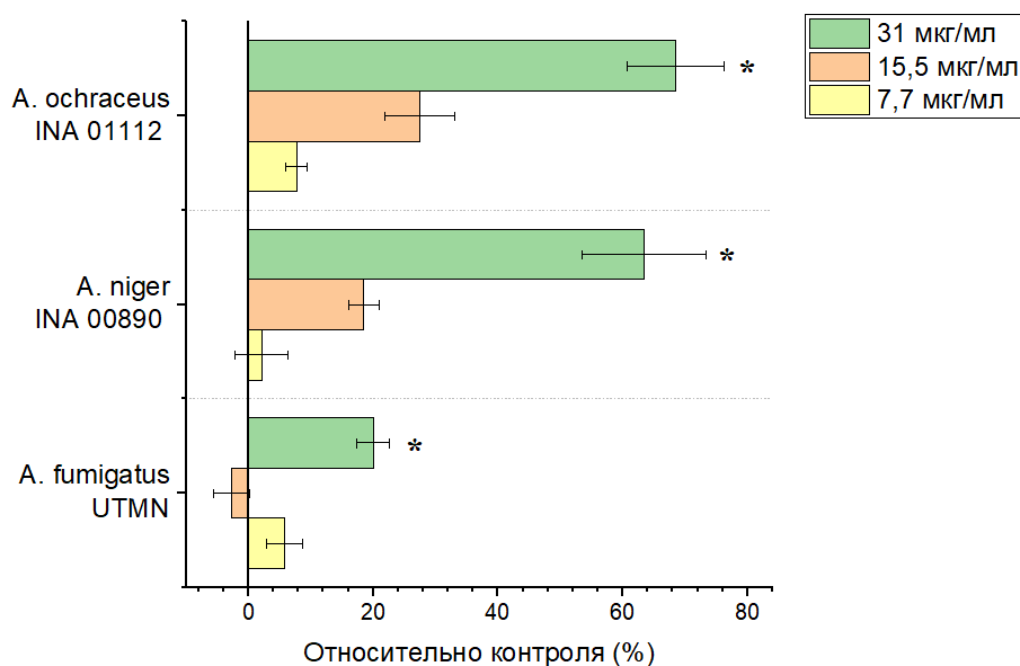


Рисунок 48 - Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию протеолитических ферментов у погруженных культур *Aspergillus* spp. (среда СYA + 0,2% БСА, 72 ч) (Stepanov et al., 2023; Stepanov et al., 2024).

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

Схожим образом, 2,4-ДАФГ в концентрациях 31-125 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $1 \cdot \text{МИК}$) вызывает увеличение протеазной активности биоплёнок *A. fumigatus* UTMN, *A. niger* INA 00890 и *A. ochraceus* INA 01112 на 21,1-66,9, 34,7-133,0 и 58,4-102,4%, соответственно, по сравнению с контролем (Степанов, Васильченко, 2023; Stepanov et al., 2023; Степанов, Васильченко, 2024; Stepanov et al., 2024) (рисунок 49).

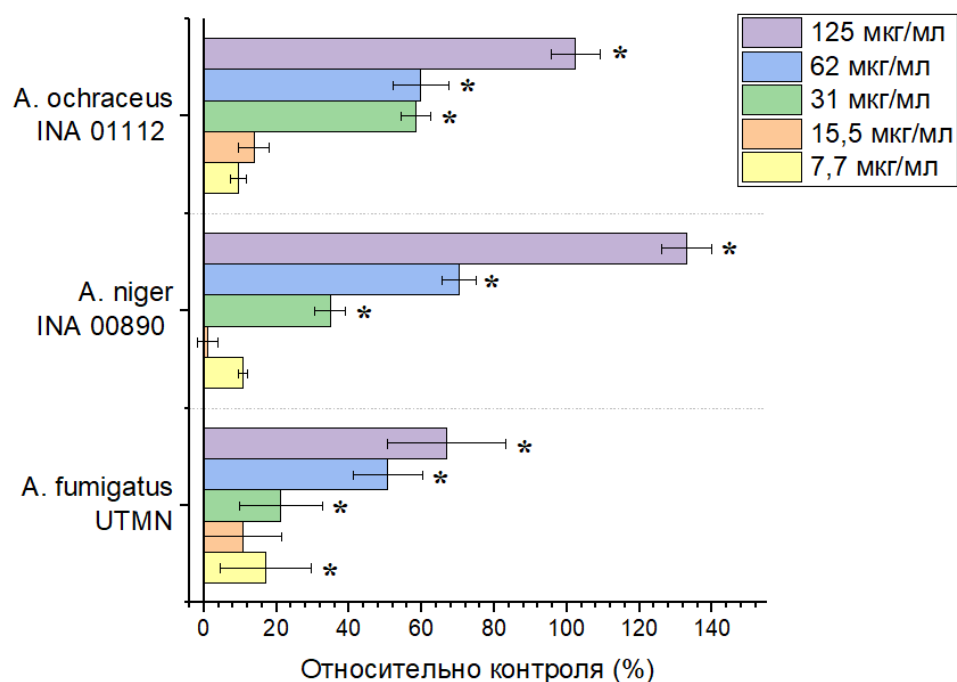


Рисунок 49 - Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию протеолитических ферментов у биоплёнок *Aspergillus* spp. (среда СYA + 0,2% БСА, 48 ч) (Stepanov et al., 2023; Stepanov et al., 2024).

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

Схожие изменения обнаружены у культур *F. solani* VKPM F-890, *F. culmorum* MFG 102100 и *F. sporotrichioides* MFG 11039, сформированных в присутствии 2,4-ДАФГ. Выяснено, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 15,5-31 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК}$ - $1/2 \cdot \text{МИК}$) повышает протеазную активность погруженных культур *F. solani* VKPM F-890 на 31,1-83,7%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 50). В свою очередь, у погруженных культур *F. culmorum* MFG 102100 и *F. sporotrichioides* MFG 11039 отмечено повышение протеазной активности лишь в концентрации 31 мкг/мл ($1/2 \cdot \text{МИК}$) и составляет $39,4 \pm 5,3$ и $97,8 \pm 8,1$, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 50).

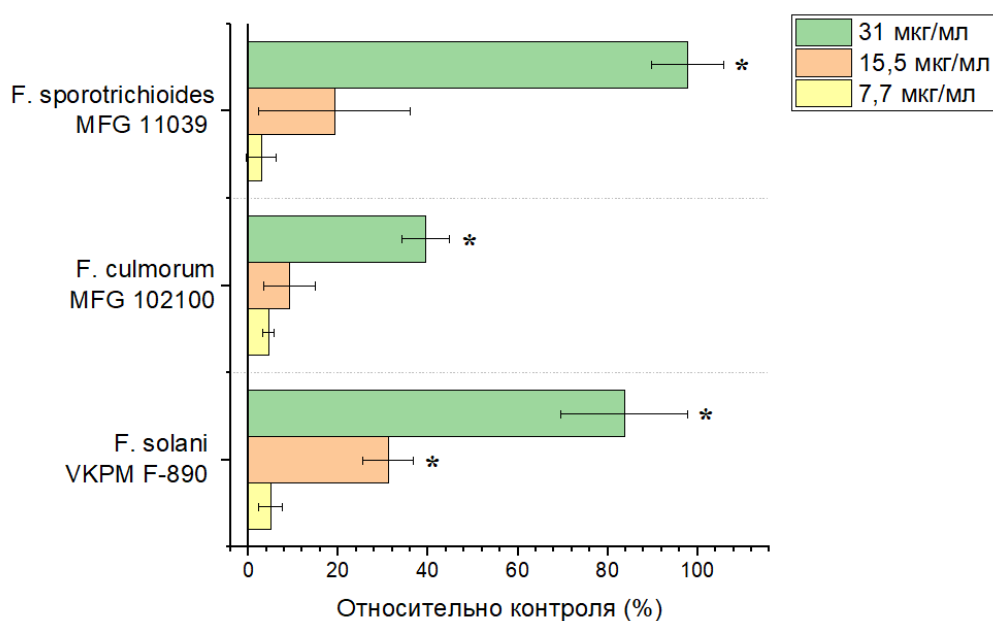


Рисунок 50 - Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию протеолитических ферментов у погруженных культур *Fusarium* spp. (среда СYA + 0,2% БСА, 72 ч) (Stepanov et al., 2024).

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

Также продемонстрировано, что 2,4-ДАФГ в концентрациях 7,7-125 мкг/мл ($1/8 \cdot \text{МИК} - 2 \cdot \text{МИК}$) увеличивает протеазную активность биоплёнок у *F. culmorum* MFG 102100 и *F. sporotrichioides* MFG 11039 на 10,6-141,0 и 23,9-149,7%, соответственно, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 51). Увеличение протеазной активности биоплёнок *F. solani* VKPM F-890 наблюдается в концентрациях 15,5-125 мкг/мл ($1/4 \cdot \text{МИК} - 2 \cdot \text{МИК}$) и составляет 22,8-128,9%, по сравнению с контролем (Stepanov et al., 2024) (рисунок 51).

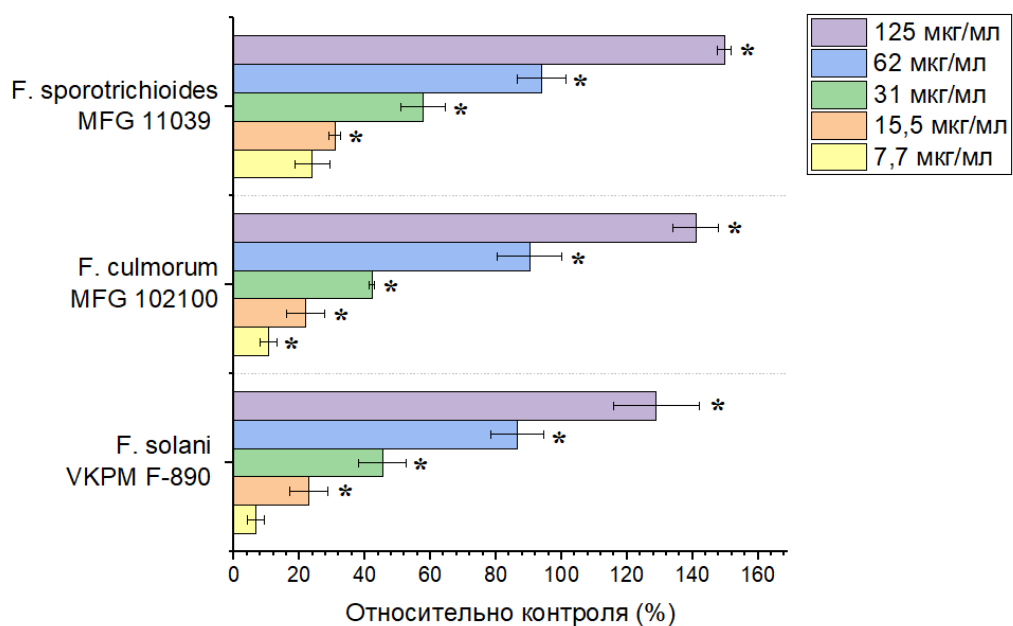


Рисунок 51 - Влияние 2,4-ДАФГ на продукцию протеолитических ферментов у биоплёнок *Fusarium* spp. (КГБ + 0,2% БСА, 48 ч) (Stepanov et al., 2024).

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

ГЛАВА 4. ВЛИЯНИЕ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНА НА ПОЧВЕННОЕ ГРИБНОЕ СООБЩЕСТВО

4.1. Влияние 2,4-ДАФГ на структурные свойства почвенного микробиома

В ходе диссертационного исследования было также оценено влияние 2,4-ДАФГ на структурно-функциональные свойства почвенного сообщества грибов. Методом высокопроизводительного секвенирования ампликонов ITS фрагмента было профилировано грибное сообщество почвенных образцов. В частности, на 28 сутки эксперимента 2,4-ДАФГ в концентрациях 1 и 10 мг/кг почвы вызывает незначительное увеличение индекса Шеннона, характеризующего альфа-разнообразие грибов в почвенном сообществе, с $4,04 \pm 0,11$ до $4,15 \pm 0,08$ и $4,18 \pm 0,09$, соответственно (рисунок 52). Достоверных изменений в индексе альфа-разнообразия Чао1, отражающем реальное число обнаруженных ASV, не было найдено (рисунок 53)

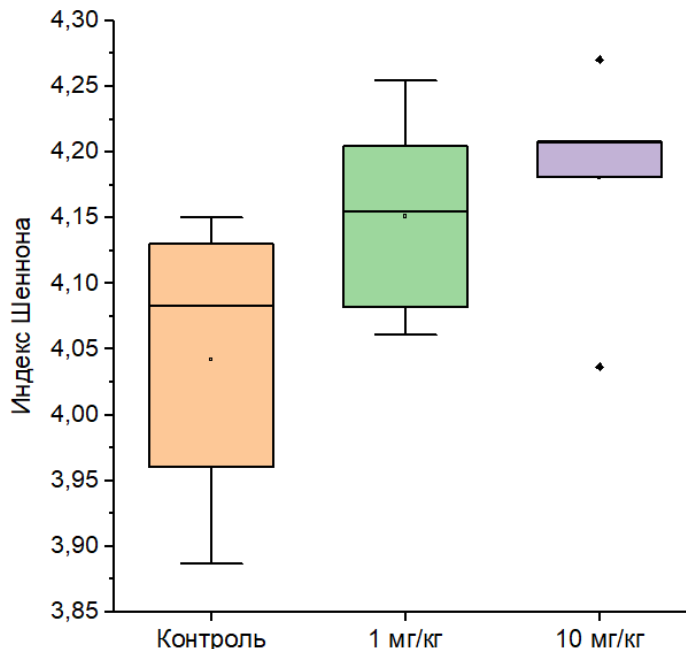


Рисунок 52 - Влияние 2,4-ДАФГ на альфа-разнообразие грибов почвенного микробиома, выраженное индексом Шеннона.

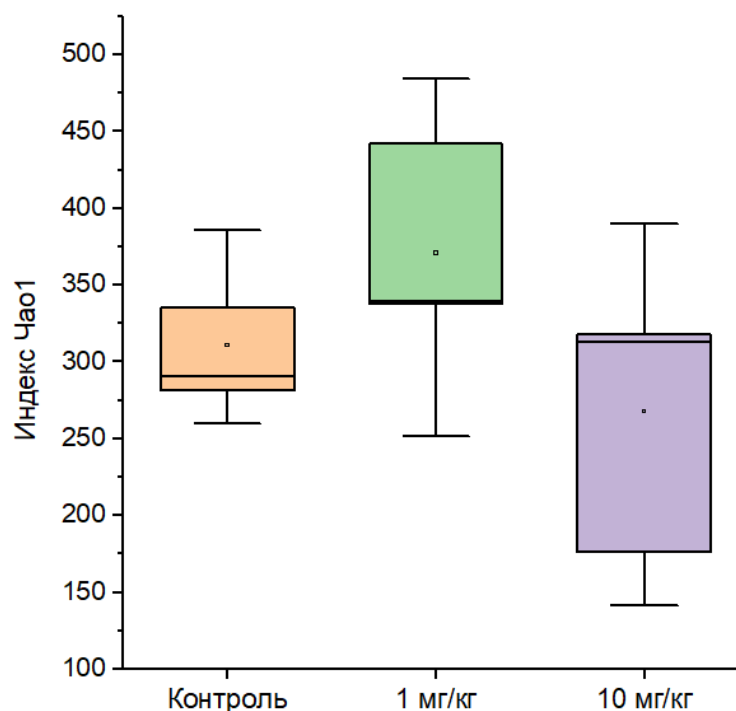


Рисунок 53 - Влияние 2,4-ДАФГ на альфа-разнообразие грибов почвенного микробиома, выраженное индексом Чао1.

На уровне таксономической организации грибного сообщества были зафиксированы следующие изменения в представленности таксонов. При внесении в почвенные микрокосмы 2,4-ДАФГ в концентрациях 1 и 10 мг/кг через 28 дней инкубирования уменьшалась представленность отдела *Mucoromycota* с $35,61 \pm 4,50$ до 22,84-28,90% (рисунок 54). Вместе с тем наблюдалось увеличение представленности отделов *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 54).

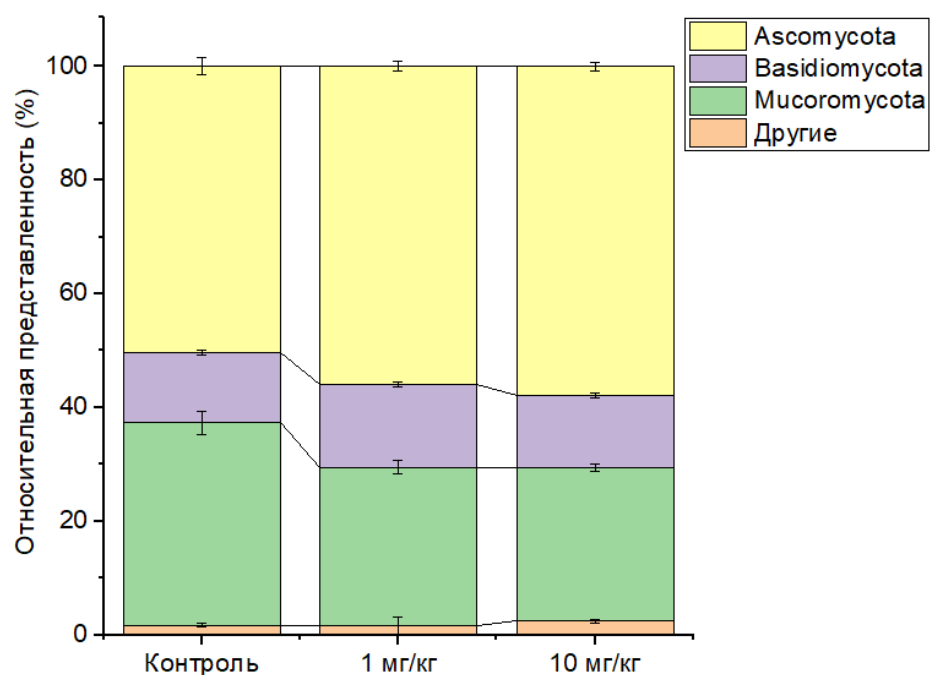


Рисунок 54 - Влияние 2,4-ДАФГ на таксономическую структуру почвенного сообщества грибов на уровне отряда.

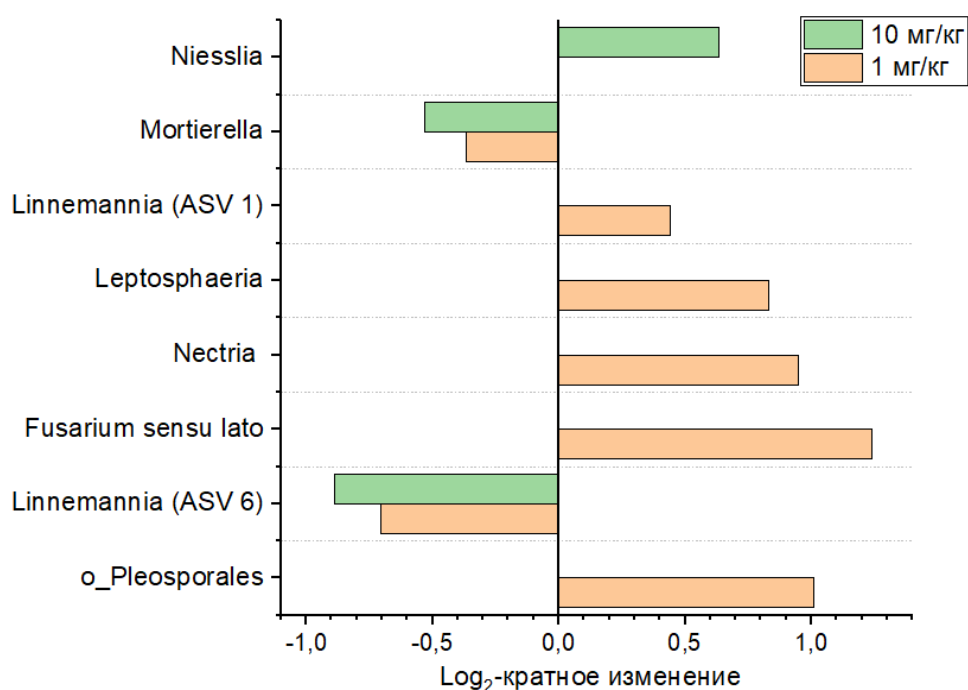


Рисунок 55 - Влияние 2,4-ДАФГ на таксономическую структуру почвенного сообщества грибов на уровне рода. Данные выражены в значениях относительного изменения представленности (Log₂-кратное изменение)

доминантных таксонов в опытной выборке по сравнению с контрольной выборкой.

Кроме того, были обнаружены изменения на уровне относительной представленности таксонов грибов почвенного сообщества. В частности, внесение 2,4-ДАФГ в концентрации 1 мг/кг почвы на 28 сутки соинкубирования уменьшало численность представителей рода *Mortierella* (ASV 8, Log₂-кратное изменение -0,36) и *Linnemanina* (ASV 6, Log₂-кратное изменение -0,70) и увеличивало представленность родов *Nectria* (Log₂-кратное изменение +0,94), *Leptosphaeria* (Log₂-кратное изменение +0,83), а также представителя из отряда *Pleosporales* (Log₂-кратное изменение +1,01) (рисунок 55).

Вышеуказанные изменения были характерны в случае соинкубирования почвенных образцов с 2,4-ДАФГ в концентрации 10 мг/кг. Внесение 2,4-ДАФГ уменьшало представленность родов *Linnemanina* (ASV 6, Log₂-кратное изменение -0,88) и *Mortierella* (Log₂-кратное изменение -0,53) и увеличивало представленность рода *Niesslia* (ASV 28, Log₂-кратное изменение +0,63) (рисунок 55).

Стоит подчеркнуть, что с одновременным уменьшением представленности доминантных таксонов (относительная доля >0,5% от общего количества прочтений) наблюдается увеличение представленности минорных таксонов (относительная доля <0,5%) из отделов *Ascomycota* и *Basidiomycota* (таблица 2).

Полученные результаты коррелируют с литературными данными, свидетельствующими о том, что биологические средства защиты растений повышают биологическое разнообразие почвенного микробиома (Mahapatra et al., 2022; The effect of seed ..., 2023).

Таблица 2. Log₂-кратные изменения в таксономической структуре
грибного сообщества почвенного микробиома.

№	Таксон	ASV	Log ₂ -кратное изменение	
			2,4-ДАФГ, 1 мг/кг, 28 сут	2,4-ДАФГ, 10 мг/кг, 28 сут
1	g Linnemannia	ASV 6	- 0,70	- 0,88
2	g Mortierella	ASV 8	- 0,36	- 0,53
3	g Linnemannia	ASV 1	- 0,44	
4	g Neocosmospora	ASV 39	1,24	
5	g Nectria	ASV 17	0,95	
6	o Pleosporales	ASV 32	1,00	
7	g Leptosphaeria	ASV 18	0,83	
8	g Fusarium sensu lato	ASV 39	1,24	
9	g Naganishia	ASV 50	0,94	
10	g Metacordyceps	ASV 56	1,32	
11	g Linnemannia	ASV 66	0,84	
12	g Talaromyces	ASV 97	2,84	
13	o Agaricostilbales	ASV 100	1,32	1,60
14	g Clonostachys	ASV 116	1,36	
15	g Saitozyma	ASV 132	3,10	
16	g Pseudosigmoidea	ASV 159	1,15	
17	p Ascomycota	ASV 211	- 1,30	
18	g Geminibasidium	ASV 110	3,25	
19	g Niesslia	ASV 28		0,63
20	g Albifimbria	ASV 42	0,93	1,01
21	g Truncatella	ASV 147		2,61
22	g Marquandomyces	ASV 65	0,55	0,72
23	f Nectriaceae	ASV 165		1,42
24	g Myrmecridium	ASV 151		2,20
25	o Helotiales	ASV 53		0,53
26	g Colletotrichum	ASV 169	2,96	2,63
27	g Collarina	ASV 84		2,33
28	g Equiseticola	ASV 73		0,99
29	g Chaetomium	ASV 58		1,06
30	g Penicillium	ASV 90		2,78
31	o Helotiales	ASV 53		0,53
32	o Mortierellales	ASV 186		2,16
33	g Endophoma	ASV 102	0,94	

4.2. Влияние 2,4-ДАФГ на функциональные свойства почвенного микробиома

Также было оценено влияние низких концентрации 2,4-ДАФГ на активность ферментов, отвечающих за циклы углерода, азота и фосфора, в

почвенных микрокосмах. Выяснено, что внесение 2,4-ДАФГ оказывает влияние на ферментативную активность почвенного микробиома.

Внесение 2,4-ДАФГ в концентрации 1 мг/кг почвы увеличивало активность целлюбиогидролазы, β -1,4-глюкозидазы, β -1,4-ксилозидазы и кислой фосфатазы на 7-28 сутки эксперимента в 2,2-2,3, 1,1-1,8, 2,1-6,2 и 1,3-2,8 раз, соответственно (рисунок 56).

Аналогичная ситуация наблюдается при увеличении концентрации вносимого 2,4-ДАФГ в почву. Так, внесение 2,4-ДАФГ в концентрации 10 мг/кг почвы увеличивало активность целлюбиогидролазы, β -1,4-глюкозидазы, β -1,4-ксилозидазы и кислой фосфатазы на 7-28 сутки эксперимента в 2,2-2,7, 1,6-2,1, 2,2-6,8 и 1,4-2,9 раз, соответственно (рисунок 56). Также наблюдается снижение активности лейцинаминопептидазы на 7 и 28 сутки в _ раз, по сравнению с контролем.

Отмечена обратная зависимость в активностях ферментов, участвующих в циклах азота, N-ацетилглюкозаминидазы и лейцинаминопептидаза. Показано, что при внесении 2,4-ДАФГ в концентрациях 1 и 10 мг/кг почвы активность N-ацетилглюкозаминидазы на 7 и 28 сутки была в 5,5-6,1 и 132,9-154,3 раза выше, соответственно, по сравнению с контролем. Однако, на 14 сутки активность N-ацетилглюкозаминидазы оказывается меньше в 1,8-1,9 раз, по сравнению с контролем (рисунок 56).

И напротив, активность лейцинаминопептидазы в почвенных образцах, содержащих 2,4-ДАФГ в концентрациях 1 и 10 мг/кг на 7 и 28 сутки эксперимента была в 1,2-1,9 и 4,2-4,5 раз меньше, чем в контрольных. На 14 сутки эксперимента отмечается увеличение активности в 2,5-2,6 раз, по сравнению с контролем (рисунок 56).

Полученные результаты коррелируют с данными о том, что биологические средства защиты растений усиливают ферментативную активность почвенного микробиома (Pseudomonas putida improved ..., 2018; Sabaté, Carolina, 2022).

Вместе с тем, роль грибов в деструкции и трансформации органического материала почвы трудно переоценить. Известно, что не только мицелиальные, но и дрожжеподобные грибы, в том числе – грибы рода *Candida*, являются важной частью почвенного микобиома, которые наряду с другими грибами осуществляют трансформацию углерода, азота и фосфора в окружающей среде (Botha, 2011; Fungal Biodiversity... 2018).

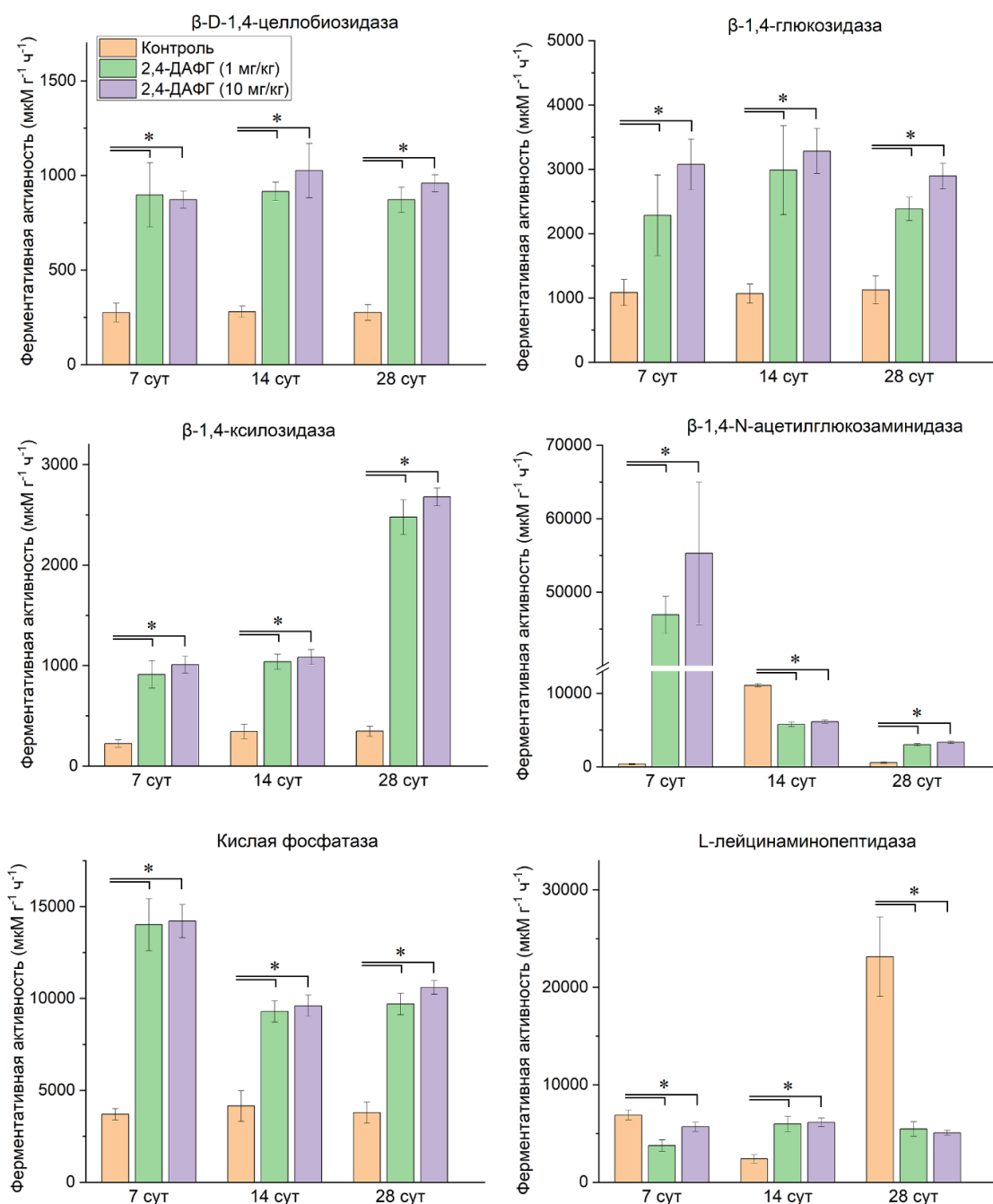


Рисунок 56 - Влияние 2,4-ДАФГ на ферментативную активность почвенного микробиома.

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

4.3. Взаимосвязь между структурными и функциональными изменениями, вызванными действием 2,4-ДАФГ

Также с помощью коэффициента корреляции Пирсона оценена взаимосвязь между изменениями в структуре грибного сообщества и ферментативной активностью почвенного микробиома.

Было выяснено, что увеличение относительной представленности родов *Nectria* и *Fusarium* на 28 сутки инкубирования почвы с 2,4-ДАФГ в концентрации 1 мг/кг положительно коррелирует с увеличением активности β -D-1,4-целлобиозидазы ($r=0,75$; 0,81), β -1,4-глюкозидазы ($r=0,82$; 0,81), β -1,4-ксилозидазы ($r=0,82$), кислой фосфатазы ($r=0,76$; 0,84) и N-ацетилглюкозаминидазы ($r=0,79$) (рисунок 57).

Также продемонстрировано, что уменьшение представленности рода *Linnemannia* (ASV 6) на 28 сутки соинкубирования с 2,4-ДАФГ в концентрации 1 мг/кг отрицательно коррелирует с увеличением активности β -D-1,4-целлобиозидазы ($r=-0,76$), β -1,4-ксилозидазы ($r=-0,76$) и N-ацетилглюкозаминидазы ($r=-0,78$) (рисунок 57). Схожим образом, уменьшение относительной представленности рода *Linnemannia* (ASV 6) на 28 сутки соинкубирования с 2,4-ДАФГ в концентрации 10 мг/мл отрицательно коррелирует с активностями β -D-1,4-целлобиозидазы ($r=-0,78$), β -1,4-ксилозидазы ($r=-0,81$), кислой фосфатазы ($r=-0,76$) и β -1,4-N-ацетилглюкозаминидазы ($r=-0,82$) (рисунок 58).

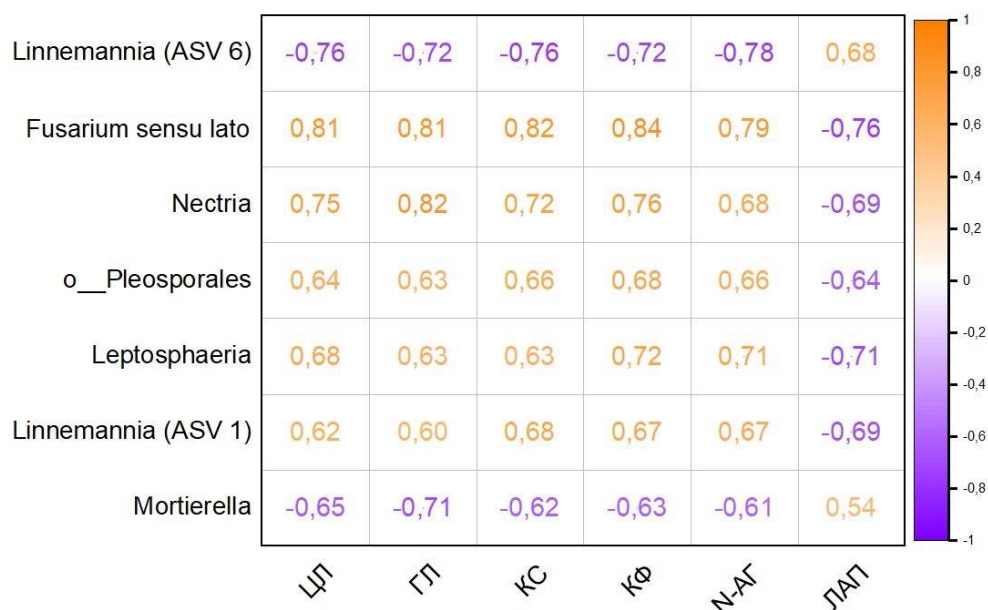


Рисунок 57 - Корреляция между относительной представленностью таксонов грибов и ферментативной активностью почвенного микробиома, образцов, содержащих 2,4-ДАФГ в концентрации 1 мг/кг на 28 сутки эксперимента.

Примечание: ЦЛ - β -D-1,4-целлобиоза, ГЛ - β -1,4-глюкозидаза, КС - β -1,4-ксилозидаза, КФ - кислой фосфатаза, N-АГ - β -1,4-N-ацетил-глюкозаминидаза, ЛАП – лейцинаминопептидаза.

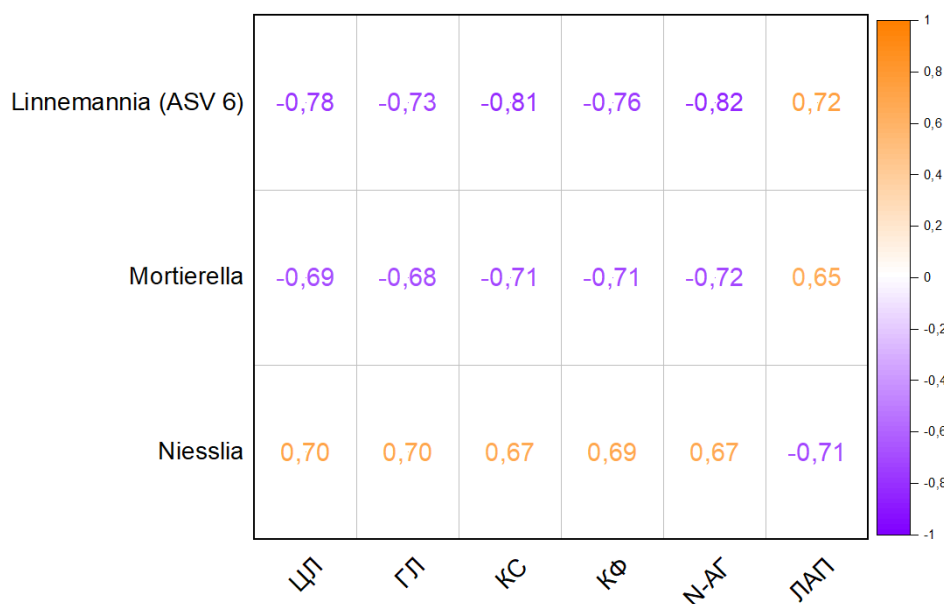


Рисунок 58 - Корреляция между относительной представленностью таксонов грибов и ферментативной активностью почвенного микробиома,

образцов, содержащих 2,4-ДАФГ в концентрации 10 мг/кг на 28 сутки эксперимента.

Примечание: ЦЛ - β -d-1,4-целлобиоза, ГЛ - β -1,4-глюкозидаза, КС - β -1,4-ксилозидаза, КФ - кислой фосфатаза, N-АГ - β -1,4-N-ацетил-глюкозаминидаза, ЛАП – лейцинаминопептидаза.

Таким образом, выяснено, что 2,4-ДАФГ способен модулировать структурно-функциональные свойства почвенного микробиома. Внесение в почву низких концентрации 2,4-ДАФГ повышает биоразнообразие грибов путем снижения численности доминантных таксонов (в частности, представителей двух родов *Linnemannia* и *Mortierella* из отдела *Zygomycota*) с одновременным увеличением численности минорных таксонов. Также продемонстрировано, что низкие концентрации 2,4-ДАФГ оказывают стимулирующий эффект на ферментативную активность почвенного микробиома. В частности, активности β -d-1,4-целлобиозидазы, β -1,4-глюкозидазы, β -1,4-ксилозидазы, фосфатазы, и β -1,4-N-ацетил-глюкозаминидазы. Это коррелирует с данными о влиянии 2,4-ДАФГ на структуру почвенного микробиома.

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. Продemonстрировано, 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- 2,4-ДАФГ – 2,4-диацетилфлороглюцин
- АСМ – атомно-силовая микроскопия
- БСА – бычий сывороточный альбумин
- БСЗР – биологические средства защиты растений
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГАГ – галактозоаминогалактан
- ДМСО - диметилсульфоксид
- КГА – картофельно-глюкозный агар
- КГБ – картофельно-глюкозный бульон
- КМЦ – карбоксиметилцеллюлоза
- п-ДМАБА – пара-диметиламинобензальдегид
- СЭМ – сканирующая электронная микроскопия
- ТТХ – 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид
- ТФЭ – твердофазная экстракция
- ТХУ – трихлоруксусная кислота
- УФ – ультрафиолет
- ХСЗР – химические средства защиты растений
- ЭПМ – экзополимерный матрикс
- CV – кристаллический фиолетовый
- СYA – среда Чапека-Докса с дрожжевым экстрактом
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PGPR-бактерии – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria; ризобактерии, способствующие росту растений
- RPMI-1640 – питательная среда для эукариотических клеточных культур
- YES – питательная среда с дрожжевым экстрактом и сахарозой
- YPD – глюкозо-пептон-дрожжевая среда; полная питательная среда для роста дрожжей

СПИСОК ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, индексируемых в международных БД 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», Пушкино, 9–13 апреля 2023 г. – Пушкино: 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-диацетилфлороглюцинола 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Артамонов И.В. Микотоксины фитопатогенных грибов и микотоксикозы: исторический очерк (обзор). Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2023. – Т. 24, №5. – С. 703-719

Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. – Москва, 2024.

Ильина, Г.В. Адаптация штаммов гриба *Aspergillus terreus* Thom. к солевому стрессу в присутствии фенольных соединений в модельных условиях / Г.В. Ильина, Д.Ю. Ильин, А.А. Воробьева // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2020. – №3 (31). – С. 90-102.

Ларюшина, И.Э. Основные механизмы чувства кворума и их реализация в мультимикробном сообществе (обзор) / И.Э. Ларюшина // Животноводство и кормопроизводство. – 2020. – Т. 103, №4. – С. 160-173.

Левитин М.М. Токсигенные грибы и проблемы продовольственной безопасности (обзор) / М.М. Левитин, В.Г. Джавахия // Достижения науки и техники АПК. – 2020. – Т. 34. № 12. – С. 5-11.

Павлюкова, Е.Б. Внеклеточные протеолитические ферменты мицелиальных грибов / Е.Б. Павлюкова, М.А. Белозерский, Я.Е. Дунаевский // Биохимия. – 1998. – Т. 63, №8. – С. 1059-1089.

Почвенные грибы рода *Fusarium* и их метаболиты: опасность для биоты, возможность использования в биотехнологии (обзор) / Л. И. Домрачева, А. И. Фокина, С. Г. Скугорева, Т. Я. Ашихмина // Теоретическая и прикладная экология. – 2021. – № 1. – С. 6-15.

Рябинин, И.А. Глиотоксин (краткий обзор) / И.А. Рябинин, О.Д. Васильчев, К.Д. Батаева, А.И. Ершова // Проблемы медицинской микологии. – 2015. – Т. 17, №1. – С. 52-57.

Состав и содержание хитин-глюканового комплекса в онтогенезе гриба *Aspergillus niger* / Е.П. Феофилова, Д.В. Немцев, Е.В. Терешина, А.С.

Меморская // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, N 6. – С. 624–629

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.

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.

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.

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.

Степанов, А.А. Влияние 2,4-диацетилфлороглюцинола 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.

Физиологические эффекты действия на растения фунгицидов триазольной природы / Т.П. Побежимова, А.В. Корсукова, Н.В. Дорофеев,

О.И. Грабельных // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2019. – Т. 9, № 3, С. 461-476

Хайтович, А.Б. Чувство кворума микроорганизмов как фактор патогенности / А.Б. Хайтович, Е.А. Мурейко // Таврический медико-биологический вестник. – 2018. – Т. 21, №1. – С. 214-220.

2,4-diacetylphloroglucinol alters plant root development / J.N. Brazelton, E.E. Pfeufer, T.A. Sweat [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2008. – Vol. 21, N 10. – P. 1349-1358

A global view on fungal infections in humans and animals: opportunistic infections and microsporidiosis / S. Gnat, D. Łagowski, A. Nowakiewicz, M. Dyląg // Journal of Applied Microbiology. – 2021. – Vol. 131, N 5. – P. 2095-2113

A review of the toxicity of triazole fungicides approved to be used in European Union to the soil and aqueous environment / D.L. Roman, D.L. Voiculescu, V. Ostafe [et al.] // Ovidius University Annals of Chemistry. – 2022. – Vol. 33. – P. 113-120.

Abdel-Aziz, MM. Effects of mandarin (*Citrus reticulata*) peel essential oil as a natural antibiofilm agent against *Aspergillus niger* in onion bulbs / M.M. Abdel-Aziz, T.M. Emam, E.A. Elsherbiny // Postharvest Biology and Technology. – 2019. – Vol. 156, 110959.

Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. / A. Silva-Dias, I.M. Miranda, J. Branco [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2015. – Vol. 6, N. 205. – 8 p.

Advances and Perspectives in the Use of Biocontrol Agents against Fungal Plant Diseases / D. Palmieri, G. Ianiri, C. Del Grosso [et al.] // Horticulturae. – 2022. – Vol. 8, N 7, 577.

Aflatoxins: Occurrence, biosynthesis, mechanism of action and effects, conventional/emerging detection techniques / V.O. Okechukwu, O.A. Adelusi, A.P. Kappo [et al.] // Food Chemistry. – 2024. – Vol. 436, 137775.

Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment / M. Tudi, H.D. Ruan, L. Wang [et al.] // International Journal of Environmental Research and Public Health. – 2021. – Vol. 18, N 3, 1112.

Amaradasa, B.S. Effects of Sublethal Fungicides on Mutation Rates and Genomic Variation in Fungal Plant Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum* / B.S. Amaradasa, S.E. Everhart // PLoS One. – 2016. – Vol. 11, N 12, e0168079.

An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis / R.A. El-Sayed, A.B. Jebur, W. Kang, F.M. El-Demerdash // Journal of Future Foods. – 2022. – Vol. 2, N 2. – P. 91-102.

Analysis of the *Aspergillus fumigatus* biofilm extracellular matrix by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy / C. Reichhardt, J.A. Ferreira, L.M. Joubert [et al.] // Eukaryotic Cell. – 2015. – Vol. 14. – P. 1064-1072

Antifungal activity of Myriocin on clinically relevant *Aspergillus fumigatus* strains producing biofilm / F. Perdoni, P. Signorelli, D. Cirasola [et al.] // BMC Microbiology. – 2015. – Vol. 15, 248.

Aspergillus derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity / V. Navale, K.R. Vamkudoth, S. Ajmera, V. Dhuri // Toxicology Reports. – 2021. – Vol. 8. – P. 1008-1030.

Aspergillus fumigatus suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes / M. Stanzani, E. Orciuolo, R. Lewis [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 105, N 6. – P. 2258-2265

Aspergillus nidulans AmyG Functions as an Intracellular α -Amylase to Promote α -Glucan Synthesis / A.R.S. Kazim, Y. Jiang, S. Li, X. He // Microbiology Spectrum. – 2021. – Vol. 9, N 3, e00644-21.

Assessment of azole fungicides as a tool to control growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 and B2 production in maize / E.M. Mateo, J.V. Gómez, J.V. Gimeno-Adelantado [et al.] // Food Additives & Contaminants: Part A. – 2017. – Vol. 34, N 6. – P. 1039-1051.

Autoinduction of 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthesis in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and Repression by the Bacterial Metabolites

Salicylate and Pyoluteorin / U. Schnider-Keel, A. Seematter, M. Maurhofer, C. Blumer, B. Duffy, C. Gigot-Bonnefoy, C. Keel // Journal of Bacteriology. – 2000. – Vol. 182, N 5. – P. 1215-1225.

Azole antifungals induce up-regulation of SAP4, SAP5 and SAP6 secreted proteinase genes in filamentous *Candida albicans* cells in vitro and in vivo / C.J. Barelle, V.M. Duncan, A.J. Brown [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. – Vol. 61. – P. 315-322.

Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens / C.L. Price, J.E. Parker, A.G. Warrilow, D.E. Kelly, S.L. Kelly // Pest Management Science. – 2015. – Vol. 71, N 8. – P. 1054-1058.

Azole-Based Compounds That Are Active against *Candida* Biofilm: In Vitro, In Vivo and In Silico Studies / S. Carradori, A. Ammazalorso, B. De Filippis et al. // Antibiotics. – 2022. – Vol. 11, N 10, 1375.

Bacon, C.W. Is Quorum Signaling by Mycotoxins a New Risk-Mitigating Strategy for Bacterial Biocontrol of *Fusarium verticillioides* and Other Endophytic Fungal Species? / C.W. Bacon, D.M. Hinton, T.R. Mitchell // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2017. – Vol. 65, N 33. – P. 7071-7080.

Bacterial and Fungal Biocontrol Agents for Plant Disease Protection: Journey from Lab to Field, Current Status, Challenges, and Global Perspectives / M. Ayaz, C.-H. Li, Q. Ali [et al.] // Molecules. – 2023. – Vol. 28, N 18. – 24 p.

Bacterial-Derived Plant Protection Metabolite 2,4-Diacetylphloroglucinol: Effects on Bacterial Cells at Inhibitory and Subinhibitory Concentrations / W.T. Julian, A.V. Vasilchenko, D.D. Shpindyuk [et al.] // Biomolecules. – 2020. – Vol. 11, N 1, 13.

Beneficial effects of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing pseudomonads on the marine alga *Saccharina latissima* / K. Nagel, I. Schneemann, I. Kajahn [et al.] // Aquatic Microbial Ecology. – 2012. – Vol. 67, N 3. – P. 239-249.

Berendsen, R.L. The rhizosphere microbiome and plant health / R.L. Berendsen, C.M. Pieterse, P.A. Bakker // Trends in Plant Science. – 2012. – Vol. 17, N 8. – P. 478-486.

Bhattacharyya, P.N. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture / P.N. Bhattacharyya, D.K. Jha // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 28, N 4. – P. 1327-1350.

Biessy, A. Phloroglucinol Derivatives in Plant-Beneficial *Pseudomonas* spp.: Biosynthesis, Regulation, and Functions / A. Biessy, M. Filion // Metabolites. - 2021. – Vol. 11, N 3, 182.

Biofilm formation by *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum and susceptibility to environmental stress / P. Li, X. Pan, H. Shi [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 2014. – Vol. 350, N 2. – P. 138–145

Biofilm morphologies of plant pathogenic fungi / M.W. Harding, L.L.R. Marques, R.J. Howard, M.E. Olson // The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology. – 2010. – Vol. 4. – P. 43-47.

Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities / J.C. van Lenteren, K. Bolckmans, J. Köhl [et al.] // BioControl. – 2018. – Vol. 63. – P. 39-59.

Bishop, C.T. The cell wall polysaccharides of *Candida albicans*: glucan, mannan and chitin / C.T. Bishop, F. Blank, P.E. Gardner // Canadian Journal of Chemistry. – 1960. – Vol. 38. – P. 869-881.

Biosynthesis and regulation of anti-fungal metabolites by Pseudomonads / J.P. Morrissey, M. Cullinane, A. Abbas [et al.] // Pseudomonas. – 2004. – Springer, Berlin. – P. 637-670.

Bonsall, R.F. Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat / R.F. Bonsall, D.M. Weller, L.S. Thomashow // Applied and Environmental Microbiology. – 1997. – Vol. 63, N 3. – P. 951-955.

Botha A. The importance and ecology of yeasts in soil / A. Botha // Soil Biology and Biochemistry. – 2010. – Vol. 43, N 1 – P. 1-8.

Bottiglieri, M. Characterization of PhlG, a hydrolase that specifically degrades the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol in the biocontrol

agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 / M. Bottiglieri, C. Keel // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, N 1. – P. 418-427.

Breivik, O. Yeast analysis, spectrophotometric semimicrodetermination of ergosterol in yeast / O. Breivik, J. Owades // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 1957. – Vol. 5. – P. 360-363.

Brito, N. The endo-beta-1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea* / N. Brito, J.J. Espino, C. Gonzales // Molecular plant-microbe interactions: MPMI. – 2006. – Vol. 19, N. 1 – P. 25-32.

Can filamentous fungi form biofilms? / M.W. Harding, L.L. Marques, R.J. Howard, M.E. Olson // Trends in Microbiology. – 2009. – Vol. 17, N 11. – P. 475-480

Characterization of a red pigment from *Fusarium chlamydosporum* exhibiting selective cytotoxicity against human breast cancer MCF-7 cell lines / K. Soumya, K. Narasimha Murthy, G.L. Sreelatha, S. Tirumale // Journal of Applied Microbiology. – 2018. – Vol. 125, N 1. – P. 148-158

Characterization of Interactions between the Transcriptional Repressor PhlF and Its Binding Site at the *phlA* Promoter in *Pseudomonas fluorescens* F113 / A. Abbas, J.P. Morrissey, P.C. Marquez, M.M. Sheehan, I.R. Delany, F. O’Gara // Journal of Bacteriology. – 2002. – Vol. 184, N 11. – P. 3008-3016

Characterization of spontaneous *gacS* and *gacA* regulatory mutants of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO / C.T. Bull, B. Duffy, C. Voisard, [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek. – 2001. – Vol. 79, N 3-4. – P. 327-336

Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture / P. Nicolopoulou-Stamati, S. Maipas, C. Kotampasi [et al.] // Frontiers in Public Health. – 2016. – Vol. 4. – 8 p.

Chitin Biosynthesis in *Aspergillus* Species / V.S. Brauer, A.M. Pessoni, M.S. Freitas, M.P. Cavalcanti-Neto, L.N.A. Ries, F. Almeida // Journal of Fungi. – 2023. – Vol. 9, N 1. – 42 p.

Conserved Responses in a War of Small Molecules between a Plant-Pathogenic Bacterium and Fungi / J.E. Spraker, P. Wiemann, J.A. Baccile [et al.] // mBio. – 2018. – Vol. 9, N 3, e00820-18.

Craney, A. Towards a new science of secondary metabolism / A. Craney, S. Ahmed, J. Nodwell // The Journal of Antibiotics. – 2013. – Vol. 66, N 6. – P. 387-400.

Cuthbertson, L. The TetR family of regulators / L. Cuthbertson, J.R. Nodwell // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2013. – Vol. 77, N 3. – P. 440-475.

Cuzick, A. *Fusarium graminearum* gene deletion mutants map1 and tri5 reveal similarities and differences in the pathogenicity requirements to cause disease on Arabidopsis and wheat floral tissue / A. Cuzick, M. Urban, K. Hammond-Kosack // New Phytologist. – 2008. – Vol. 177, N 4. – P. 990-1000.

Defense Responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-Diacetylphloroglucinol, a Broad-Spectrum Antibiotic Produced by *Pseudomonas fluorescens* / A. Schouten, G. van den Berg, V. Edel-Hermann [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2004. – Vol. 17, N 11. – P. 1201-1211

Denning, D.W. Global incidence and mortality of severe fungal disease / D.W. Denning // Lancet Infectious Diseases. – 2024. – Vol. 24, N 7. – P. 428-438.

Differential response of wheat cultivars to *Pseudomonas brassicacearum* and take-all decline soil / M. Yang, D.V. Tomashow, L.S. Thomashow, D.M. Weller // Phytopathology. – 2018. – Vol. 108. – P. 1363-1372.

Dirheimer, G. Mechanism of action of ochratoxin A / G. Dirheimer, E.E. Creppy // IARC Scientific Publications. – 1991. – Vol. 115. – P. 171-186.

de la Cruz, J.A. Sub-lethal fungicide concentrations both reduce and stimulate the growth rate of non-target soil fungi from a natural grassland / J.A. de la Cruz, T. Camenzind, M.C. Rillig // Frontiers in Environmental Science. – 2022. – Vol. 10, 1020465

Do Rosário Esteves Guimarães, C. Upregulation of secreted aspartyl proteinase genes of fluconazole-sensitive *Candida albicans* isolates / C. Do Rosário

Esteves Guimarães, H.F. de Freitas, T.F. Barros // Molecular Biology Reports. – 2019. – Vol. 46. – P. 6147-6154.

Draskau, M.K. Azole fungicides and their endocrine disrupting properties: Perspectives on sex hormone-dependent reproductive development / M.K. Draskau, T. Svingen // Frontiers in Toxicology. – 2022. – Vol. 4, 883254.

Dubuis, C. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in pseudomonads / C. Dubuis, D. Haas // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73, N 2. – P. 650-654.

Dubuis, C. Dialogues of root-colonizing biocontrol pseudomonads / C. Dubuis, C. Keel, D. Haas // European Journal of Plant Pathology. – 2007. – Vol. 119, N 3. – P. 311-328.

Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* / D. Cronin, Y. Moënné-Loccoz, A. Fenton [et al.] // FEMS Microbiology Ecology. – 2006. – Vol. 23, N 2. – P. 95-106.

Ecotoxicology of strobilurin fungicides / C. Zhang, T. Zhou, Y. Xu [et al.] // Science of the Total Environment. – 2020. – Vol. 742, 140611.

Effect of fungicides commonly used for *Fusarium* head blight management on growth and fumonisin production by *Fusarium proliferatum* / E. Cendoya, M.J. Nichea, M.P. Monge [et al.] // Revista Argentina de Microbiología. – 2021. – Vol. 53, N 1. – P. 64-74

Effects of Agricultural Fungicide Use on *Aspergillus fumigatus* Abundance, Antifungal Susceptibility, and Population Structure / A.E. Barber, J. Riedel, T. Sae-Ong [et al.] // mBio. – 2020. – Vol. 11, N 6, e02213-20

Ekwoadu, T.I. *Fusarium* fungi pathogens, identification, adverse effects, disease management, and global food security: A review of the latest research / T.I. Ekwoadu, M. Mwanza // Agriculture. – 2023. – Vol. 13, N 9, 1810.

Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt Acts as an Antifungal Candidate Molecule against *Fusarium graminearum* by Inhibiting DON

Biosynthesis and Chitin Synthase Activity / X.S. Song, K.X. Gu, J. Gao [et al.] // Toxins. – 2021. – Vol. 13, N 1, 17.

Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain / A.M. Fenton, P.M. Stephens, J. Crowley [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 1992. – Vol. 58, N 12. – P. 3873-3878.

Exposure to the agricultural fungicide tebuconazole promotes *Aspergillus fumigatus* cross-resistance to clinical azoles / V. Allizond, S. Comini, G. Bianco et al. // New Microbiologica. – 2021 – Vol. 44, N 4. – P. 234–240.

Factors impacting the activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* against take-all of wheat / Y.S. Kwak, R.F. Bonsall, P.A. Okubara // Soil Biology and Biochemistry. – 2012. – Vol 54. – P. 48-56.

FAO's Plant Production and Protection Division / Food and Agriculture Organization of the United Nations // Rome – 2022. – 24 p.

Fluorescent Pseudomonads in the Phyllosphere of Wheat: Potential Antagonists Against Fungal Phytopathogens / T. Müller, U. Behrendt, S. Ruppel [et al.] // Current Microbiology. – 2015. – Vol. 72, N 4. – P. 383-389.

Free radical scavenging behaviour of the plant-beneficial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol derivatives under physiological conditions: A joint experimental and theoretical study / W.E. Prasetyo, V. Kurniansyah, M. Firdaus [et al.] // Journal of Molecular Structure. – 2024. – Vol. 1302, 137498.

Fumagillin, a Mycotoxin of *Aspergillus fumigatus*: Biosynthesis, Biological Activities, Detection, and Applications / X. Guruceaga, U. Perez-Cuesta, A. Abad-Diaz de Cerio [et al.] // Toxins. – 2019. – Vol. 12, N 1, 7.

Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health / M. Frąc, S.E. Hannula, M. Bełka, M. Jędrzycka // Frontiers in microbiology. – 2018. – Vol. 9, 707.

Fungal biofilm resistance / G. Ramage, R. Rajendran, L. Sherry, C. Williams // International Journal of Microbiology. – 2012. – Vol. 2012, 528521.

Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases / C.B. Costa-Orlandi, J.C.O. Sardi, N.S. Pitangui [et al.] // Journal of Fungi. – 2017. – Vol. 3, N 2, 22.

Fungal cellulases / C.M. Payne, B.C. Knott, H.B. Mayes [et al.] // Chemical Reviews. – 2015. – Vol. 115, N 3. – P. 1308–1448.

Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors / M. Ray, A. Ray, S. Dash [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. – 2017. – Vol. 87. – P. 708-723.

Fungal pectinases: an insight into production, innovations and applications / S. Dwivedi, K. Yadav, S. Gupta, A. Tanveer, S. Yadav, D. Yadav // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2023. – Vol. 39, N 11, 305.

Fungal plant cell wall-degrading enzyme database: a platform for comparative and evolutionary genomics in fungi and Oomycetes / J. Choi, K.T. Kim, J. Jeon, Y.H. Lee // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14 (Suppl 5), S7.

Fungal Quorum-Sensing Molecules and Inhibitors with Potential Antifungal Activity: A Review / A. Mehmood, G. Liu, X. Wang [et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24, N 10, 1950.

Fungicide: Modes of Action and Possible Impact on Nontarget Microorganisms / C. Yang, C. Hamel, V. Vujanovic, Y. Gan // – 2011. – ISRN Ecology. – Vol. 2011. – 8 p.

Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross-resistance to medical drugs and beyond / R.W. Bastos, L. Rossato, G.H. Goldman, D.A. Santos // PLoS Pathogens. – 2021. – Vol. 17, N 12, e1010073.

Fungicide Resistance: Progress in Understanding Mechanism, Monitoring, and Management / Y. Yin, J. Miao, W. Shao [et al.] // Phytopathology. – 2023. – Vol. 113, N 4. – P. 707-718

Fusaric acid and analogues as Gram-negative bacterial quorum sensing inhibitors / T.T. Tung, T.H. Jakobsen, T.T. Dao [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2017. – Vol. 126. – P. 1011-1020.

Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat / R. Notz, M. Maurhofer, H. Dubach

[et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68, N 5. – P. 2229-2235.

FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides* / S. Li, K. Myung, D. Guse [et al.] // Molecular Microbiology. – 2006. – Vol. 62. – P. 1418-1432

Gardiner, D.M. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum* / D.M. Gardiner, K. Kazan, J.M. Manners // Fungal Genetics and Biology. – 2009. – Vol. 46, N 8. – P. 604-613.

Germ tube formation and proteinase activity of *Candida albicans* in relation to virulence for mice / K. Okamoto, A. Ashimoto, Y. Tanaka, T. Hamada // Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases. – 1993. – Vol. 67. – P. 466-472.

Gliotoxin Suppresses Macrophage Immune Function by Subverting Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate Homeostasis / D. Schlam, J. Canton, M. Carreño [et al.] // mBio. – 2016. – Vol. 7, N 2. – e02242.

Grossman, K. Regulation of phytohormone levels, leaf senescence and transpiration by the strobilurin kresoxim-methyl in wheat (*Triticum aestivum*) / K. Grossman, J. Kwiatkowski, G. Caspar // Journal of Plant Physiology. – 1999. – Vol. 154. – P. 805-808.

Gurdaswani, V. FocSge1 in *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1 is essential for full virulence / V. Gurdaswani, S.B. Ghag, T.R. Ganapathi // BMC Microbiology. – 2020. – Vol. 20, 255.

Hahn, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study / M. Hahn // Journal of Biological Chemistry. – 2014. – Vol. 7, N 4. – P. 133-141.

Heredia, A. Composition of plant cell walls / A. Heredia, A. Jiménez, R. Guillén // Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung. – 1995. – Vol. 200, N 1. – P. 24-31.

Hermann, D. FRAC Mode-of-action Classification and Resistance Risk of Fungicides / D. Hermann, K. Stenzel // Modern Crop Protection Compounds, Third Edition. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH. – 2019. – P. 589-608.

Histone H3K4 methylation regulates hyphal growth, secondary metabolism and multiple stress responses in *Fusarium graminearum* / Y. Liu, N. Liu, Y. Yin, Y. Chen, J. Jiang, Z. Ma // Environmental Microbiology. – 2015. – Vol. 17, N 11. – P. 4615-4630.

Höfte, M. The use of *Pseudomonas* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases / M. Höfte, J. Köhl, W.J. Ravensberg // Microbial Bioprotectants for Plant Disease Management – Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing. – 2021. – 74 p.

Hollomon, D. Fungicide resistance: Facing the challenge / D. Hollomon // Plant Protection Science. – 2015. – Vol. 51. – P. 170–176.

Host Factors Modulating Ochratoxin A Biosynthesis during Fruit Colonization by *Aspergillus carbonarius* / U. Maor, O. Barda, S. Sadhasivam [et al.] // Journal of Fungi. – 2020. – Vol. 7, N 1, 10.

Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat / B.G. Batista, M.A. Chaves, P. Reginatto // Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. – 2020. – Vol. 53, e20200013.

Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol production in the genus *Chromobacterium* / E.T. Johnson, M.J. Bowman, R.P. Gomes [et al.] // Scientific Reports. – 2023. – Vol. 13, N 1, 14292.

Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex / S. Malz, M.N. Grell, C. Thrane [et al.] // Fungal Genetics and Biology. – 2005. – Vol. 42. – P. 420-443.

Identification of an intermediate for 1,8-melanin synthesis in a race-2 isolate of *Fulvia fulva* (Syn. *Cladosporium fulvum*) / R. Medina, C.G. Lucentini, M.E.E. Franco [et al.] // Heliyon. – 2018. – Vol. 4, e01036.

Importance of 2,4-DAPG in the biological control of brown patch by *Pseudomonas fluorescens* HP72 and newly identified genes involved in 2,4-DAPG biosynthesis / Y. He, S. Suzuki, T. Aono, H. Oyaizu // Soil Science and Plant Nutrition. – 2004. – Vol. 50, N 8. – P. 1287-1293.

Improved phloroglucinol production by metabolically engineered *Escherichia coli* / Y. Cao, X. Jiang, R. Zhang, M. Xian // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2011. – Vol. 91, N 6. – P. 1545-1552

In vitro effect of some fungicides on growth and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from *Capsicum* powder / L. Santos, S. Marin, V. Sanchis, A.J. Ramos / Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. – 2011. – Vol. 28, N 1. – P. 98-106.

In vitro experimental environments lacking or containing soil disparately affect competition experiments of *Aspergillus flavus* and co-occurring fungi in maize grains / T.D. Falade, S.H. Syed Mohdhamdan, Y. Sultanbawa [et al.] // Food Additives and Contaminants: Part A. – 2016. – Vol. 33, N 7. – P. 1241-1253.

Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* / D.M. Weller, D.V. Mavrodi, J.A. van Pelt [et al.] // Phytopathology. – 2012. – Vol. 102, N 4. – P. 403-412.

Inhibition of Respiration of *Candida albicans* by Small Molecules Increases Phagocytosis Efficacy by Macrophages / S. Cui, M. Li, R.Y.A. Hassan [et al.] // mSphere. – 2020. – Vol. 15, N 2, e00016-20

Inhibitory effects of respiration inhibitors on aflatoxin production / S. Sakuda, D.F. Prabowo, K. Takagi [et al.] // Toxins. – 2014. – Vol. 6, N 4. – P. 1193-1200.

Inoculum size effect in dimorphic fungi: extracellular control of yeast-mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi* / J.M. Hornby, S.M. Jacobitz-Kizzier, D.J. McNeel [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – Vol. 70, N 3. – P. 1356–1359

Investigating the Induced Systemic Resistance Mechanism of 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) using DAPG Hydrolase-Transgenic *Arabidopsis* / D.H. Chae, D.R. Kim, M.S. Cheong, Y.B. Lee [et al.] // The Plant Pathology Journal. – 2020. – Vol. 36, N 3. – P. 255-266

Involvement of the ABC transporter BcAtrB and the laccase BcLCC2 in defence of *Botrytis cinerea* against the broad-spectrum antibiotic 2,4-

diacetylphloroglucinol / A. Schouten, G. van den Berg, V. Edel-Hermann, C. Steinberg, N. Gautheron, C. Alabouvette, J.M. Raaijmakers // Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 10, N 5. – P. 1145-1157

Isoeugenol affects expression pattern of conidial hydrophobin gene RodA and transcriptional regulators MedA and SomA responsible for adherence and biofilm formation in *Aspergillus fumigatus* / L. Gupta, P. Sen, A.K. Bhattacharya, P. Vijayaraghavan // Archives of Microbiology. – 2022. – Vol. 204, 214.

Jamet, E. Plant cell wall proteins and development / E. Jamet, C. Dunand // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, N 8, 2731.

Jayani, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review / R. Jayani, S. Saxena // Process Biochemistry. – 2005. – Vol. 40. – P. 2931–2944.

Jones, S.K. Fungal mating pheromones: choreographing the dating game / S.K. Jones, R.J. Bennett // Fungal Genetics and Biology. – 2011. – Vol. 48. – P. 668-676.

Jørgensen, L.N. Azole use in agriculture, horticulture, and wood preservation - Is it indispensable? / L.N. Jørgensen, T.M. Heick // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2021. – Vol. 11, 730297.

Kamei, Y. Lysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by 2,4-diacetylphloroglucinol produced by *Pseudomonas* sp. AMSN isolated from a marine alga / Y. Kamei, A. Isnansetyo // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2003. – Vol. 21, N 1. – P. 71-74.

Katsuyama, Y. Type III polyketide synthases in microorganisms / Y. Katsuyama, Y. Ohnishi // Methods in Enzymology. – 2012. – Vol. 515. – P. 359-377.

Kohlstedt, M. GC-MS-based ¹³C metabolic flux analysis resolves the parallel and cyclic glucose metabolism of *Pseudomonas putida* KT2440 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / M. Kohlstedt, C. Wittmann // Metabolic Engineering. – 2019. – Vol. 54. – P. 35-53.

Kubicek, C.P. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi / C.P. Kubicek, T.L. Starr, N.L. Glass // Annual Review of Phytopathology. – 2014. – Vol. 52. – P. 427-451.

Kumar, P. A perspective on varied fungal virulence factors causing infection in host plants / P. Kumar, R. Sharma, K. Kumar // Molecular Biology Reports. – 2024. – Vol. 51, N 1, 392.

Kuzyakov, Y. Rhizosphere size and shape: temporal dynamics and spatial stationarity / Y. Kuzyakov, B.S. Razavi // Soil Biology and Biochemistry. – 2019. – Vol. 135. – P. 343-360.

Kwak, Y.S. Take-all of wheat and natural disease suppression: A review / Y.S. Kwak, D.M. Weller // Plant Pathology Journal. – 2013. – Vol. 29, N 2. – P. 125-135.

Lainhart, W. *Fusarium* spp., a genus of common plant pathogens that can cause devastating, opportunistic human disease / W. Lainhart // Clinical Microbiology Newsletter. – 2018. – Vol. 40, N 1. – P. 1-5.

Latgé, J.P. Cell wall of *Aspergillus fumigatus*: Variability and response to stress / J.P. Latgé // Fungal Biology. – 2023. – Vol. 127, N 7-8. – P. 1259–1266.

Lee, K. Endophytic *Fusarium verticillioides* reduces disease severity caused by *Ustilago maydis* on maize / K. Lee, J.J. Pan, G. May // FEMS Microbiology Letters. – 2009. – Vol. 299, N 1. – P. 31-37.

Liu, H. Suppression of Hyphal Formation in *Candida albicans* by Mutation of a STE12 Homolog / H. Liu, J. Kohler, G.R. Fink // Science, New Series. – 1994. – Vol. 266, N 5191. – P. 1723-1726.

Mahapatra, S. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde / S. Mahapatra, R. Yadav, W. Ramakrishna // Journal of Applied Microbiology. – 2022. – Vol. 132, N 5. – P. 3543-3562.

Major Biological Control Strategies for Plant Pathogens / M.A. Pandit, J. Kumar, S. Gulati [et al.] // Pathogens – 2022. – Vol. 11, N 2, 273.

Maplestone, R.A. The evolutionary role of secondary metabolites--a review / R.A. Maplestone, J.M. Stone, D.H. Williams // Gene. – 1992. – Vol. 115, N 1-2. – P. 151-157

Mechanisms of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* / A.V. Nywening, J.M. Rybak, P.D. Rogers, J.R. Fortwendel // Environmental Microbiology. – 2020. – Vol. 22, N 12. – P. 4934-4952.

Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia / M. Pihet, P. Vandeputte, G. Tronchin [et al.] // BMC Microbiology. – 2009. – Vol 9, N 177. – 11 p.

Microbial chemical signaling: a current perspective / H.M. Bandara, O.L. Lam, L.J. Jin, L. Samaranayake // Critical Reviews in Microbiology. – 2012. – Vol. 38, N 3. – P. 217-249.

Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots / D.A. Phillips, T.C. Fox, M.D. King [et al.] // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 136, N 1. – P. 2887-2894.

Microbial Pyrrolnitrin: Natural Metabolite with Immense Practical Utility / S. Pawar, A. Chaudhari, R. Prabha [et al.] // Biomolecules. – 2019. – Vol. 9, N 9, 443.

Miranda, A. Fungal biofilms: insights for the food industry / A. Miranda, F. Leães, M.V. Copetti // Current Opinion in Food Science. – 2022. – Vol. 46, 100846.

Mishra, J. 2,4-Diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* JM-1 for management of ear rot disease caused by *Fusarium moniliforme* in *Zea mays* L. / J. Mishra, I. Mishra, N.K. Arora // 3 Biotech. – 2022. – Vol. 12, N 6, 138.

Modern Fungicides: Mechanisms of Action, Fungal Resistance and Phytotoxic Effects / E.V. Baibakova, E.E. Nefedjeva, M. Suska-Malawska [et al.] // Annual Research & Review in Biology. – 2019. – Vol. 32, N 3. – P. 1-16.

Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species / J. Varga, A. Juhász, F. Kevei, Z. Kozakiewicz // European Journal of Plant Pathology. – 2004. – Vol. 110. – P. 627-640.

Müller, M.S. Protozoa drive the dynamics of culturable biocontrol bacterial communities / M.S. Müller, S. Scheu, A. Jousset // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 6, e66200.

Munkvold, G.P. *Fusarium* species and their associated mycotoxins / G.P. Munkvold // Methods in Molecular Biology. – 2017. – Vol. 1542. – P. 51-106.

Murillo, J. Bacteria-Plant Interactions: Advanced Research and Future Trends / J. Murillo, B.A. Vinatzer, R.W. Jackson, D.L. Arnold // Poole: Caister Academic Press, 2015. – 244 p.

Nadal, M. Dimorphism in fungal plant pathogens / M. Nadal, M.D. García-Pedrajas, S.E. Gold // FEMS microbiology letters. – 2008. – Vol. 284, N 2, P. 127-134.

Nakajima, T. Fungicides application against *Fusarium* head blight in wheat and barley for ensuring food safety / T. Nakajima // Fungicides. – London: InTech, 2010. – P.139-156.

Natural Compounds: A Hopeful Promise as an Antibiofilm Agent Against Candida Species / A. Shariati, M. Didehdar, S. Razavi [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Vol 13, 917787.

Natural product osthole can significantly disrupt cell wall integrity and dynamic balance of *Fusarium oxysporum* / K. Hu, R. Li, F. Mo [et al.] // Pesticide Biochemistry and Physiology. – 2023. – Vol. 196, 105623.

Nji, Q.N. Soil *Aspergillus* species, pathogenicity and control perspectives / Q.N. Nji, O.O. Babalola, M. Mwanza // Journal of Fungi. – 2023. – Vol. 9, N 7, 766.

Novel synthesized 2,4-DAPG analogues: antifungal activity, mechanism and toxicology / L. Gong, H. Tan, F. Chen [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6, 32266.

O'Brien, J. An ecological perspective of microbial secondary metabolism / J. O'Brien, G.D. Wright // Current Opinion in Biotechnology. – 2011. – Vol. 22, N 4. – P. 552-558.

Pal, K.K. Biological control of plant pathogens / K.K. Pal, B.M. Gardener // The Plant Health Instructor. – 2006. – Vol. 2. – P. 1117-1142.

Partial purification and characterization of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* VSMKU3054 against bacterial wilt disease of tomato / P. Suresh, G. Varathraju, V. Shanmugaiah [et al.] // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2021. – Vol. 28, N 4. – P. 2155-2167.

Pedersen MA. Strobilurin fungicide secondary plant stress alleviation effects. – Lincoln: University of Nebraska – 2016. – 24 P.

Perincherry, L. *Fusarium*-produced mycotoxins in plant-pathogen interactions / L. Perincherry, J. Lalak-Kańczugowska, Ł. Stępień // *Toxins*. – 2019. – Vol. 11, N 11, 664.

Perrone, G. *Aspergillus* species and their associated mycotoxins / G. Perrone, A. Gallo // *Methods in Molecular Biology*. – 2017. – Vol. 1542. – P. 33-49.

Phenotypic and proteomic analysis of the *Aspergillus fumigatus* ΔPrtT, ΔXprG and ΔXprG/ΔPrtT protease-deficient mutants / E. Shemesh, B. Hanf, S. Hagag [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8, 2490.

PhlD-based genetic diversity and detection of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* / L. De La Fuente, D.V. Mavrodi, B.B. Landa [et al.] // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2006. – Vol. 56, N 1. – P. 64-78.

PhlF– mutant of *Pseudomonas fluorescens* J2 improved 2,4-DAPG biosynthesis and biocontrol efficacy against tomato bacterial wilt / T.T. Zhou, C.Y. Li, D. Chen [et al.] // *Biological Control*. – 2014. – Vol. 78. – P. 1-8.

Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture / R. Backer, J.S. Rokem, G. Ilangumaran [et al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9, 1473.

Plant Pathogenic Fungi / G. Doehlemann, B. Ökmen, W. Zhu, A. Sharon // *Microbiology Spectrum*. – 2017. – Vol. 5, N 1. – P. 703-726.

Plant-associated fungal biofilms—knowns and unknowns / T.E. Motaung, C. Peremore, B. Wingfield, E. Steenkamp // *FEMS Microbiology Ecology*. – 2020. – Vol. 96, N 12, fiae224.

Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction / B. Oeser, P.M. Heidrich, U. Müller, P. Tudzynski, K.B. Tenberge // *Fungal Genetics and Biology*. – 2002. – Vol. 36, N 3. – P. 176-186.

Ponts, N. Mycotoxins are a component of *Fusarium graminearum* stress-response system / N. Ponts // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6, 1234.

PKSP-dependent reduction of phagolysosome fusion and intracellular kill of *Aspergillus fumigatus* conidia by human monocyte-derived macrophages / B. Jahn, K. Langfelder, U. Schneider [et al.] // *Cell Microbiology*. – 2002. – Vol. 4, N 12. – P. 793-803.

Production, stability and degradation of *Trichoderma* gliotoxin in growth medium, irrigation water and agricultural soil / R. Jayalakshmi, R. Oviya, K. Premalatha [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, 16536.

Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity / M. Chandrasekaran, B. Thangavelu, S.C. Chun [et al.] // *Journal of General Plant Pathology*. – 2016. – Vol. 82. – P. 233-239

Pseudomonas putida improved soil enzyme activity and growth of kasumbha under low input of mineral fertilizers / A. Nosheen, H. Yasmin, R. Naz [et al.] // *Soil Science and Plant Nutrition*. – 2018. – Vol. 64, N 4. – P. 520-525.

Pseudomonas Strains that Exert Biocontrol of Plant Pathogens / J. Mercado-Blanco, J.L. Ramos, J. Goldberg, A. Filloux // *Pseudomonas*. – Springer: Dordrecht. – 2015. – P. 121-172.

Reddi, T.K. Phloroglucinol mono- and triacetate from *Pseudomonas fluorescens* / T.K. Reddi, A.A. Borovkov // *Mikrobiologiya*. – 1969. – Vol. 38, 133.

Reddy, L. Ochratoxins-food contaminants: impact on human health / L. Reddy, K. Bhoola // *Toxins*. – 2010. – Vol. 2, N 4. – P. 771-779.

Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of phlF as a transcriptional repressor / I. Delany, M.M. Sheehan, A. Fenton [et al.] // *Microbiology*. – 2000. – Vol. 146, N 2. – P. 537-546

Roles of the Gac-Rsm pathway in the regulation of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 / D. Wang, S.H. Lee, C. Seeve [et al.] // *MicrobiologyOpen*. – 2013. – Vol. 2, N 3. – P. 505-524.

Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond / V. Vives-Peris, C. de Ollas, A. Gómez-Cadenas, R.M. Pérez-Clemente // Plant Cell Reports. – 2020. – Vol. 39, N 1. – P. 3-17.

Rosier, A. Quorum quenching activity of the PGPR *Bacillus subtilis* UD1022 alters nodulation efficiency of *Sinorhizobium meliloti* on *Medicago truncatula* / A. Rosier, P.B. Beauregard, H.P. Bais // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 11, 596299.

Sabaté, D.C. *Bacillus amyloliquefaciens* strain enhances rhizospheric microbial growth and reduces root and stem rot in a degraded agricultural system / D.C. Sabaté, C.P. Carolina // Rhizosphere. – 2022. – Vol. 22, 100544.

Satish, S. Echinocandin Resistance in *Aspergillus fumigatus* Has Broad Implications for Membrane Lipid Perturbations That Influence Drug-Target Interactions / S. Satish, D.S. Perlin // Microbiology Insights. – 2019. – Vol. 12, 1178636119897034.

Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing / A. Jousset, E. Lara, L.G. Wall, C. Valverde // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, N 11. – P. 7083-7090.

Shanthi, A.T. Biocontrol potentials of plant growth promoting rhizobacteria against *Fusarium* wilt disease of cucurbit / A.T. Shanthi, R.R. Vittal // ESci Journal of Plant Pathology. – 2013. – Vol. 2. – P. 156-161.

Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture / M.P. Lutz, S. Wenger, M. Maurhofer [et al.] // FEMS Microbiology Ecology. – 2004. – Vol. 48, N 3. – P. 447-455.

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.

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

Stepanov, A.A., Poshvina D.V., Vasilchenko A.S. 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.

Sterol Composition of Clinically Relevant Mucorales and Changes Resulting from Posaconazole Treatment / C. Müller, T. Neugebauer, P. Zill [et al.] // Molecules. – 2018. – Vol. 23, N 5, 1218

Structure and Catalytic Mechanism of a Bacterial Friedel-Crafts Acylase / T. Pavkov-Keller, N.G. Schmidt, A. Żądło-Dobrowolska [et al.] // ChemBioChem. – 2019. – Vol. 20, N 1. – P. 88-95

Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere / S.T. Chancey, D.W. Wood, E.A. Pierson, L.S. Pierson // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68, N 7. – P. 3308-3314

Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates / M.A. de Chaves, T. Ferreira do Amaral, N. Monteiro da Silva Rodrigues Coutinho [et al.] // Mycoses. – 2020. – Vol. 63, N 10. – P. 1069-1082

Takeuchi, K. ppGpp controlled by the Gac/Rsm regulatory pathway sustains biocontrol activity in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 / K. Takeuchi, K. Yamada, D. Haas // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2012. – Vol. 25, N 11. – P. 1440-1449.

The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens / A. ten Have, K.B. Tenberge, A.E. Benen [et al.] // The Mycota, Vol. XI «Application in Agriculture». – Berlin: Springer, 2009 – P. 341-358.

The bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol impairs mitochondrial function and affects calcium homeostasis in *Neurospora crassa* / D.M. Troppens, M. Chu, L.J. Holcombe [et al.] // Fungal Genetics and Biology. – 2013. – Vol. 56. – P. 135-146.

The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene

(gfaA) and increased deposition of chitin in the cell wall / A.F. Ram, M. Arentshorst, R.A. Damveld [et al.] // Microbiology. – 2004. – Vol. 150, N 10. – P. 3315-3326.

The effect of seed bacterization with *Bacillus paralicheniformis* 2R5 on bacterial and fungal communities in the canola rhizosphere / J. Świątczak, A. Kalwasińska, A. Szabó, M.S. Brzezinska // Microbiological Research. – 2023. – Vol. 275, 127448.

The Good, the Bad, and the Ugly: Mycotoxin Production During Postharvest Decay and Their Influence on Tritrophic Host-Pathogen-Microbe Interactions / H.P. Bartholomew, M. Bradshaw, W.M. Jurick II, J.M. Fonseca // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12, 611881

The identification of 2,4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *Plethodon cinereus* / R.M. Brucker, C.M. Baylor, R.L. Walters [et al.] // Journal of Chemical Ecology. – 2008. – Vol. 34, N 1. – P. 39-43.

The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of Azospirillum genes involved in plant-growth promotion / E. Combes-Meynet, J.F. Pothier, Y. Moënne-Loccoz, C. Prigent-Combaret // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2011. – Vol. 24, N 2. – P. 271-284

The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms / J.M. Raaijmakers, T.C. Paulitz, C. Steinberg [et al.] // Plant and Soil. – 2009. – Vol. 321. – P. 341-361.

The Stress Response Regulator AflSkn7 Influences Morphological Development, Stress Response, and Pathogenicity in the Fungus *Aspergillus flavus* / F. Zhang, G. Xu, L. Geng [et al.] // Toxins. – 2016. – Vol. 8, N 7, 202.

The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology / R. Dean, J.A. Van Kan, Z.A. Pretorius [et al.] // Molecular Plant Pathology. – 2012. – Vol. 13, N 4. – P. 414-430.

Toxicity of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) to plant-parasitic and bacterial-feeding nematodes / S.L. Meyer, J.M. Halbrecht, L.K. Carta [et al.] // Journal of Nematology. – 2009. – Vol. 41, N 4. – P. 274-280

Toxicological impact of strobilurin fungicides on human and environmental health: a literature review / F.G. Leite, C.F. Sampaio, J.A. Cardoso Pires [et al.] // Journal of Environmental Science and Health, Part B. – 2024. – Vol. (59), N 4 – P. 142-151.

Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings / A.E. Glenn, N.C. Zitomer, A.M. Zimeri [et al.] // Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2008. – Vol. 21, N 1. – P. 87-97

Triazole Priming as an Adaptive Response and Gateway to Resistance in *Aspergillus fumigatus* / E. Harish, A. Sarkar, M. Handelsman [et al.] // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2022. – Vol. 66, N 8, e0045822.

Velusamy, P. Rhizosphere bacteria for biocontrol of bacterial blight and growth promotion of rice / P. Velusamy, J.E. Immanuel, S.S. Gnanamanickam // Rice Science. – 2013. – Vol. 20, N 5. – P. 356-362.

Wong, H.C. Regulation of growth and pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentrations / H.C. Wong, Y.C. Lin, P.E. Koehler // Mycologia. – 1981. – Vol. 73. – P. 649-654.