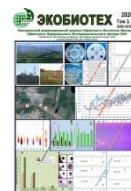




ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

http://ecobiotech-journal.ru



ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ ФИТОПАТОГЕННЫХ И САПРОТРОФНЫХ МИКРОМИЦЕТОВ НА РОСТ, ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ И АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ PGPR ШТАММОВ *BACILLUS* И *PAENIBACILLUS*

Актуганов Г.Э.*, Галимзянова Н.Ф.,
Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А., Сафина В.Р.,
Рябова А.С., Бойко Т.Ф., Мильман П.Ю.,
Мелентьев А.И.

Уфимский Институт биологии Уфимского федерального
исследовательского центра РАН, Уфа (Россия)

*E-mail: glect@anrb.ru

Методом ультрафильтрации из культуральной среды штаммов микромицетов *Bipolaris sorokiniana* ИБ Г-12, *Fusarium oxysporum* ВКМ F-137, *Rhizoctonia solani* ВКМ F-895 и *Trichoderma harzianum* ИБ Г-58 были выделены водорастворимые метаболиты пептидной природы. Фракции низкомолекулярных метаболитов ($M_w \geq 1$ кДа) всех грибов характеризовались сходными значениями относительной подвижности ($R_f \sim 0,37-0,39$). При оценке методом диффузии в агаре бактерицидную активность показывали только экзо-метаболиты *F. oxysporum* и *B. sorokiniana*. В глубокой культуре грибные метаболиты избирательно ингибировали рост PGPR-бактерий, наибольшую чувствительность при этом проявлял штамм *Paenibacillus ehimensis* ИБ-739. В то же время, грибные метаболиты стимулировали рост штамма *B. subtilis* ИБ-54 и неспецифическое повышение его фунгицидной активности, тогда как у *P. ehimensis* ИБ-739 повышение антигрибной активности имело видоспецифический характер. Метаболиты большинства микромицетов при концентрациях $\geq 0,25-0,5$ мг/мл подавляли развитие биопленок обрастания только у штаммов *Bacillus*, характеризующихся высокой пленкообразующей способностью *in vitro*. Синтез хитинолитических ферментов штаммом *P. ehimensis* ИБ-739 индуцировался в присутствии водных экстрактов из мицелия ряда микромицетов, но не их экзометаболических.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus ehimensis*, PGPR-бактерии, биопленки, антигрибная активность, экзометаболические, *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*

EFFECT OF LOW-MOLECULAR WEIGHT EXOMETABOLITES PRODUCED BY PHYTOPATHOGENIC AND SAPROPHYTE MICROMYCETES ON THE GROWTH, BIOFILM FORMATION AND ANTAGONISTIC ACTIVITY OF PGPR STRAINS OF *BACILLUS* AND *PAENIBACILLUS*

Aktuganov G.E.*, Galimzianova N.F.,
Kuzmina L.Yu., Gilvanova E.A., Safina V.R.,
Ryabova A.S., Boyko T.F., Milman P.Yu.,
Melentiev A.I.

Ufa Institute of Biology of the Ufa Federal Research Centre of
the Russian Academy of Sciences, Ufa (Russia)

*E-mail: glect@anrb.ru

By using of ultrafiltration procedure water-soluble peptide metabolites were isolated from the culture filtrates of several fungal strains including *Bipolaris sorokiniana* IB G-12, *Fusarium oxysporum* VKM F-137, *Rhizoctonia solani* VKM F-895 and *Trichoderma harzianum* IB G-58. Fractions of low molecular weight metabolites ($M_w \geq 1$ kDa) from all fungal strains were characterized with similar values of relative mobility ($R_f \sim 0.37-0.39$). Only extracellular metabolites of *F. oxysporum* and *B. sorokiniana* demonstrated bactericidal activity in agar-diffusion tests. Under tests of submerged liquid cultures, fungal metabolites selectively inhibited the growth of PGPR bacteria; the strain of *Paenibacillus ehimensis* IB-739 was most sensitive to their action. At the same time, fungal metabolites stimulated the growth of the *B. subtilis* IB-54 and nonspecific increase of its fungicidal activity, while enhancement in antifungal effect of the *P. ehimensis* IB-739 was species-specific. Most fungal metabolites suppressed under concentrations $\geq 0.25-0.5$ mg/ml the development of fouling biofilms only in *Bacillus* strains that were characterized with high biofilm-forming ability *in vitro*. The synthesis of chitinolytic enzymes by the *P. ehimensis* IB-739 strain was induced in presence of aqueous extracts from the some of micromycetes' mycelia but not their extracellular metabolites.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus ehimensis*, *Paenibacillus*, PGPR-bacteria, biofilms, antifungal activity, exometabolites, *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma harzianum*

Поступила в редакцию: 09.10.2020

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время стало очевидным, что взаимодействия между бактериями и микромицетами играют важную роль во многих природных и биотехнологических процессах [Frey-Klett et al., 2011]. Бактериально-грибные взаимоотношения носят разнообразный характер, от метаболической кооперации до взаимного подавления роста. Перспективные биотехнологические направления, основанные на одновременном применении штаммов грибов и бактерий, включают совместную ферментацию, биоремедиацию загрязненных экосистем, при которой грибы могут использоваться в качестве векторов полезных бактерий, молекулярное конструирование гибридных молекул полимеров, ферментов, антибиотиков и др. [Frey-Klett et al., 2011]. Особенности взаимодействия между ростостимулирующими ризобактериями (PGPR) и микромицетами представляет особый интерес для понимания механизмов функционирования сообществ ризосферных микроорганизмов в аспекте их защитного и ростостимулирующего влияния на растение-хозяин [Whipps, 2001]. К настоящему времени весьма подробно исследовано воздействие штаммов антагонистических и PGPR-бактерий различных таксономических групп на широкий перечень фитопатогенных микроорганизмов, в том числе микромицетов [Comrants et al., 2005; Barea et al., 2005; Tariq et al., 2017]. При этом ответные реакции фитопатогенных грибов и их взаимное влияние на бактерии остаются малоизученными. Не всегда понятны также механизмы активации синтеза микробных метаболитов, подавляющих развитие фитопатогенов *in situ*. Согласно имеющимся данным, рост-ингибирующий эффект бактерий-антагонистов может осуществляться как при участии растения-хозяина, так и при непосредственном взаимодействии с фитопатогенами. Например, обнаружено, что инфицирование корней растения-хозяина (*T. aestivum*) грибом *Gaeumannomyces graminis* способствует усилению их экссудации, активизируя рост PGPR-штамма *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 в зоне инфекции и через активацию *phzR* гена запуская у него синтез феназин-1-карбоновой кислоты, ингибирующей дальнейшее развитие фитопатогена [Pierson III, Pierson, 1996]. У фитопатогенных грибов рода *Pythium* роль метаболита, участвующего в регуляции экспрессии генов биоконтроля антагонистических штаммов *Pseudomonas fluorescens*, может играть трегалоза [Whipps, 2001]. Важную сигнальную роль во взаимодействиях с растениями-хозяевами и микробными сообществами ризосферы могут играть летучие метаболиты фитопатогенных и сапротрофных микромицетов [Li et al., 2016]. К сигнальным молекулам, участвующим в регуляции транскрипции генных кластеров, кодирующих синтез некоторых антибиотиков ризосферными бактериями, может быть отнесена индолил-3-уксусная кислота (ИУК) [Matilla et al., 2018]. Поскольку ауксины синтезируются не только растениями и PGPR-бактериями, но также ризосферными и почвенными грибами [Hasan, 2018; Fonseca et al., 2018], их можно рассматривать как универсальные сигнальные соединения, способные в той или иной степени модулировать антагонистическую активность сообществ ризосферных бактерий. Однако вопрос о специфичности экзогенных и эндогенных сигналов подобной природы остается открытым.

Цель настоящей работы - оценка влияния *in vitro* экзометаболитов, образуемых штаммами фитопатогенных и сапротрофных грибов, на рост, формирование биопленок и антагонистическую активность штаммов ростостимулирующих бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, в т.ч. на показатели синтеза циклических липопептидов и продукции хитиназ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы фитопатогенных и сапротрофных микромицетов *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker (= *Cohliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur) ИБ Г-12, *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) Snyder et Hans. ВКМ F-137, *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn ВКМ F-895 и *Trichoderma harzianum* Rifai ИБ Г-58. Грибы поддерживали пересевами на картофельно-глюкозном агаре (КГА) при 28°C и хранили далее при 5°C.

В качестве тест-штаммов ростостимулирующих и антагонистических бактерий использовали культуры *Bacillus subtilis* IB-54, *B. atrophaeus* IB-33-1, *B. licheniformis* IB-P141 B21 и *Paenibacillus ehimensis* IB-739 из коллекции Института биологии УФИЦ РАН. Кроме того, в работе использовали штамм *B. thuringiensis* B-387 из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Бактериальные культуры поддерживали пересевами на LB агаре при 30°C, либо при 36°C на агаризованной среде K1 следующего состава (г/л): K₂HPO₄, 1; K₂HPO₄·3H₂O, 0,5; (NH₄)₂HPO₄, 0,5; MgSO₄·7H₂O, 0,2; CaCl₂, 0,1; пептон ферментативный, 3; дрожжевой экстракт, 3; кукурузный экстракт, 1; картофельный крахмал, 5; агар, 16.

Для получения экзометаболитов микромицеты стационарно выращивали в жидкой среде Чапека в течение 14 сут при 28°C. Выросшую мицелиальную биомассу собирали вакуумной фильтрацией на воронке Бюхнера, полученный культуральный фильтрат концентрировали ультрафильтрацией на модуле VivaFlow 200 (Sartorius, Германия) с размером пор 5 кДа. Ультрафильтрат, содержащий низкомолекулярные метаболиты грибов (≤5 кДа), лиофильно высушивали и перерастворяли в минимальном объеме деионизированной воды. Полученные фракции использовали как концентраты высокомолекулярных соединений (≥5 кДа) и низкомолекулярных метаболитов (≤5 кДа). Предварительный анализ экзометаболитов осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинах (10×20 см) с алюминиевой подложкой Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Образцы метаболитов наносили в объеме до 5 мкл на ТСХ-пластины и инкубировали в камере Latch-lid (20×20 см) с использованием в качестве растворителя смеси, включающей н-бутанол – аммиак – метанол – вода (5:4:2:1). Подвижные компоненты пептидной природы выявляли обработкой пластин 0,25%-ным раствором нингидрина (Merck, Германия) в ацетоне. Удельное содержание сухого вещества в образцах метаболитов определяли после высушивания 1 г каждого препарата при 105°C до постоянного веса.

Бактерицидную активность грибных метаболитов определяли методом диффузии в агар. Биомассу предварительно выращенных на агаризованной среде (см. выше) штаммов тест-бактерий суспендировали в стерильном физиологическом растворе и последовательно разбавляли до значения оптической плотности ОП₆₀₀=0,10. Приготовленные суспензии инокулировали по 0,1 мл на поверхность свежей агаризованной среды LB или K1; затем в агаре вырезали лунки (9 мм) стерильным пробочным сверлом, в которые вносили образцы грибных метаболитов (0,1 мл), предварительно пропущенные через бактериальные фильтры GVS (США) с диаметром пор 0,22 мкм. Степень подавления оценивали по диаметру стерильных зон вокруг лунок в газоне роста бактериальных культур после 48 ч инкубации при 36°C. Влияние грибных метаболитов на развитие бактерий оценивали также при их глубинном культивировании в жидкой питательной среде того же состава в статических условиях и при активном перемешивании. Статическое культивирование осуществляли в 96-лучноных круглодонных культуральных полистироловых планшетах (Corning, США) в течение 24 ч при 36°C. Бактериальные культуры суспендировали в бульоне LB, дополненном 1% глицерина и 0,05% MgSO₄·7H₂O (LBGM среда), до значения оптической плотности

ОП₆₀₀=0,02-0,05. Приготовленную суспензию вносили в лунки по 180 мкл и доводили до конечного объема 200 мкл водными растворами грибных метаболитов в различных разведениях. В контрольном варианте вместо метаболитов вносили эквивалентный объем стерильной дистиллированной воды. Влияние метаболитов на рост бактерий рассчитывали как процентное отношение значений оптической плотности контрольных вариантов. Действие метаболитов на бактерии в условиях интенсивной аэрации изучали при их выращивании в колбах Эрленмейера в бульоне LB или жидкой питательной среде K1 на шейкере-инкубаторе Innova 40R (New Brunswick, США) при 36°C и 220 об/мин. Время культивирования бактерий составляло от 72 до 120 ч; грибные метаболиты добавляли в стерильную среду в виде водного раствора в соотношении 1:50. Эффект на развитие бактерий выражали таким же способом, как и при статическом культивировании. Кроме того, для некоторых штаммов бактерий определяли титр методом серийных разведений.

Влияние грибных метаболитов на фунгицидную активность и продукцию циклических липопептидов исследуемыми штаммами, а также на их способность к формированию биопленок изучали, как описано ранее [Актуганов с соавт., 2019]. Подавление радиального роста колоний микромицетов метаболитами *P. ehimensis* IB-739 проверяли следующим образом. Фильтраты КЖ данного штамма, полученные его глубинным культивированием в жидкой среде, содержащей метаболиты различных микромицетов, предварительно стерилизовали пропусканием через бактериальные фильтры-насадки GVS (США) с диаметром пор 0,22 мкм и вносили по 0,1 мл в лунки (9 мм), вырезанные в КГА. Одновременно с бактериальными метаболитами в лунки вносили суспензии спор (~10⁵ спор/мл) тестируемых штаммов микромицетов. В контрольные лунки вместо бактериальных метаболитов вносили эквивалентный объем стерильного физиологического раствора. Чашки со средой инкубировали при 28°C, диаметр грибных колоний измеряли после 3-х и 5-ти суток культивирования. Степень ингибирования (%) радиального роста микромицетов рассчитывали по формуле: СИ=[(Д_к-Д_э)/Д_к]*100, где Д_к – диаметр контрольных колоний, Д_э – диаметр колоний, выросших в присутствии метаболитов *P. ehimensis* IB-739.

Анализ влияния грибных метаболитов, а также D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина на индукцию хитинолитических ферментов у штамма *P. ehimensis* IB-739 осуществляли на 2-3-е сутки его глубинного культивирования в модифицированной жидкой среде K1, не содержащей крахмал в качестве источника углерода (36°C, 220 об/мин). Хитиназную активность в культуральной среде измеряли согласно ранее описанной процедуре [Helistö et al., 2001]. Водные экстракты мицелия грибов *F. culmorum* и *B. sorokiniana* готовили следующим образом. Микромицеты выращивали стационарно в жидкой картофельно-глюкозной среде в течение 14 сут при 28°C; выросшую биомассу собирали и промывали водопроводной и дистиллированной водой на воронке Бюхнера. Промывку осуществляли до полного удаления остаточных сахаров культуральной среды в фильтрате. Отмытый мицелий высушивали при комнатной температуре, измельчали в лабораторной мельнице и суспендировали в водопроводной воде при концентрации 10 г/л. Суспензию инкубировали в водной бане при 100°C в течение 3 ч и после остывания пропускали через фильтровальную бумагу «Синяя лента» для удаления твердых частиц. Фильтрат лиофильно высушивали и растворяли в деионизированной воде, объемом 10% от первоначального. Полученный раствор пропускали через бактериальный фильтр Minisart RC25 (Sartorius, Германия) с диаметром пор 0,45 мкм и вносили в стерильную питательную среду в объемных соотношениях от 0,5 до 2%.

Эксперименты проводили в 3-кратной, а эксперименты в планшетах – в 4-кратной повторности. Данные выражали в виде средних значений и стандартного отклонения. Сравнительную оценку влияния грибных метаболитов на фунгицидную активность и уровень продукции липопептидов исследуемыми штаммами на основе данных линейной регрессии и корреляционного анализа по Пирсону проводили с помощью программы OriginPro 2018 (версия b9.5.0.193, “OriginLab Corp.”) и пакета анализа MS-Excel-2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительный ТСХ-анализ внеклеточных метаболитов, образуемых различными штаммами микромицетов в среде Чапека, показал наличие пептид-содержащих компонентов во всех образцах (рис. 1А). Визуальная оценка полученных хроматограмм показала сходство относительной подвижности фракций низкомолекулярных соединений ($M_w \leq 5$ кДа) всех микромицетов (рис. 1В).

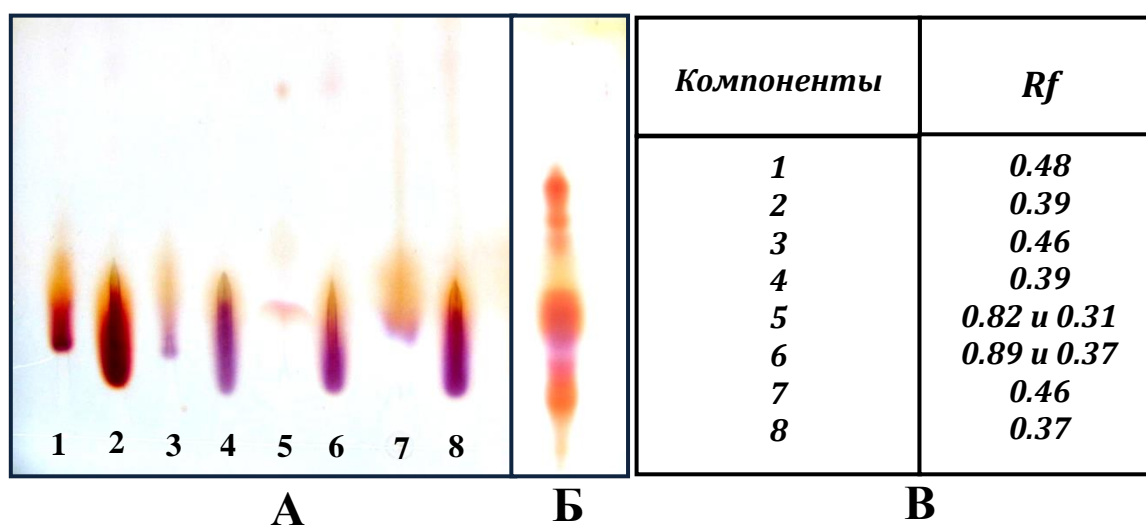


Рис. 1. А. Тонкослойная хроматография образцов экзометаболитов микромицетов на пластине силикагеля 60 F₂₅₄ (10×20 см) в системе *n*-BuOH:CH₃COOH:H₂O (12:4:6). Окрашивание 0,25%-ным нингидрином в ацетоне. Концентрированная КЖ (≥ 5 кДа) и ультрафильтрат КЖ (≤ 5 кДа), соответственно, *F. oxysporum* (1, 2), *B. sorokiniana* (3, 4), *R. solani* (5, 6) и *T. harzianum* (7, 8).
Б. ТСХ-хроматограмма ультрафильтрата КЖ *P. ehimensis* IB-739. **В.** Относительная подвижность пептидных компонентов грибных экзометаболитов.

Однако, экзометаболиты штамма *F. oxysporum* F-137 существенно отличались от метаболитов остальных грибов как по характеру окрашивания (интенсивно красное против фиолетового у других штаммов), так и по концентрации. Отсутствие дифференцированных групп во фракциях подвижных метаболитов свидетельствует о сходстве физико-химических характеристик анализируемых веществ. Для сравнения на рис. 1Б приведена хроматограмма экзометаболитов бактериального штамма *P. ehimensis* IB-739, демонстрирующая более разнообразный состав низкомолекулярных соединений, разделяемых при аналогичных условиях. Фракции грибных экзометаболитов, по всей видимости, представлены пептидными компонентами с молекулярной массой (M_w) более 1 кДа, что подтверждается невысокими значениями коэффициента их относительной подвижности ($R_f \sim 0,37-0,39$). С другой стороны, низкая подвижность основных фракций метаболитов может быть связана с их слабым разделением в системе растворителей, включающей *n*-бутанол. Концентраты культуральной среды микромицетов, полученные с помощью ультрафильтрации, также содержали низкомолекулярные метаболиты, несколько отличающиеся по относительной

подвижности от соединений, содержащихся в фильтрате (≤ 5 кДа) (рис. 1В). Взаимодействие низкомолекулярных метаболитов с высокомолекулярными веществами могло приводить к их неравномерному распределению между фракциями пермеата и ретентата. Наименьшее содержание низкомолекулярных метаболитов наблюдалось в концентрате КЖ *R. solani* F-895. В отличие от других микромицетов, среди внеклеточных метаболитов этого гриба обнаруживались минорные компоненты, по относительной подвижности близкие к аминокислотам или небольшим пептидам (рис. 1А, В).

Среди метаболитов фитопатогенных, эндофитных и сапротрофных микромицетов охарактеризовано много биоактивных соединений пептидной природы [Goyal et al., 2016; Wang et al., 2018]. Наиболее известными из них являются циклические депсипептиды с антибактериальной активностью, часто встречающиеся у представителей рода *Fusarium* [Sondergaard et al., 2016]. Антагонистические штаммы грибов рода *Trichoderma* более известны продукцией пептабиолов и ряда других пептидных антибиотиков [Shrimbock et al., 1994; Peltola et al., 2004]. Среди выделенных грибных метаболитов бактерицидную активность в агаризованной среде обнаруживали только низкомолекулярные ($M_w \leq 5$ кДа) пептидные метаболиты из ультрафильтратов КЖ штаммов *F. oxysporum* F-137 и *B. sorokiniana* ИБ Г-12 (рис. 2А).

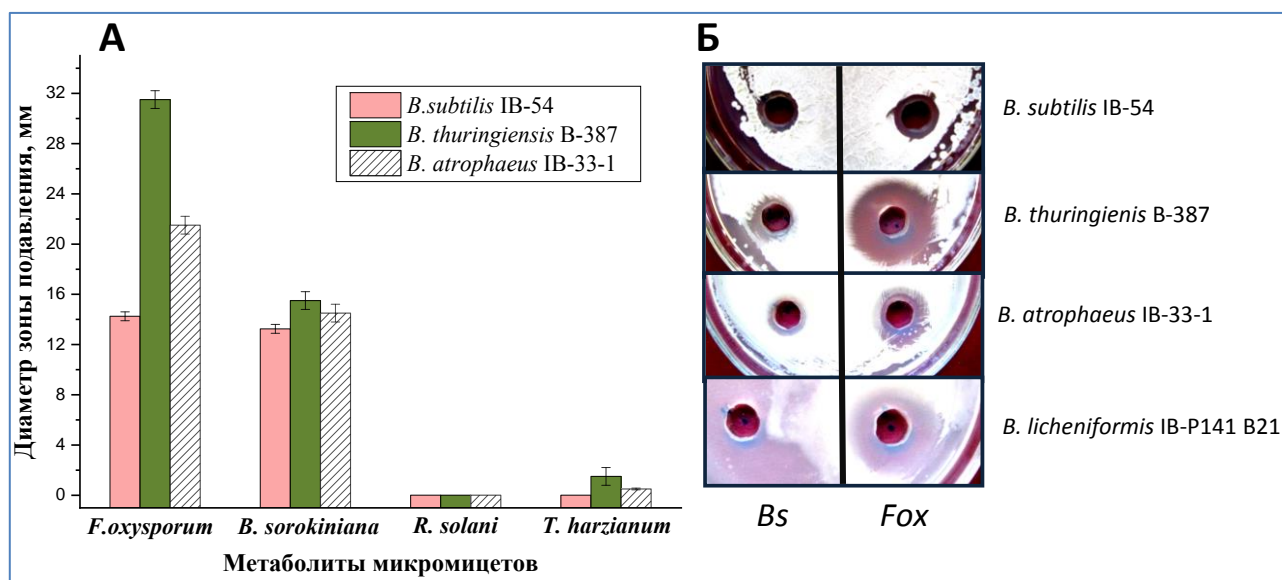


Рис. 2. А. Влияние низкомолекулярных пептидных экзометаболических (≤ 5 кДа) фитопатогенных и сапротрофных микромицетов на рост штаммов рода *Bacillus* на агаризованной среде LB (24 ч, 37°C). **Б.** Зоны ингибирования роста бактериальных культур метаболитами *B. sorokiniana* ИБ Г-12 (Bs) и *F. oxysporum* F-137 (Fox).

Наиболее выраженное ингибирование роста четырех штаммов рода *Bacillus* бактерий проявляли экзометаболические *F. oxysporum* F-137 (рис. 2Б). Вместе с тем, действие грибных метаболитов носило избирательный характер в отношении различных штаммов бацилл; наибольшую чувствительность проявлял инсектицидный штамм *B. thuringiensis* B-387, тогда как рост PGPR-бактерий, в особенности, *B. subtilis* IB-54 подавлялся значительно слабее (средний диаметр зон ингибирования обоих штаммов 25 и 12,9 мм, соответственно). Вторичные метаболиты *R. solani* F-895 и *T. harzianum* ИБ Г-58, не оказывая ингибирующего влияния на рост тест-бактерий, по всей видимости, активировали экспрессию генов синтеза каротиноидных пигментов у некоторых штаммов *Bacillus*, что приводило к их повышенному накоплению в среде культивирования (данные не представлены). Каротиноидные пигменты выполняют в основном фотопротекторную функцию у бацилл [Khaneja et al., 2010], однако,

известно также о неспецифической антибактериальной и антигрибной активности пигментов каротиноидной природы, образуемых некоторыми бактериями, в т.ч. бациллами [Zhao et al., 2015; Dawoud et al., 2020]. Незначительная антибактериальная активность, при оценке методом диффузии в агар, обнаруживалась также в концентрированной КЖ ($M_w \geq 5$ кДа) микромицетов *F. oxysporum* и *B. sorokiniana*, что обусловлено, по-видимому, присутствием в ней части низкомолекулярных метаболитов (рис. 1А).

В условиях глубинного культивирования влияние низкомолекулярных метаболитов микромицетов на рост различных представителей PGPR-бактерий существенно различалось. Так, низкомолекулярные метаболиты всех штаммов микромицетов не подавляли развитие *B. subtilis* IB-54, напротив, в их присутствии отмечалась увеличение интенсивности ($\geq 30\%$) бактериального роста на экспоненциальной стадии (рис. 3А). В отношении штамма *P. ehimensis* IB-739 действие низкомолекулярных метаболитов носило в целом ингибирующий характер, наиболее сильное подавляющее влияние (85-90%) демонстрировали экзометаболические *F. oxysporum*, как и при оценке на агаризованной среде (рис. 3Б).

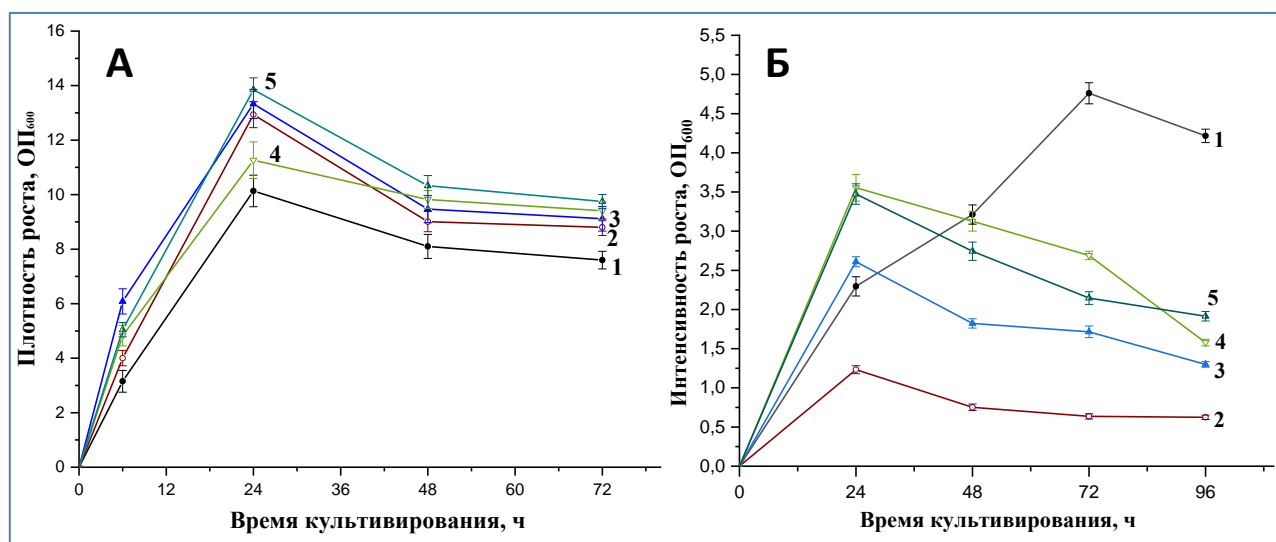


Рис. 3. Влияние низкомолекулярных метаболитов (≤ 5 кДа) микромицетов на динамику роста штаммов *B. subtilis* IB-54 (А) и *P. ehimensis* IB-739 (Б) при глубинном культивировании (36 °С, 220 об/мин). Объемная концентрация метаболитов 1:50, соответственно, около 1 мг/мл по сухому весу. 1 – контроль; 2 – 5- варианты с метаболитами грибов: *F. oxysporum* (2); *B. sorokiniana* (3); *R. solani* (4) и *T. harzianum* (5).

При этом, если в первые сутки культивирования *P. ehimensis* IB-739 интенсивность роста бактерий заметно возрастала в присутствии метаболитов грибов *R. solani* и *T. harzianum*, либо была сопоставима с контролем в присутствии метаболитов *B. sorokiniana*, то последующие этапы характеризовались противоположной тенденцией (рис. 3Б).

Видимый эффект высокомолекулярных соединений ($M_w \geq 5$ кДа) из культуральной среды микромицетов на рост *B. subtilis* IB-54 носил кратковременный характер, наиболее ярко проявляясь в основном в первые сутки глубинного культивирования бактерий (рис. 4А). При этом первоначальное возрастание интенсивности роста могло смениться его снижением, как в случае метаболитов *B. sorokiniana*. В целом же показатели роста *B. subtilis* IB-54 после 2-х суток культивирования были сопоставимы с контролем (рис. 4А) и не показывали критически значимых различий после 4-х суток культивирования (данные не представлены). Высокомолекулярные соединения микромицетов оказывали сходное влияние на рост штамма *P. ehimensis* IB-739 в первые 24 ч инкубации, однако в дальнейшем приводили к заметному его падению по сравнению с контролем, в отличие от *B. subtilis* IB-54 (рис. 4Б).

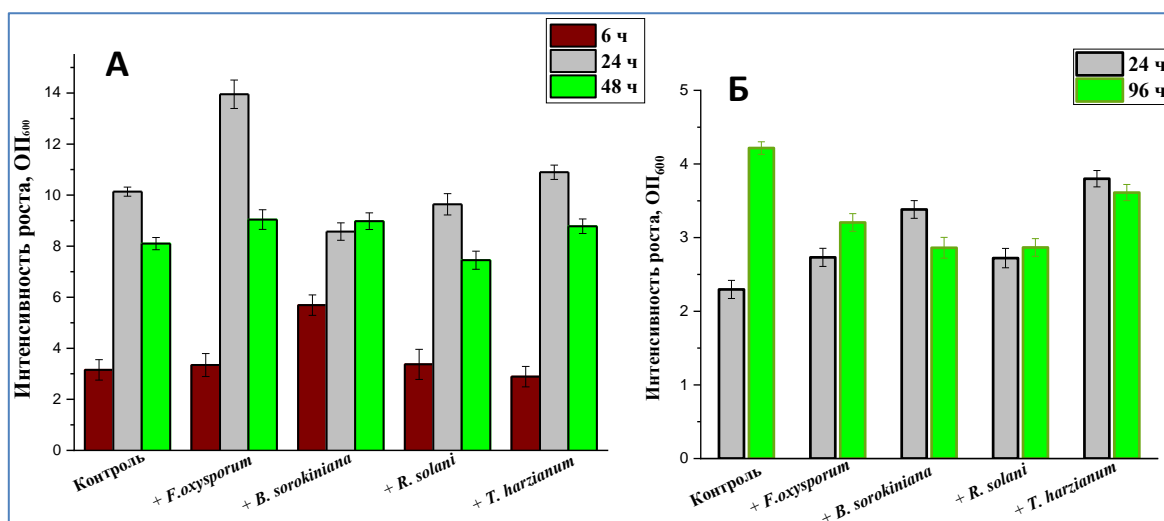


Рис. 4. Влияние фракций высокомолекулярных метаболитов (концентраты КЖ с $Mw \geq 5$ кДа) микромицетов на рост штаммов *B. subtilis* IB-54 (А) и *P. ehimensis* IB-739 (Б) на различных стадиях глубинного культивирования (36°C , 220 об/мин). Концентрация метаболитов $\sim 2,4$ мг/мл по сухому весу.

Интенсификация роста бактерий под влиянием грибных метаболитов на начальных этапах культивирования может быть обусловлена присутствием в них остаточных компонентов среды Чапека, в различной степени метаболизируемых исследуемыми штаммами микромицетов. Так, например, при культивировании *B. subtilis* IB-54 в присутствии низкомолекулярных соединений *F. oxysporum* наблюдалось существенное возрастание вязкости культуральной среды и биомассы бактерий, что является характерной чертой многих штаммов бацилл при росте в среде с сахарозой. Однако к концу первых суток вязкость КЖ снижалась до значений, сравнимых с контролем. В присутствии экзометаболитов *F. oxysporum* отмечено также умеренное образование *B. subtilis* IB-54 красного пигмента, изменяющего цвет культуральной среды по сравнению с контролем (данные не представлены). После 24 ч глубинного выращивания *B. subtilis* IB-54 в присутствии большинства грибных экзометаболитов увеличение плотности культуры сопровождалось достоверным возрастанием титра бактериальных клеток, за некоторыми исключениями (рис. 5).

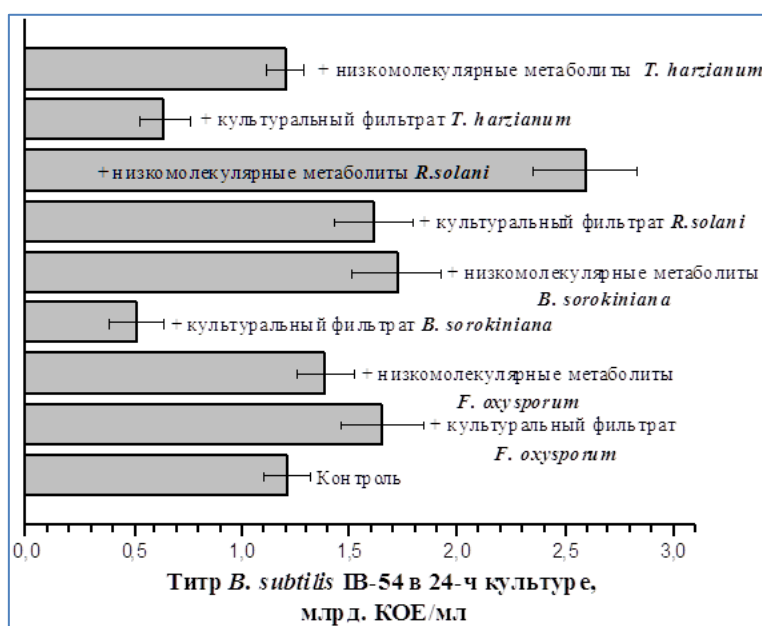


Рис. 5. Влияние фракций низкомолекулярных ($Mw \leq 5$ кДа) и высокомолекулярных ($Mw \geq 5$ кДа, культуральные фильтраты) метаболитов микромицетов на титр *B. subtilis* IB-54 после 24 ч глубинного культивирования (36°C , 220 об/мин). Концентрация метаболитов – см. рис. 3 и 4.

Анализ антибактериальной активности грибных метаболитов в стационарных условиях (культуральные планшеты) показал различный уровень чувствительности PGPR-штаммов рода *Bacillus*, а также специфику влияния соединений, продуцируемых различными штаммами микромицетов. Наибольшую устойчивость к действию метаболитов проявляли штаммы *B. subtilis* IB-54 и *B. licheniformis* IB-A41.4.2. Низкомолекулярные и высокомолекулярные вещества грибов не оказывали существенного влияния на развитие данных культур при концентрациях 0,25-1 и 0,5-2 мг/мл, соответственно. При повышенных концентрациях грибных метаболитов (5 и 10 мг/мл, соответственно) интенсивность роста *B. subtilis* IB-54 возрастала на 30-50% (табл. 1). Напротив, рост штамма близкородственного вида *B. atrophaeus* IB-33-1 заметно подавлялся высокими концентрациями метаболитов *B. sorokiniana* (~50%), но при этом, активировался (32-54%) в присутствии аналогичных количеств экзометаболитов *R. solani* и *T. harzianum* (табл. 1)

Таблица 1. Влияние различных концентраций грибных метаболитов на рост штаммов PGPR-бактерий при стационарном культивировании в планшетах (24 ч, 36°C)

Образец, концентрация метаболитов, мг/мл	Интенсивность роста тест-штаммов в лунках, ед. ОП ₆₀₀			
	<i>B. subtilis</i> IB-54	<i>B. atrophaeus</i> IB-33-1	<i>B. licheniformis</i> IB-P141 B21-1	<i>B. licheniformis</i> IB-A41.4.2
Контроль	1,004±0,108	0,622±0,184	0,672±0,003	0,623±0,083
Фракция высокомолекулярных соединений <i>B. sorokiniana</i>				
0,5	0,937±0,195	0,579±0,068	0,565±0,013	0,885±0,211
1	0,956±0,111	0,643±0,043	0,503±0,122	1,001±0,059
2	0,997±0,019	0,576±0,003	0,334±0,009	0,925±0,004
10	1,265±0,043	0,321±0,014	0,312±0,056	0,568±0,102
Фракция низкомолекулярных соединений <i>B. sorokiniana</i>				
0,25	1,088±0,091	0,521±0,050	0,439±0,103	0,917±0,022
0,5	1,070±0,028	0,505±0,010	0,368±0,018	1,025±0,016
1	1,193±0,074	0,472±0,001	0,365±0,051	1,039±0,178
5	1,484±0,025	0,274±0,004	0,923±0,093	1,056±0,137
Фракция высокомолекулярных соединений <i>R. solani</i>				
0,5	0,959±0,062	0,554±0,067	0,480±0,094	0,725±0,091
1	0,983±0,052	0,715±0,014	0,542±0,115	0,742±0,037
2	0,794±0,030	0,822±0,035	0,550±0,001	0,644±0,101
10	1,189±0,050	0,771±0,001	0,561±0,159	0,978±0,023
Фракция низкомолекулярных соединений <i>R. solani</i>				
0,25	0,952±0,186	0,617±0,016	0,485±0,078	0,832±0,001
0,5	0,941±0,066	0,639±0,019	0,374±0,091	0,883±0,068
1	1,193±0,029	0,717±0,011	0,388±0,110	1,019±0,045
5	1,347±0,017	0,749±0,033	0,236±0,016	0,742±0,008
Фракция высокомолекулярных соединений <i>T. harzianum</i>				
0,5	0,967±0,055	0,744±0,022	0,335±0,021	0,665±0,023
1	1,051±0,161	0,807±0,027	0,449±0,018	0,801±0,198
2	0,913±0,015	0,679±0,005	0,582±0,205	0,967±0,042
10	1,467±0,001	0,739±0,017	0,404±0,035	0,702±0,039
Фракция низкомолекулярных соединений <i>T. harzianum</i>				
0,25	1,087±0,010	0,474±0,032	0,310±0,001	0,604±0,022
0,5	1,030±0,023	0,544±0,021	0,422±0,038	0,464±0,134
1	1,265±0,043	0,658±0,059	0,271±0,008	0,317±0,027
5	1,558±0,022	0,956±0,148	0,443±0,004	0,988±0,160

Для других штаммов бацилл действие метаболитов отличалось по характеру концентрационной зависимости и проявлялось как в существенном снижении интенсивности роста, так и в его активации (табл. 1).

Из исследованных штаммов PGPR-бактерий *B. subtilis* IB-54 и *B. atrophaeus* IB-33-1 характеризовались довольно слабой, а *B. licheniformis* IB-P141 B21-1 и *B. licheniformis* IB-A41.4.2 - высокой способностью к формированию плёнок обрастания *in vitro*. Большинство грибных метаболитов не оказывали видимого влияния на образование биопленок первыми двумя штаммами: заметная активация наблюдалась только у штамма *B. subtilis* IB-54 при действии высоких концентраций (10 мг/мл) высокомолекулярных метаболитов *R. solani* и *T. harzianum* (возрастание – в 10-20 раз), и низкомолекулярных метаболитов *B. sorokiniana* (возрастание в 4-5 раз). Высокомолекулярные соединения *R. solani* при максимальной концентрации также в 2-3 раза увеличивали интенсивность формирования биопленок штаммом *B. atrophaeus* IB-33-1 (данные не представлены).

В отношении штаммов *B. licheniformis* IB-P141 B21-1 и *B. licheniformis* IB-A41.4.2 наблюдалась обратная картина – постепенное снижение уровня образования биопленок с увеличением концентрации грибных метаболитов в среде. Максимальное снижение (в 20-30 раз) формирования биопленки этими культурами отмечено при наиболее высоких концентрациях (5-10 мг/мл) большинства грибных метаболитов (данные не показаны). Таким образом, влияние грибных метаболитов на формирование биопленок штаммами PGPR-бактерий носило видо- и штаммоспецифический характер. Более сильный ингибирующий эффект в отношении биопленок *B. licheniformis* IB-P141 B21-1 и *B. licheniformis* IB-A41.4.2 по сравнению с относительно слабым воздействием на рост этих культур указывает на другие механизмы, не связанные с действием антибиотических соединений. Кроме поликетидов, в контроле образования биопленок могут принимать участие производные аминокислот, синтезируемые различными микромицетами, например, дикетопиперазины и др. [Bergamo Estrela, Abraham, 2016]. Как сообщалось ранее, антибиотические соединения микробного происхождения могут индуцировать и стимулировать образование биопленок некоторыми патогенными бактериями [Hoffman et al., 2005]. Однако, эффект высокомолекулярных метаболитов *R. solani* и *T. harzianum*, в наибольшей степени стимулирующих формирование биопленок *in vitro*, вероятно, также связан с активностью других соединений в силу отсутствия у них антибиотической активности в отношении большинства PGPR-штаммов.

Влияние грибных метаболитов на проявление антагонистической активности штаммом *B. subtilis* IB-54 и синтез им антигрибных соединений имело неспецифический характер и определялось различной чувствительностью тестируемых культур микромицетов. Так, синтез антигрибных веществ *B. subtilis* IB-54 возрастал в присутствии низкомолекулярных метаболитов *B. sorokiniana*, *F. oxysporum* и *T. harzianum*, при этом в двух последних случаях наблюдалась более высокая степень ингибирования роста *B. sorokiniana*, чем в присутствии метаболитов одноименного гриба, что можно объяснить более высокой чувствительностью *B. sorokiniana* к фунгицидному действию *B. subtilis* IB-54. С другой стороны, при использовании в качестве тест-объекта гриба *T. harzianum* ни одна из групп метаболитов не способствовала повышению антигрибной активности *B. subtilis* IB-54, а по отношению к *F. oxysporum* активность бактериальной культуры возрастала только в присутствии метаболитов данного гриба (рис. 6).

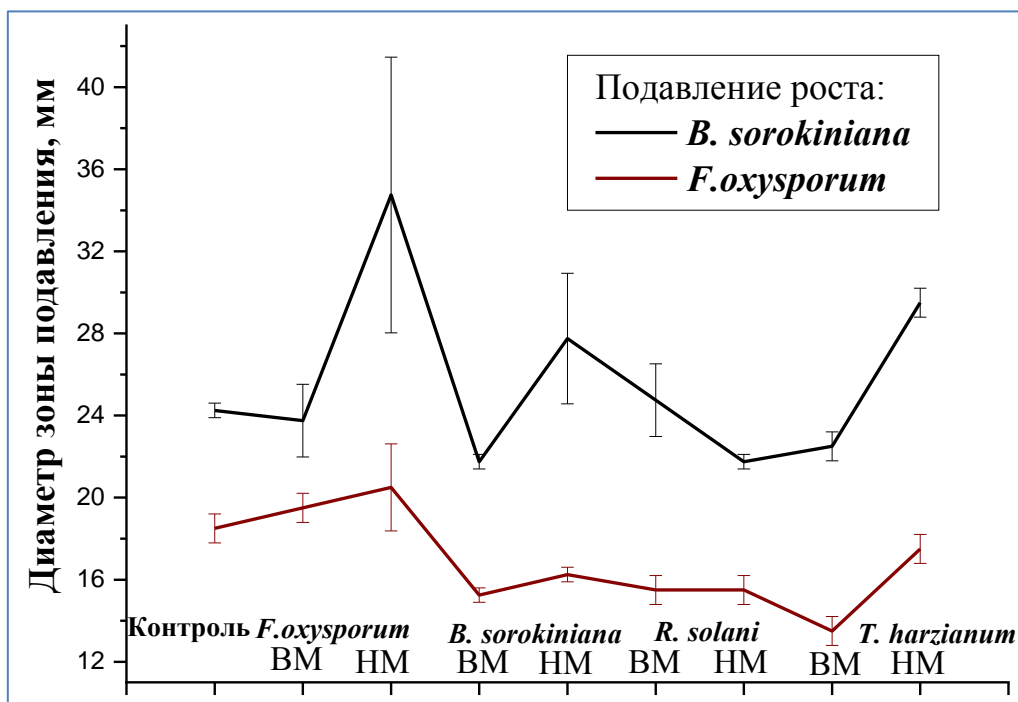


Рис. 6. Влияние высоко- (BM, 2,4 мг/мл) и низкомолекулярных метаболитов (HM, 1 мг/мл) микромицетов на антигрибную активность фильтрата КЖ *B. subtilis* IB-54 после 48 ч глубинного культивирования (36 °С, 220 об/мин).

Суммарная антигрибная активность фильтрата КЖ *B. subtilis* IB-54, выращенного в присутствии метаболитов микромицетов, не коррелировала и со значениями весового выхода и относительной рост-ингибирующей активности циклических липопептидов, продуцируемых этим штаммом в процессе культивирования (значения коэффициента корреляции по Пирсону $r_{x,y} = -0,28271$ и $-0,24336$, соответственно) (рис. 7).

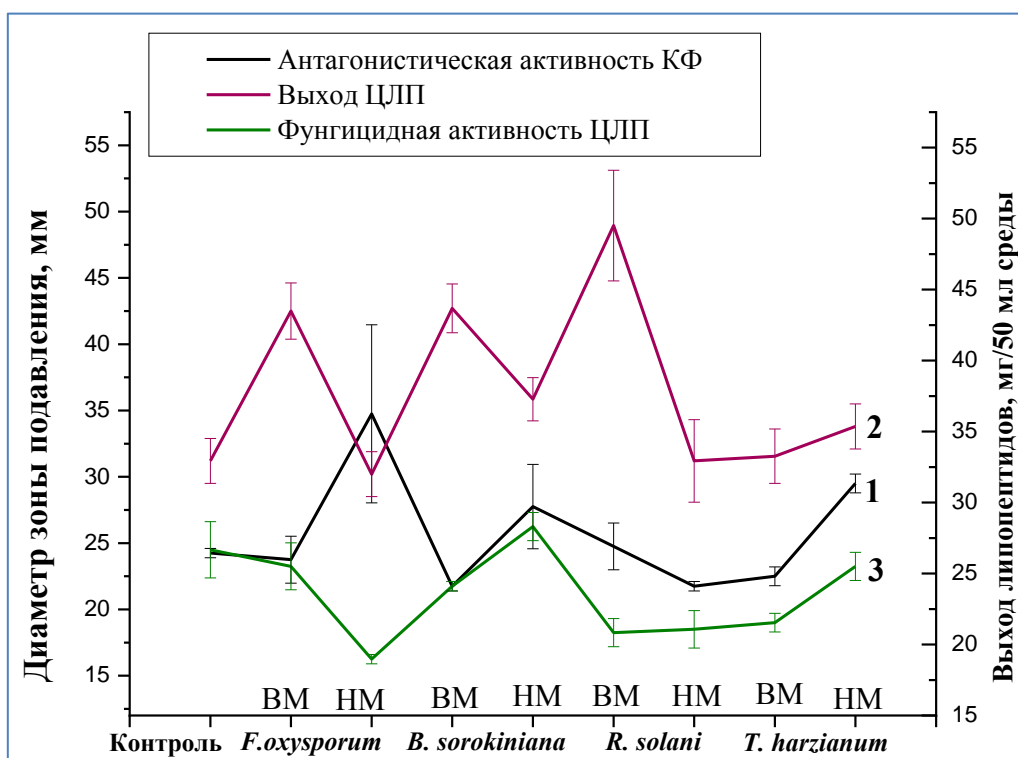


Рис. 7. Влияние высоко- (BM, 2,4 мг/мл) и низкомолекулярных метаболитов (HM, 1 мг/мл) микромицетов на антигрибную активность (1) фильтрата КЖ *B. subtilis* IB-54, накопление циклических липопептидов (ЦЛП, 2) и их фунгицидный эффект (3) (подавление роста *B. sorokiniana*).

Наиболее высокий уровень продукции *B. subtilis* IB-54 циклических липопептидов по весовому выходу наблюдался в присутствии высокомолекулярных метаболитов большинства штаммов микромицетов (рис. 7). При этом максимумы фунгицидной активности КЖ *B. subtilis* IB-54 и липопептидной фракции наблюдались в основном при добавлении в среду низкомолекулярных грибных метаболитов. Интересно, что фунгицидная активность фракций циклических липопептидов не коррелировала с их весовым выходом ($r_{x,y}=0,087131$). Регрессионный анализ также показал очень слабую взаимосвязь между всеми вышеупомянутыми показателями ($R^2 \ll 0,5$). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии прямого триггерного влияния низкомолекулярных грибных метаболитов на синтез циклических липопептидов штаммом *B. subtilis* IB-54; это может быть связано также с конститутивно высокой экспрессией у данного штамма нерибосомальных пептидил-синтетаз (NRPS), участвующих в синтезе этих соединений. В тоже время, низкомолекулярные экзометаболиты большинства микромицетов (за исключением *R. solani*) стимулировали повышение общей фунгицидной активности *B. subtilis* IB-54 *in vitro* (рис. 7).

Добавление низкомолекулярных грибных метаболитов ($M_w \leq 5$ кДа) в среду культивирования штамма *P. ehimensis* IB-739 приводило к специфическому возрастанию в фильтрате его КЖ рост-ингибирующей активности в отношении соответствующих штаммов микромицетов, из которых эти метаболиты были выделены (рис. 8). В то же время перекрестного возрастания фунгицидной активности *P. ehimensis* IB-739 против других штаммов микромицетов не наблюдалось (рис. 8).

Пептид-содержащие экзометаболиты всех рассмотренных в работе штаммов микромицетов не демонстрировали стимулирующего влияния на индукцию хитинолитических ферментов *P. ehimensis* IB-739 (данные не представлены).

Ранее нами сообщалось, что мицелий и компоненты клеточных стенок (хитин-глюкановый комплекс) фитопатогенных и сапротрофных микромицетов (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *A. terreus*, *Penicillium sp.*, *P. chrysogenum*, *B. sorokiniana*, *Fusarium culmorum*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Botrytis cinerea*, *Trichoderma viride* и др.) в различной степени индуцируют биосинтез хитиназ и хитозаназ у штаммов вида *P. ehimensis* и способствуют активному росту этих бактерий при использовании в качестве единственного источника углерода [Актуганов с соавт., 2001; 2008].

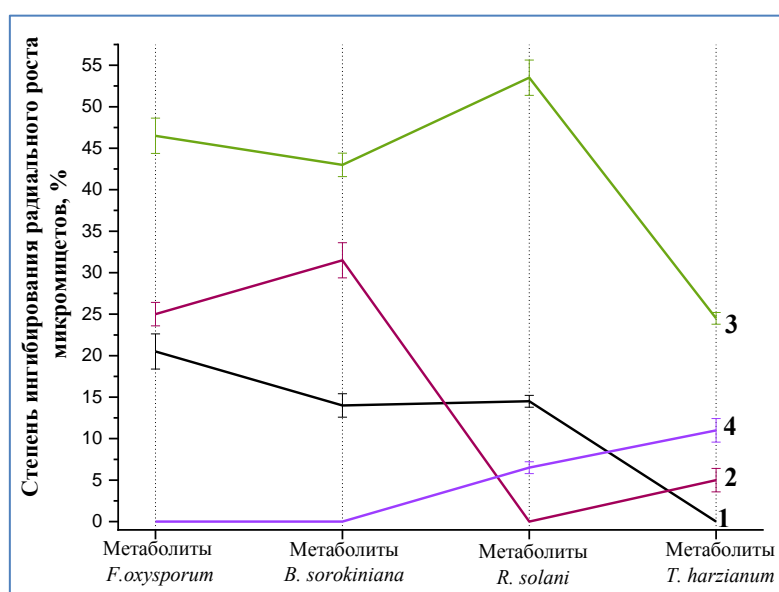


Рис. 8. Кривые ингибирования радиального роста *F. oxysporum* (1), *B. sorokiniana* (2), *R. solani* (3) и *T. harzianum* (4) фильтратами КЖ *P. ehimensis* IB-739, полученными при его глубинном культивировании (96 ч, 36 С, 220 об/мин) в присутствии низкомолекулярных метаболитов (1 мг/мл) соответствующих штаммов микромицетов.

Многие почвенные бактерии, в т.ч. представители родов *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Pseudomonas*, способны проявлять миколитическую активность и в ряде случаев ведут себя как микофаги [Kai, 2019]. Деградация клеточной стенки грибов происходит при действии разнообразных экзоферментов; наиболее адекватным показателем миколитической активности бактерий является, как правило, уровень синтеза хитиназ, хотя важными факторами подавления роста и лизиса мицелия грибов являются также β -глюканы и хитин-связывающие белки [Tarkka et al., 2009]. Другой механизм литической активности бактерий может быть основан на индукции у микромицетов программируемой клеточной смерти [Whichmann et al., 2008]. Метаболиты грибов, играющие роль сигналов, способных активировать миколитическую активность бактерий-антагонистов *in situ*, изучены в недостаточной степени и рассматриваются в рамках отдельных гипотез. Ключевую роль в микопаразитическом поведении бактерий играет их способность прикрепляться к клеткам грибов [Leveau, Preston, 2008]. Некоторые бактерии проявляют хемотаксис к экссудатам мицелия микромицетов; одной из важных хемотаксических сигнальных молекул у грибов *Fusarium*, по всей видимости, является фузаровая кислота [Frey-Klett et al., 2011]. Универсальными триггерами, запускающими экспрессию хитиназ у бактерий, могут быть растворимые фрагменты клеточных стенок грибов, в первую очередь, олигомерные производные хитина и глюкана, либо «гибриды» таких молекул. В некоторых случаях мономеры хитина и хитозана, частности D-глюкозамин, способствуют максимальной индукции хитиназ у бактерий [Lien et al., 2007]. Нами было установлено, что внесение растворимых сахаров – D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина в концентрациях 0,05-0,20% масс. способствует незначительному повышению (от 0,015 до 0,03-0,05 ед/мл) базового уровня секреции хитиназ штаммом *P. ehimensis* IB-739 (рис. 9).

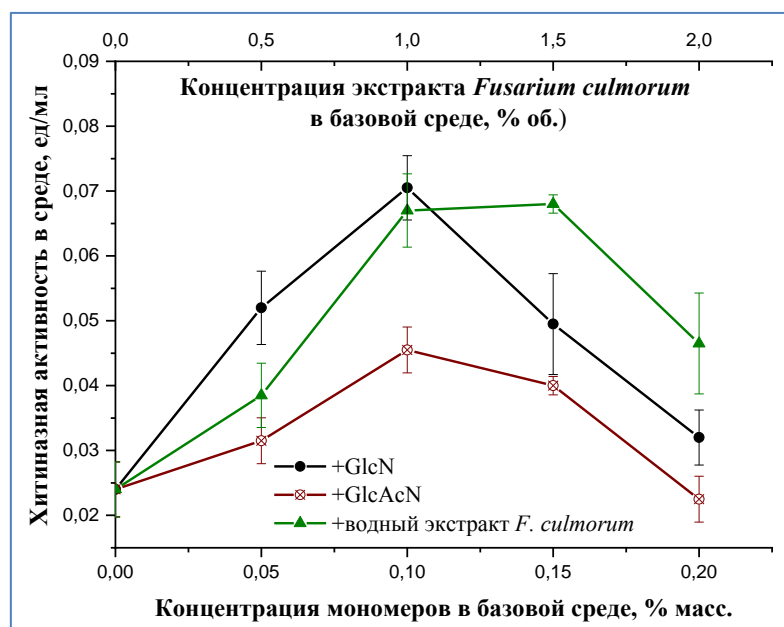


Рис. 9. Индукция хитиназной активности *P. ehimensis* IB-739 в присутствии N-ацетил-D-глюкозамина (GlcNAc) и D-глюкозамина (GlcN), а также при добавлении в базовую среду различных объемов водного экстракта мицелия *F. culmorum*.

При более высоких концентрациях (0,5-1%) этих аминсахаров синтез хитинолитических ферментов частично или полностью репрессировался. Водорастворимые экстракты из мицелия *F. culmorum* и *B. sorokiniana* (для последнего данные не представлены) также стимулировали индукцию внеклеточных хитиназ *P. ehimensis* IB-739 по сравнению с

контролем, однако уровень их экспрессии был существенно (в 2-4 раза) ниже значений, получаемых в присутствии 0,2-0,5% коллоидного хитина (рис. 9). Это может указывать на более сложный механизм активации полноценной экспрессии хитиназ у исследуемых штаммов бактерий, включающий, вероятно, силу и каскадный характер сигнала, предполагающий участие в его регуляции более крупных молекул хитоолигомеров, образующихся на начальных этапах гидролиза полимерного субстрата. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют, что растворимые компоненты клеточных стенок микромицетов, в т.ч. мономеры хитина и хитозана, могут служить потенциальными сигналами для индукции хитиназ у PGPR-бактерий.

Полученные результаты свидетельствуют, что внеклеточные пептидные метаболиты фитопатогенных микромицетов, а также *T. harzianum*, могут как подавлять, так и усиливать рост и антигрибную активность PGPR-бактерий, а также формирование ими биопленок *in vitro*. Специфика воздействия грибных метаболитов во многом определяется физиолого-биохимическими особенностями представителей родов *Bacillus* и *Paenibacillus*. Так, низкомолекулярные грибные метаболиты стимулируют неспецифическое повышение фунгицидной активности у *B. subtilis* IB-54 и видо- / штаммоспецифическое – у *P. ehimensis* IB-739. Данный эффект, по-видимому, связан с увеличением продукции бактериями биоактивных вторичных метаболитов, в первую очередь, ряда циклических липопептидов (бацилломицины, фенгицины), однако прямой связи между этими показателями не обнаружено. Штаммы рода *Bacillus*, в особенности *B. subtilis*, по всей видимости, менее восприимчивы к действию грибных метаболитов по сравнению с представителями *Paenibacillus*. Водные экстракты мицелия *F. culmorum* и *B. sorokiniana* индуцируют синтез хитинолитических ферментов *P. ehimensis* IB-739 на уровне, сопоставимом с хитиназной активностью данного штамма, индуцируемой мономерами хитина и хитозана. Это свидетельствует о том, что в микосфере и экссудатах микромицетов присутствуют водорастворимые соединения, играющие роль химических сигналов для индукции хитинолитических ферментов у некоторых штаммов PGPR-бактерий.

Особенности влияния грибных метаболитов на штаммы PGPR-бактерий свидетельствуют о неоднозначном характере их взаимоотношений с фитопатогенными представителями ризосферной микобиоты, что важно для понимания ключевых биотических факторов, обеспечивающих эффективность их защитного и ростостимулирующего действия на растение-хозяина. Существенное значение имеет также выявление особенностей взаимодействия PGPR-бактерий с антагонистическими микромицетами в контексте их комбинированного применения в составе препаратов для комплексной защиты сельскохозяйственных культур. В условиях смешанных культур бактериальных и грибных антагонистов могут наблюдаться как негативные, так и положительные эффекты на экспрессию у них генов биоконтроля, что указывает на необходимость направленного подбора штаммов бактерий и грибов, взаимно дополняющих действие друг друга [Lutz et al., 2004]. Отсутствие выраженного конкурентного взаимодействия биоконтрольного микромицета *T. harzianum* с антагонистическими штаммами *B. subtilis* IB-54, *B. atrophaeus* IB-33-1 и *B. licheniformis* IB-P141 B21-1 демонстрирует хорошую возможность совместного применения этих культур в составе полифункциональных биопрепаратов для растениеводства.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России № 075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Гильванова Е.А., Рябова А.С., Сафина В.Р., Пудова Е.А., Кузьмина Л.Ю., Бойко Е.Ф., Мелентьев А.И. Влияние источников углерода и минеральных солей на формирование биопленок и синтез циклических липопептидов RGPB-штаммами *Bacillus* и *Paenibacillus* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 4. С. 468–481. DOI: [10.31163/2618-964X-2019-2-4-468-481](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-4-468-481)
2. Актуганов Г.Э., Галимзянова Н.Ф., Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю. Внеклеточные гидролазы штамма *Bacillus* sp. 739 и их участие в лизисе клеточных стенок микромицетов // Микробиология. 2007. Т. 76. № 4. С. 471–479. DOI: [10.1134/S0026261707040054](https://doi.org/10.1134/S0026261707040054)
3. Актуганов Г.Э., Мелентьев А.И., Усанов Н.Г. Особенности продукции комплекса хитинолитических ферментов в периодической культуре *Bacillus* sp. 739 // Биотехнология. 2001. № 3. С. 25–33.
4. Barea J.-M., Pozo M.J., Azcon R., Azcon-Aguilar C. Microbial co-operation in rhizosphere // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. No. 417. P. 1761–1778. DOI: [10.1093/jxb/eri197](https://doi.org/10.1093/jxb/eri197)
5. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka A.E. Use a plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. No. 9. P. 4951–4959. DOI: [10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005)
6. Dawoud T.M., Alharbi N.S., Theruvinthalakal A.M., Thekkangil A., Kadaikunnan S., Khaled J.M., Almana T.N., Sankar K., Innasimuthu G.M., Alanzi K.F., Rajaram S.K. Characterization and antifungal activity of the yellow pigment produced by a *Bacillus* sp. DBS4 isolated from the lichen *Dirinaria agealita* // Saudi J. Biol. Sci. 2020. V. 27. No. 5. P. 1403–1411. DOI: [10.1016/j.sjbs.2019.11.031](https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.031)
7. Estrela A.B., Abraham W.-R. Fungal metabolites for the control of biofilm infection Review // Agriculture. 2016. V. 6. No. 3. 37. DOI: [10.3390/agriculture6030037](https://doi.org/10.3390/agriculture6030037)
8. Fonseca S., Radhakrishnan D., Prasad K., Chini A. Fungal production and manipulation of plant hormones // Current Med. Chem. 2018. V. 25. No. 2. P. 253–267. DOI: [10.2174/0929867324666170314150827](https://doi.org/10.2174/0929867324666170314150827)
9. Frey-Klett P., Burlinson P., Deveau A., Barret M., Tarkka M., Sarniguet A. Bacterial-Fungal Interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2011. V. 75. No. 4. P. 583–609. DOI: [10.1128/MMBR.00020-11](https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-11)
10. Goyal S., Ramawat K.G., Merillon J.M. Different shades of fungal metabolites // In book: Fungal metabolites. Ed. By Merillon J.M., Ramawat K.G. Springer, 2017. 1001 p. DOI: [10.1007/978-3-319-25001-4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4)
11. Hasan H.A.H. Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction // Plant, Soil and Environment. 2018. V. 48. No. 3. P. 101–106. DOI: [10.17221/4207-PSE](https://doi.org/10.17221/4207-PSE)
12. Helistö P., Aktuganov G., Galimzianova N., Melentjev A., Korpela T. Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: Isolation and purification of components // Journal of Chromatogr. B Biomed Sci. Appl. 2001. V. 758. No. 2. P. 197–205. DOI: [10.1016/s0378-4347\(01\)00181-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(01)00181-5)
13. Hoffman L.R., D'Argenio D.A., MacCoss M.J., Zhang Z., Jones R.A., Miller S.I. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation // Nature. 2005. V. 436. No. 7054. P. 1171–1175. DOI: [10.1038/nature03912](https://doi.org/10.1038/nature03912)
14. Kai K. Bioorganic chemistry of signaling molecules in microbial communication // J. Pestic. Sci. 2019. V. 44. No. 3. P. 200–207. DOI: [10.1584/jpestics.J19-02](https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-02)

15. Khaneja R., Perez-Fons L., Fakhry S., Baccigalupi L., Steiger S., To E., Sandmann G., Dong T.C., Ricca E., Fraser P.D., Cutting S.M. Carotenoids found in *Bacillus* // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 108. No. 6. P. 1889–1902. DOI: [10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x)
16. Leveau J.H., Preston G.M. Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial–fungal interaction. Tansley review // New Phytologist. 2008. V. 177. No. 4. P. 859–876. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2007.02325.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02325.x).
17. Li N., Alfiky A., Vaughan M.M., Kang S. Stop and smell the fungi: Fungal volatile metabolites are overlooked signals involved in fungal interaction with plants. Review // Fungal Biol. Rev. 2016. V. 30. No. 3. P. 134–144. DOI: [10.1016/j.fbr.2016.06.004](https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.06.004)
18. Lien T.S., Yu S.T., Wu S.T., Too J.R. Induction and purification of a thermophilic chitinase produced by *Aeromonas* sp. DYU-too7 using glucosamine // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2007. V. 12. No. 6. P. 610–617. DOI: [10.1007/BF02931076](https://doi.org/10.1007/BF02931076)
19. Lutz M.P., Wenger S., Maurhofer M., Defago G., Duffy B. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 48. No. 3. P. 447–455. DOI: [10.1016/j.femsec.2004.03.002](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2004.03.002)
20. Matilla M.A., Daddaoua A., Chini A., Morel B., Krell T. An auxin controls bacterial antibiotics production // Nucleic Acids Research. 2018. V. 46. No. 21. P. 11229–11238. DOI: [10.1093/nar/gky766](https://doi.org/10.1093/nar/gky766)
21. Peltola J., Ritieni A., Mikkola R., Grigoriev P.A., Pocsfalvi G., Andersson M.A., Salkinoja-Salonen M.S. Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. No. 8. P. 4996–5004. DOI: [10.1128/AEM.70.8.4996-5004.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4996-5004.2004)
22. Pierson III L.S.P., Pierson E.A. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression // FEMS Microbiol. Lett. 1996. V. 136. No. 2. P. 101–108. DOI: [10.1111/j.1574-6968.1996.tb08034.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08034.x)
23. Schirmbock M., Lorito M., Wang Y.-L., Hayes C.K., Arisan-Atac I., Scala F., Harman G.E., Kubicek C.P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. P. 4364–4370. DOI: [10.1128/AEM.60.12.4364-4370.1994](https://doi.org/10.1128/AEM.60.12.4364-4370.1994)
24. Sondergaard T.E., Fredborg M., Oppenhagen Christensen A.-M., Damsgaard S.K., Kramer N.F., Giese H., Sørensen J.L. Fast screening of antibacterial compounds from *Fusaria* // Toxins. 2016. V. 8. Art. 355. DOI: [10.3390/toxins8120355](https://doi.org/10.3390/toxins8120355)
25. Tariq M., Noman M., Ahmed T., Hameed A., Manzoor N., Zafar M. Antagonistic features displayed by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A Review // J. Plant Sci. Phytopathol. 2017. V. 1. P. 038–043. DOI: [10.29328/journal.jpssp.1001004](https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001004)
26. Tarkka M.T., Sarniguet A., Frey-Klett P. Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium–fungus interactions // Curr. Genet. 2009. V. 55. P. 233–243. DOI: [10.1007/s00294-009-0241-2](https://doi.org/10.1007/s00294-009-0241-2)
27. Wang X., Gong X., Li P., Lai D., Zhou L. Structural diversity and biological activities of cyclic depsipeptides from fungi. Review // Molecules. 2018. V. 23. No. 1. Art. 169. DOI: [10.3390/molecules23010169](https://doi.org/10.3390/molecules23010169)
28. Whipps J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. No. suppl. 1. P. 487–511. DOI: [10.1093/jexbot/52.suppl_1.487](https://doi.org/10.1093/jexbot/52.suppl_1.487)
29. Wichmann G., Sun J.P., Dementhon K., Glass N.L., Lindow S.E. A novel gene, *phcA* from *Pseudomonas syringae* induces programmed cell death in the filamentous fungus *Neurospora crassa* // Mol. Microbiol. 2008. V. 68. No. 3. P. 672–689. DOI: [10.1111/j.1365-2958.2008.06175.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06175.x)
30. Zhao G.-P., Li Y.-Q., Yang J., Cui K.-Y. Antibacterial characteristics of orange pigment extracted from *Monascus* pigments against *Escherichia coli* // Czech J. Food Sci. 2016. V. 34. No. 3. P. 197–203. DOI: [10.17221/430/2015-CJFS](https://doi.org/10.17221/430/2015-CJFS)

