

УДК 582.284.51:577.115

## РАЗРАБОТКА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА И ПРЕПАРАТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ФИТОТОКСИЧЕСКИХ МЕТАБОЛИТОВ ГРИБА *Stagonospora cirsii*

© 2019 г. А. О. Берестецкий<sup>1, \*</sup>, Е. В. Полуэктова<sup>1</sup>, Ю. А. Сабашук<sup>1</sup>, А. Л. Первушин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,  
Санкт-Петербург, 196608 Россия

\*e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Поступила в редакцию 16.05.2018 г.

После доработки 25.04.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

Разработана простая методика количественного определения фитотоксинов (стагонолида А и гербарумина I) в культуральной жидкости потенциального микогербицида гриба *Stagonospora cirsii* S-47, приведены примеры ее использования. Методика была апробирована при исследовании влияния концентрации подсолнечного масла в среде и сроков культивирования гриба на выход этих соединений. При концентрации растительного масла в среде Чапека с витаминами более 0.5% увеличивалось накопление биомассы *S. cirsii* и образование стагонолида А и уменьшалось образование гербарумина I. Максимальное количество фитотоксинов было получено при культивировании *S. cirsii* в колбах в течение 10 сут. При культивировании *S. cirsii* в биореакторе на той же среде с 1% масла, максимальная концентрация стагонолида А (116 мг/л) в культуральной жидкости достигалась на 5 сут ферментации, на 6 сут микогербицид разрушался, а на 7 сут резко возрастало содержание гербарумина I. На основе предложенной методики анализа фитотоксинов разработан способ их препаративного выделения методом колоночной хроматографии среднего и высокого давления.

**Ключевые слова:** *Stagonospora cirsii*, биогербицид, ВЭЖХ, фитотоксины, стагонолид А, гербарумин I

**DOI:** 10.1134/S0555109919060059

Борьба с сорными растениями — необходимая часть растениеводческих технологий. В настоящее время одним из основных методов подавления их численности является применение химических гербицидов. Однако в последние годы за рубежом наблюдается увеличение популяций сорных растений, резистентных ко многим широко применяемым гербицидам. Серьезной проблемой остается недостаток отечественных разработок по созданию новых эффективных компонентов для получения гербицидных препаратов [1–4]. В настоящее время в качестве альтернативы разрабатывается применение смесей препаратов на основе уже известных действующих веществ [5].

Природные фитотоксины, образуемые микроорганизмами и растениями, — важный источник прототипов ряда внедренных и перспективных синтетических гербицидов. Некоторые фитотоксины некротрофных и гемибитрофных грибов могут являться факторами патогенности [6, 7]. Фитотоксины используются как биорациональные (биохимические) гербициды, в которых нуждается современное органическое земледелие [8]. Их содержание в препаратах на основе микроорганизмов

или природных фитотоксинов оценивается как один из показателей качества [9].

Стагонолид А и гербарумин I (рис. 1) — фитотоксины, образуемые грибами *Stagonospora cirsii* и *Phoma herbarum*, которые обладают высоким гербицидным потенциалом, так как они ингибируют как рост корней растений, так и вызывают повреждения листьев [10–12]. Предполагают, что фитотоксины могут являться факторами вирулентности гриба *S. cirsii*, являющегося потенциальным микогербицидом против бодяка полевого [13].

Для изучения механизмов действия, синтеза производных и определения селективности этих соединений необходимо их выделение в достаточных (несколько граммов) количествах. Однако биосинтез этих соединений при выращивании гриба в культуре воспроизводится плохо. Так, выход гербарумина I в культуре *P. herbarum* составлял менее 1 мг/л [10], а стагонолида А в культуральной жидкости *S. cirsii* С-163 — около 40 мг/л [11]. Кроме того, необходимо разработать методику их количественного определения, которую можно было бы использовать как для оптимизации их биосинтеза, так и для препаративного выделения.

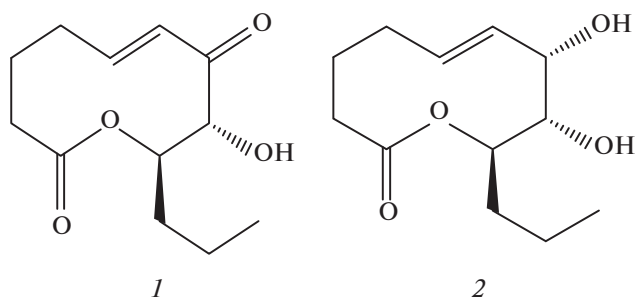


Рис. 1. Структура фитотоксинов, синтезируемых грибом *S. cirsi* 1 – стагонолид А; 2 – гербарумин I.

Цель работы – разработка простых и быстрых методик пробоподготовки и анализа фитотоксинов в культуральной жидкости гриба *S. cirsi* S-47 методом сверхэффективной жидкостной хроматографии (СВЭЖХ).

### МЕТОДИКА

**Подбор условий ВЭЖХ-анализа.** Ранее полученные нами образцы стагонолида А и гербарумина I [11] растворяли в метаноле (1 мг/мл) и использовали для приготовления стандартных растворов. Количественный анализ одновременно обоих фитотоксинов проводили с использованием хроматографической системы Acquity UPLC H-Class (“Waters”, США), снабженной диодно-матричным детектором (СВЭЖХ/ДМД). Для оптимизации условий разделения токсинов использовали колонку Acquity UPLC VEN (2.1 × 50 мм) с несколькими видами обращенно-фазных (ОФ) сорбентов (С18, RP18, Phenyl и С8) с размером частиц 1.7 мкм, а также различные температурные режимы хроматографирования: 30, 40 и 50°C при скорости подачи элюента 300, 250 и 200 мкл/мин соответственно. В качестве подвижной фазы (ПФ) использовали три системы растворителей: ПФ А – ацетонитрил – 5 мМ орто-фосфорная кислота (30 : 70), ПФ Б – ацетонитрил – вода (30 : 70) и ПФ В – метанол – вода (50 : 50). Объем вводимой пробы составлял 5 мкл, концентрация стагонолида А и гербарумина I – 1 мкг/мл. Детектирование гербарумина I и стагонолида А осуществляли при 200 и 234 нм соответственно, а также после сканирования в диапазоне 190–600 нм, используя функцию MaxPlot программы Empower 3 (“Waters”, США). Оценивали время удерживания ( $t_R$ ) фитотоксинов, относительную селективность их разделения  $\alpha = (t_{R2} - t_{RM}) / (t_{R1} - t_{RM})$  и общее время анализа.

Твердофазную экстракцию фитотоксинов из фильтрата культуральной жидкости *S. cirsi* и их очистку проводили с помощью вакуумной установки (манифолда) на колонках с ОФ сорбентом Chromabond C18ec (масса сорбента 500 мг, объем резервуара 3 мл, “Macherey-Nagel”, Германия). Сорбент

кондиционировали последовательным нанесением на колонку 3 мл метанола и 3 мл воды (не допуская пересыхания), а затем наносили 200 мкл фильтрата культуральной жидкости, промывали 3 мл воды и 3 мл 25%-ного метанола и подсушивали воздухом в течение 1 мин. Элюцию проводили метанолом (2 мл), элюат тщательно перемешивали и хранили при –20°C. Для количественного определения фитотоксинов отбирали 200 мкл элюата, добавляли к нему 300 мкл воды и тщательно перемешивали. Анализ фитотоксинов проводили с использованием колонки Acquity UPLC VEN C18 (50 × 2.1 мм). В качестве ПФ использовали систему ацетонитрил – вода в соотношении 30 : 70 (об./об.), скорость подачи ПФ 300 мкл/мин, температура термостата колонки 30°C. Объем наносимого образца 5 мкл. Время удерживания стагонолида А составляло 2.10 мин, гербарумина I – 1.63 мин. Погрешность  $t_R$  не превышала 2% по данным не менее 3 анализов.

Градуировочные характеристики, выражающие зависимость площадей пиков от концентрации стагонолида А и гербарумина I в пробах, устанавливали методом абсолютной калибровки по пяти концентрациями соединений в диапазоне от 0.125 до 20 нг в анализируемой пробе, соответствующих концентрации фитотоксинов от 0.625 до 100 мкг/мл. Для определения степени извлечения растворы гербарумина I и стагонолида вносили в стерильную питательную среду и 3-суточную культуральную жидкость на уровне 6.25 и 50 мкг/мл, после чего определяли фитотоксины по описанной выше методике. Эксперименты выполняли в 3 повторностях (каждая из которых включала две аналитических повторности).

**Культивирование гриба.** В работе был использован штамм *S. cirsi* S-47 из коллекции лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии ВИЗР. Штамм хранили в пробирках на скошенном картофельно-глюкозном агаре (КГА) при 4°C, посевную культуру выращивали на этой же среде при 24°C.

Для глубинного культивирования *S. cirsi* использовали жидкую питательную среду Чапека с витаминами (ЧАВ) в следующего состава (г/л): глюкоза – 45, NaNO<sub>3</sub> – 3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 1, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.5, KCl – 0.5, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 0.01, тиамин – 100 мкг, биотин – 5 мкг, pH 6.0. В среду вносили от 0 до 4% (по объему) рафинированного подсолнечного масла. Оценку влияния концентрации масла на рост гриба и токсинообразование изучали при культивировании в конических колбах на 500-мл с 100 мл среды. Гриб выращивали на качалке при 180 об./мин в течение 14 сут при 24°C. На 7, 10 и 14-е сут культивирования отбирали 1 мл культуральной жидкости, который хранили при –20°C. Опыт выполняли в 4 повторностях.

Для оценки роста и токсинообразования использовали стеклянный ферментер с рабочим объемом 1.5 л (“Applikon Biotechnology”, Голландия) с системой управления процессами ez-Control и программным обеспечением BioXpert. Система оснащена датчиками pH и температуры, измерялись также концентрация растворенного кислорода и уровень пенообразования. Ферментационную среду (1.4 л) инокулировали 100 мл 7-суточной культуры, полученной на среде ЧАВ без масла по выше описанной методике. Параметры ферментации: 24°C, скорость подачи воздуха 1.5 л/мин, скорость перемешивания – 200 об./мин в течение 2 сут и 400 об./мин – до завершения процесса ферментации, уровень pH не поддерживали. Пенегаситель – рафинированное подсолнечное масло (1% от объема среды) вводили в среду до посева гриба. Культивирование проводили 7 сут, ежедневно отбирая образцы по 30 мл культуральной жидкости, которые хранили при –20°C. Эксперимент повторяли трижды.

**Определение параметров роста гриба и биологической активности экстрактов.** Значение водородного показателя в культуральной жидкости определяли потенциометрическим методом. Массу сухого мицелия определяли взвешиванием после промывки водой и высушивания при 50°C в течение 2 сут. Метаболиты гриба экстрагировали из культуральной жидкости хлористым метиленом в соотношении 2 : 1 (об./об.). Растворитель отгоняли на ротационном испарителе, определяли массу сухого остатка и рассчитывали выход экстрактивных веществ.

Для определения фитотоксической активности экстрактов использовали хорошо развитые листья осота полевого, из которых при помощи пробочного сверла вырезали диски диаметром 10 мм. Листовые диски помещали в прозрачные пластмассовые контейнеры на предварительно увлажненную дистиллированной водой фильтровальную бумагу, в их центре острой препаровальной иглой делали надколы, а затем поверх них наносили 10 мкл 0.5%-ного экстракта. Для приготовления такого экстракта сухой остаток после выпаривания хлористого метилена растворяли в небольшом количестве этанола и доводили его объем водой до конечной концентрации этанола 5%. В контрольном варианте на листовые высечки наносили 5%-ный раствор этанола. Обработанные листовые высечки инкубировали при температуре 24°C и переменном освещении (12 ч в сут). Диаметр некротического пятна на дисках осота измеряли через 48 ч. Фитотоксическую активность стагонолида А и гербарумина I определяли при их концентрации 2 мг/мл.

Для определения антимикробной активности экстрактов по отношению к *Bacillus subtilis* использовали метод бумажных дисков (500 мкг су-

хого остатка на 6 мм диск). После 24 ч инкубации измеряли зону лизиса. Антимикробную активность чистых токсинов – стагонолида А и гербарумина I определяли в концентрации 200 мкг/диск.

**Препаративное выделение стагонолида А и гербарумина I.** Культуру гриба выращивали в ферментере 6 сут. Экстракцию метаболитов проводили хлористым метиленом. Грубое разделение экстракта (около 500 мг маслянистого остатка) проводили в стеклянной колонке (40 × 2.5 см) с силикагелем (50 г, диаметр частиц 70–200 мкм, “Merck”, Германия), в ступенчатом градиенте: гексан (элюент 1), гексан–этилацетат (8 : 2 об./об., элюент 2), гексан–этилацетат (6 : 4, элюент 3), гексан–этилацетат (4 : 6, элюент 4), этилацетат (элюент 5) и этилацетат–метанол (8 : 2, элюент 6). Объем элюата на каждой ступени составил 400 мл. Предварительный анализ состава фракций проводили методом ТСХ на пластинах Silica gel 60 (“Merck”, Германия) в системе гексан–этилацетат 8 : 2. Вещества визуализировали в УФ-свете (254 нм) и проявляли при обработке пластин стандартным реактивом на основе серной кислоты (10% об./об.) и анисового альдегида (10% об./об.) в этаноле с последующим нагревом при 105°C в течение 5 мин. Стагонолид А хорошо визуализировался при 254 нм и окрашивался реактивом в коричневый цвет ( $R_f$  0.35). Гербарумин I при 254 нм не выявлялся, а реактивом окрашивался в синий цвет ( $R_f$  0.15). По данным ТСХ и СВЭЖХ/ДМД фракция 3 (50 мг) содержала преимущественно стагонолид А и фракция 5 (150 мг) – гербарумин I с примесями.

Дальнейшую очистку гербарумина I проводили на обращенно-фазовой (ОФ) колонке Puriflash PF-15C18HP/20G (20 г, диаметр частиц сорбента 15 мкм, “Interchim”, Франция), используя систему препаративной хроматографии среднего давления Sepacore (“Büchi”, Швейцария) с УФ/ВИД-детектором. Фракцию 5 адсорбировали на 2 г ОФ сорбента (Silica gel 60 silanazied, диаметр частиц 63–200 мкм, “Merck”, Германия) и вносили в предколонку для сухой загрузки объемом 6 мл. Элюирование метаболитов осуществляли при комнатной температуре в системе растворителей 0.1%-ная муравьиная кислота – ацетонитрил по схеме: 15%-ный ацетонитрил в течение 1 мин, градиент от 15 до 100% ацетонитрила – 11 мин и ацетонитрил – 4 мин. Скорость потока элюента 24 мл/мин, детекция при 200 нм. Время удерживания гербарумина I составила 4.5 мин.

Финальную очистку фитотоксинов проводили методом препаративной ВЭЖХ на колонке XBridge Prep C18 (250 × 19 мм) с диаметром частиц 5 мкм (“Waters”, США). Состав частиц этой колонки аналогичен частицам сорбента аналитической колонки Acquity UPLC VEN C18. Хроматографирование проводили при комнатной температуре и скорости подачи элюента (вода–аце-

**Таблица 1.** Аналитические характеристики методики определения фитотоксинов в диапазоне линейности градуировочного графика ( $n = 3$ ,  $P = 0.95$ )\*

Соединение	$t_R$ , мин	Диапазон определения, мг/л	Уравнение	$R^2$	Лимит определения, мг/л
Гербарумин I	1.63	6.25–100	$y = 1930x - 455$	0.9998	2.0
Стагонолид А	2.10	6.25–100	$y = 2510x - 116$	0.9998	0.5

\* При использовании методики необходимо каждый раз строить новую калибровочную кривую из-за возможных различий в оборудовании и условиях эксперимента.

тонитрил 30 : 70) 24 мл/мин. Объем вводимой пробы – 1 мл: примерно 50 мг сухого образца растворяли в 300 мкл ацетонитрила и добавляли 700 мкл воды. Метаболиты детектировали на УФ-детекторе при 200 и 234 нм. В этих условиях  $t_R$  гербарумина I составило 9 мин,  $t_R$  стагонолида А – 12 мин. Контроль содержания этих фитотоксинов в хроматографических фракциях осуществляли описанным выше методом СВЭЖХ/ДМД.

Для подтверждения структуры выделенных соединений использовали ВЭЖХ-МС/МС и анализ протонных и углеродных спектров ЯМР. Для получения масс-спектров использовали хроматографическую систему TSQ Quantum Access™ (“Thermo Scientific”, США), снабженную диодно-матричным быстросканирующим и масс-спектрометрическим (тройной квадруполь) детекторами. Условия хроматографирования: колонка Zorbax SB-C18 (Agilent Tech., США), размеры колонки  $2.1 \times 150$  мм, зернение 1.8 мкм, градиент 10–100% ацетонитрила в 0.1%-ной муравьиной кислоте, скорость потока элюента 250 мкл/мин, температура колонки 35°C, диапазон сканирования диодно-матричного детектора 200–800 нм, тип ионизации HESI, диапазон сканирования 50–1000  $m/z$ . Для растворения соединений использовался метанол. Для записи спектров ЯМР – прибор Avance III Ultra-Shield Plus (“Bruker”, Германия). Анализируемые соединения растворяли в дейтерированном хлороформе. Протонные спектры записывали при частоте 400 МГц, углеродные – при 100 МГц.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Разработка методики хроматографического разделения фитотоксинов.** На коротких (длиной 50 мм) СВЭЖХ-колонках оптимальная продолжительность анализа составляла около 3 мин при  $t_R$  аналитов в пределах 1.2–2.5 мин с учетом  $t_R$  не сорбируемых соединений около 0.5 мин. Подбор ОФ-сорбента и условий хроматографирования показал, что для быстрого одновременного анализа гербарумина I и стагонолида А колонки Acquity UPLC VEN C18 и Phenyl оказались оптимальными. При подобранных условиях хроматографирования, которые описаны ниже, они обеспечивали высо-

кую селективность ( $\alpha > 1.4$ ) в пределах  $t_R$  аналитов от 1.2 до 2.5 мин. Независимо от использованных условий хроматографирования на колонке Acquity UPLC VEN RP18 селективность была низкой. На колонке с сорбентом C8 удерживание аналитов в условиях проведенного эксперимента было значительным ( $t_R$  от 2.2 до 4.1 мин), что неудобно для быстрого анализа.

Для стандартного разделения фитотоксинов *S. cirsii* (время анализа 3 мин при  $\alpha > 1.4$ ) оптимальными оказались следующие условия: колонки Acquity UPLC VEN C18 (ПФ Б) и Acquity UPLC VEN C8 (ПФ В) при температуре колонки 30°C, при скорости подачи ПФ 300 мкл/мин; колонки Acquity UPLC VEN C18 (ПФ В) и Acquity UPLC VEN Phenyl (ПФ А или Б) при температуре колонки 40°C и скорости подачи ПФ 250 мкл/мин.

Сверхбыстрый (2 мин) анализ гербарумина I и стагонолида А при высокой для данного эксперимента селективности обеспечивали колонки Acquity UPLC VEN C18 ( $\alpha$  1.66) и Phenyl ( $\alpha$  1.45) при использовании ПФ В и ПФ А соответственно при температуре колонки 30°C и скорости подачи элюента 300 мкл/мин. Такие условия удобно использовать для скрининга этих соединений в хроматографических фракциях.

При использовании ацетонитрила в качестве модификатора элюирующей системы (ПФ А и ПФ Б) первым из всех используемых типов колонок элюировался гербарумин I (табл. 1). При использовании ПФ В с метанолом в качестве модификатора стагонолид А элюировался с сорбента раньше гербарумина I. При этом, высокую селективность обеспечивала колонка с сорбентом C18, при использовании которой время удерживания стагонолида А составило 1.4 мин, гербарумина I – 1.9 мин.

**Методика анализа фитотоксинов.** Аналитические характеристики гербарумина I и стагонолида А, полученные методом СВЭЖХ, представлены в табл. 1.

При внесении фитотоксинов в стерильную жидкую питательную среду на уровне 50 мг/л средний уровень извлечения гербарумина I составил 99%, стагонолида А – 96%; при их внесении на уровне 6.25 мг/л было обнаружено 93% герба-

**Таблица 2.** Содержание стагонолида А и гербарумина I в экстракте КЖ на 7, 10 и 14 сут глубинного культивирования *S. cirsii* S-47 на среде Чапека

Содержание масла, %	рН*	Биомасса, г/л*	Стагонолид А, мг/л			Гербарумин I, мг/л		
			7	10	14	7	10	14
0	7.7	4.8	0.9	н/о**	н/о	2.9	5.7	4.7
0.25	7.6	5.1	0.7	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
0.5	7.8	7.2	3.0	1.7	н/о	н/о	н/о	н/о
1	7.3	7.3	9.1	11.3	0.8	н/о	н/о	н/о
2	7.2	7.6	4.7	1.8	н/о	н/о	н/о	н/о
4	7.2	8.8	3.1	1.0	н/о	н/о	н/о	н/о

\* На 14 сут культивирования, \*\* н/о – не обнаружено.

румина I и 95% стагонолида А. Во всех вариантах погрешность опыта была низкой ( $S_r < 0.01$ ).

При внесении гербарумина I в 3-суточный фильтрат КЖ, в котором оба соединения не детектировались, в ходе его количественного определения на выходе из колонки его не обнаруживали, но при этом появлялся пик стагонолида А, площадь которого соответствовала концентрации внесенного гербарумина I. При одновременном внесении обоих соединений в одинаковой концентрации детектировали в 2 раза больше стагонолида А, чем было внесено, а гербарумин I не обнаруживался. Это позволило предположить присутствие в КЖ ферментов, окисляющих гербарумин I до стагонолида А. При внесении стагонолида А в фильтрат КЖ степень его извлечения составила более 90%.

**Влияние концентрации масла и продолжительности глубинного культивирования на выход гербарумина I и стагонолида А.** При культивировании в колбах на качалке колонии *S. cirsii* S-47 росли в виде пеллет. Внесение различных концентраций растительного масла не влияло на морфологию колоний. Двухнедельная КЖ гриба, выращенного на среде без масла, имела темно-оливковый оттенок. С увеличением доли масла в среде интенсивность ее пигментации снижалась. Следует отметить, что при содержании масла  $\geq 1\%$  оно оставалось в виде пленки на поверхности жидкой питательной среды.

Содержание масла существенно влияло на выход биомассы двухнедельных культур *S. cirsii* S-47, увеличивая уровень накопления сухой биомассы гриба по сравнению со средой без масла. Так, выход биомассы на среде ЧАВ, с 2% масла оказался примерно на 40% выше (табл. 2). Присутствие этого компонента изменяло конечный рН КЖ, при более высоких концентрациях (1–4%) значение рН было ниже. Продолжительность культивирования и внесение подсолнечного масла оказали существенное влияние на образование фитотоксинов в КЖ *S. cirsii* S-47. Максимум накопления стагонолида А (от 3 до 4.7 мг/л) наблюдался на 7 сут куль-

тивирования, исключение составил вариант с 1%-ным содержанием масла в среде, при котором максимальный выход стагонолида А (11 мг/мл) приходился на 10 сут культивирования. На 14 сут культивирования гриба концентрация стагонолида А резко снижалась (табл. 2).

Максимальное накопление гербарумина I в КЖ на среде без масла (5.7 мг/л) наблюдали на 10 сут (табл. 2), добавление масла в жидкую питательную среду негативно влияло на образование этого метаболита.

**Особенности роста и образования токсинов *S. cirsii* S-47 при культивировании в лабораторном ферментере.** При выращивании в ферментере на среде ЧАВ с добавлением 1% масла колонии *S. cirsii* S-47 также как и в колбах имели вид пеллет. По мере роста гриба наблюдалось изменение пигментации КЖ от светло-бежевой опалесцирующей до коричнево-черной.

Максимум накопления сухой биомассы гриба наблюдали на 3 сут ферментации (12 г/л), максимальный выход соединений, экстрагируемых из фильтрата КЖ (около 800 мг/л), – на 6 сут ферментации. В процессе роста гриба наблюдали подкисление культуральной жидкости до рН 5.0 на 4 сут, а затем ее подщелачивание до рН 9 на 7 сут (рис. 2). Уровень растворенного кислорода (DO) в КЖ коррелировал с выходом биомассы. Так, его резкое снижение совпадало с максимальным накоплением биомассы: уже через 24 ч ферментации начиналось резкое снижение уровня DO, через 2 сут до 10%, а на 3 сут до нуля (рис. 2), что говорит об окончании фазы экспоненциального роста гриба.

В различные сроки культивирования экстракты КЖ проявляли фитотоксическую активность (средний диаметр некротического пятна изменялся в пределах от 0.7 мм до 4.8 мм). Максимальное поражение листовых высечек осота вызывали экстракты, полученные из КЖ на 4, 5 и 7 сут ферментации *S. cirsii* S-47, при этом диаметр некротического пятна варьировал в пределах 4.5–5 мм (табл. 3). Антимикробная активность экстрактов

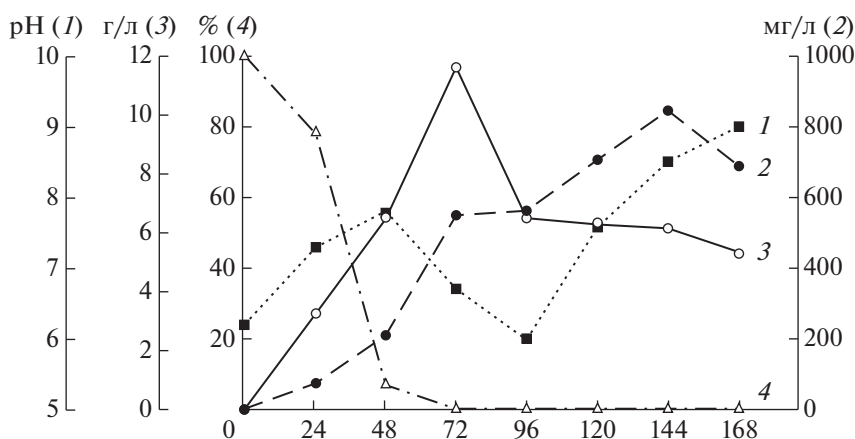


Рис. 2. Динамика роста *Stagonospora cirsii* S-47 при глубинном культивировании *S. cirsii*: 1 – рН; 2 – экстрактивные вещества в КЖ, г/л; 3 – сухая биомасса, г/л; 4 – растворенный кислород, %.

обнаруживалась, начиная со 2 сут ферментации гриба (зона лизиса бактериальных колоний от 7 до 14 мм). Наибольшую активность по отношению к *B. subtilis* проявляли экстракты из 4 и 5-суточных проб КЖ *S. cirsii* S-47 (табл. 3).

Стагонолид А был обнаружен в культуральной жидкости на 4 сут ферментации – в начале стационарной фазы роста, максимальная его концентрация (116.7 мг/л) выявлена на 5 сут; на 7 сут ферментации стагонолид А в культуральной жидкости не обнаруживался. Гербарумин был выявлен в фазе отмирания – в 6- и 7-сут КЖ в концентрации 38 и 116.5 мг/л соответственно (табл. 3).

**Идентификация и биологическая активность фитотоксинов.** При выделении и очистке стагонолида А и гербарумина I из фильтрата КЖ *S. cirsii* использовали разработанные методики их анализа с помощью ТСХ и СВЭЖХ/ДМД. Выход стагонолида А составил около 30 мг/л, гербарумина I – 50 мг/л.

В масс-спектре полученного стагонолида А присутствовали пики  $m/z$  227.11 ( $[M + H]^+$ , 100%)

и 209.12 ( $[M + H - H_2O]^+$ , 25%), в масс-спектре гербарумина I –  $m/z$  229.11 ( $[M + H]^+$ , 10%) и 211.12 ( $[M + H - H_2O]^+$ , 100%), 193.15 ( $[M + H - 2H_2O]^+$ , 25%). Масс-спектры демонстрировали наличие одной гидроксильной группы у стагонолида А и двух – у гербарумина I. Протонный и углеродный спектры ЯМР обоих соединений были идентичны опубликованным [10, 11]. В дополнительно полученных углеродных спектрах DEPT этих веществ присутствовали сигналы пяти  $CH_2$ -групп (3 сигнала лактонного кольца и 2 сигнала *n*-пропильной группы).

Стагонолид А и гербарумин I (2 мг/мл) проявляли примерно одинаковую фитотоксическую активность на листовых дисках осота полевого (диаметр некротических пятен около 6 мм). Однако антимикробная активность гербарумина I (зона лизиса около 4 мм) по отношению к *B. subtilis* была в 2.5 раза ниже, чем у стагонолида А (зона лизиса около 10 мм). Подходы к количественному определению остаточных количеств ксенобиоти-

Таблица 3. Биологическая активность экстрактов КЖ *S. cirsii* S-47 при различных сроках ферментации

Время культивирования, сут	Биологическая активность экстрактов		Концентрация, мг/л	
	фитотоксическая *	антимикробная **	стагонолид А	гербарумин I
1	2.8	0	0	0
2	3	0	0	0
3	1	5	<0.6	0
4	4.8	12	48.4	0
5	4.6	13.5	116.7	0
6	3.6	7.5	24.4	37.8
7	4.7	7	0	116.5

\* Диаметр некротического пятна (мм) на листовом диске осота полевого через 48 ч после обработки, \*\* – зона лизиса (мм) клеток *B. subtilis*.

ков и биологически активных веществ (БАВ) в ходе многофакторной оптимизации их получения различаются: в первом случае важна высокая чувствительность метода, во втором – скорость определения. Поэтому метод ВЭЖХ/УФ часто используется для мониторинга мажорных БАВ в культурах микроорганизмов [14, 15]. Использование оборудования для СВЭЖХ позволяет в несколько раз ускорить процесс анализа, а диодно-матричный детектор (ДМД) – вести контроль за содержанием примесей и аналитов. Разработанная в данной работе методика анализа гербарумина I и стагонолида A позволяет в течение 30–60 мин подготовить несколько проб из КЖ *S. cirsii* методом твердофазной экстракции и провести их количественное определение при помощи СВЭЖХ/ДМД. Более того, при использовании картриджей для одновременной очистки 96 образцов она может быть адаптирована для высокопроизводительного скрининга продуцентов стагонолида A и гербарумина I, использование которого в последнее время расширяется и автоматизируется [16–18]. При необходимости чувствительность методики анализа фитотоксинов *S. cirsii* можно повысить, увеличив объем наносимого на колонку культурального фильтра.

Методика анализа фитотоксинов была апробирована для определения влияния содержания растительного масла на рост и динамику образования токсинов при глубинном культивировании в колбах и лабораторном биореакторе. Растительные масла добавляются в питательные среды в качестве пеногасителя, источника углерода и стимулятора биосинтеза. Например, показано, что они стимулируют рост глубинного мицелия *Cordyceps* sp. и образование бета-лактамовых антибиотиков рядом продуцентов [19, 20]. Для некоторых микроорганизмов они являются источником углерода в питательной среде [21, 22]. Потенциально растительное масло может быть использовано как пеногаситель при ферментации *S. cirsii*. Полученные результаты показали, что оно стимулировало рост гриба при глубинном культивировании на орбитальной качалке, повышая при этом образование стагонолида A (выход до 11 мг/л), но ингибируя образование гербарумина I (табл. 3). Максимальный выход гербарумина I при культивировании на среде ЧАВ составил около 5 мг/мл, что на порядок выше, чем у другого продуцента – гриба *Phoma herbarum* [10]. В дальнейшем использование предложенной методики позволит оптимизировать состав среды и провести селекцию продуцентов [23, 24].

Количественный анализ метаболитов позволил изучить динамику их накопления в КЖ *S. cirsii* S-47 при культивировании в лабораторном ферментере, а также оценить фитотоксическую и антимикробную активности в процессе роста. Показано, что стагонолид A накапливался на 4–5 сут

ферментации (выход 48–116 мг/л), а затем продуцент, по-видимому, переводил его в менее токсичное соединение – гербарумин I (выход 37–116 мг/л). Для препаративного выделения фитотоксинов, образуемых *S. cirsii*, необходим мониторинг их содержания в КЖ методом ВЭЖХ, поскольку трансформация соединений происходила быстро – в течение 1–2 сут.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-00085).

Авторы благодарят сотрудников лаборатории молекулярного моделирования НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России Д.М. Кочуру, Л.С. Чистого за спектральный анализ веществ, а также М.Ю. Белозерову (ВИЗР) за помощь на начальных этапах исследования.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Спиридонов Ю.Я., Жемчужин С.Г. // *Агрохимия*. 2010. № 7. С. 73–91
2. Спиридонов Ю.Я., Жемчужин С.Г. // *Агрохимия*. 2016. № 5. С. 76–85
3. Казакова А.Н., Кузнецов В.М., Мусавирова Л.Р., Михайлова Н.Н., Богомазова А.А., Мудрик Т.П., Злотский С.С. // *Башкирский химический журнал*. 2013. Т. 20. № 1. С. 8–10
4. Кузнецов В.М., Хуснитдинов К.Р., Мрясова Л.М., Колбин А.М., Хуснитдинов Р.Н., Абдрахманов И.Б., Мустафин А.Г. // *Башкирский химический журнал*. 2013. Т. 20. № 2. С. 110–114.
5. Спиридонов Ю.Я., Шестаков В.Г. // *Защита и карантин растений*. 2009. № 8. С. 18–22
6. Vurro M. Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. NATO Security through Science Series / Eds. Vurro M., Gressel J. Dordrecht: Springer, 2007. P. 53–74.
7. Берестецкий А.О. // *Прикл. биохимия и микробиол.* 2008. Т. 44. № 5. С. 501–514.
8. Duke S.O., Owens D.K., Dayan F.E. // *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities*, ACS Symposium Series, 2014. V. 1172. P. 31–43.
9. Берестецкий А.О. // *Вестник защиты растений*. 2017. Т. 91. № 1. С. 5–12.
10. Rivero-Cruz J.F., García-Aguirre G., Cerda-García-Rojas C., Mata R. // *Tetrahedron*. 2000. V. 56. № 30. P. 5337–5344.
11. Yuzikhin O., Mitina G., Berestetskiy A. // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. № 19. P. 7707–7711.
12. Berestetskiy A., Dmitriev A., Mitina G., Lisker I., Andolfi A., Evidente A. // *Phytochemistry*. 2008. V. 69. № 4. P. 953–960.
13. Патент РФ. 2015. № 2543665.
14. Evidente A., Berestetskiy A., Andolfi A., Zonno M.C., Cimmino A., Vurro M. // *Phytochem Anal.* 2006. V. 17. № 5. P. 357–364.
15. Masi M., Moeini S.A., Boari A., Cimmino A., Vurro M., Evidente A. // *Nat. Prod. Res.* 2018. V. 32. № 13. P. 1611–1615.

16. Gao L., Cheng X., Zhang J., Burns D.J. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007. V. 21. № 21. P. 3497–3504.
17. Angeli I., Minoli M., Ravelli A., Gigli F., Lodi F. // Forensic Sci. Int. 2012. V. 218. № 1–3. P. 15–19.
18. Moret S., Hidalgo M., Sanchez J.M. // ISRN Chromatography. 2012. V. 2012. Article ID 487138. <https://doi.org/10.5402/2012/487138>
19. Solaiman D.K.Y., Ashby R.D., Foglia T.A. Handbook of Industrial Biocatalysis / Ed. C. T. Hou. Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group, LLC. 2005. P. 14–1–14–9.
20. Shih I.-L., Tsai K.-L., Hsieh C. // Biochem. Eng. J. 2007. V. 33. № 3. P. 193–201.
21. Junker B., Mann Z., Gailliot P., Byrne K., Wilson J. // Biotechnol. Bioeng. 1998. V. 60. № 5. P. 580–588.
22. Saygün A., Şahin-Yeşilçubuk N., Aran N. // J. Am. Oil Chem. Soc. 2014. V. 91. № 9. P. 1521–1530.
23. Vurro M., Andolfi A., Boari A., Zonno M.C., Caretto S., Avolio F., Evidente A. // Biol. Control. 2012. V. 60. № 2. P. 192–198.
24. Fang M., Wang J., Huang Y., Zhao Y. // Front. Chem. China. 2006. V. 1. № 1. P. 15–19.

## Development of Chromatography Techniques for Analysis and Preparative Isolation of Phytotoxic Metabolites Produced by *Stagonospora cirsi*

A. O. Berestetskiy<sup>a,\*</sup>, E. V. Poluektova<sup>a</sup>, Yu. A. Sabashuk<sup>a</sup>, and A. L. Pervushin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>All-Russian Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, 196608 Russia

\*e-mail: [aberestetskiy@vizr.spb.ru](mailto:aberestetskiy@vizr.spb.ru)

Received May 16, 2018; revised April 25, 2019; accepted June 20, 2019

A simple HPLC technique of quantitative analysis of phytotoxins (herbarumin I and stagonolide A) in culture liquid of the fungus, *Stagonospora cirsi* S-47 was developed. Some examples of its application were presented. The technique was used for study of effects of refined sunflower oil concentration and duration of cultivation on concentration of the toxins. At the oil concentration of 0.5% and higher in modified Czapek medium the biomass yield and concentration of stagonolide A were increased while the concentration of herbarumin I was decreased. Maximal concentrations of both toxins were obtained on 10 day of submerged cultivation in flasks. When the fungus was grown on the same medium supplied with 1% of the oil in a laboratory fermenter, maximal concentration of stagonolide A (116 mg/L) was achieved after 5 days of the fermentation while the maximal concentration of herbarumin I (116 mg/L) was observed after 7 days of the submerged growth. The technique was used for monitoring the toxins during their isolation as well as for preparative HPLC.

**Keywords:** *Stagonospora cirsi*, bioherbicide, HPLC, phytotoxins, stagonolide A, Herbarumin I