

УДК 577.19

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЕКРЕТИРУЕМОГО СОЕДИНЕНИЯ *PANTOEA BRENNERI* AS3, ОБЛАДАЮЩЕГО ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

© 2022 г. Д. Л. Иткина¹, *, А. Д. Сулейманова¹, М. Р. Шарипова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

*e-mail: laia9301@mail.ru

Поступила в редакцию 12.10.2021 г.

После доработки 15.12.2021 г.

Принята к публикации 28.02.2022 г.

Штамм *Pantoea brenneri* AS3 стимулирует рост растений и активен против патогенов, выделяя в культуральную среду вторичные метаболиты, подавляющие рост грибов. Выделен и идентифицирован активный вторичный метаболит, продуцируемый штаммом *P. brenneri* AS3, биосурфактант – n(2-гидроксигексадецил) диэтаноламинамовая кислота, ингибирующий рост фитопатогена *Fusarium solani*. В дальнейшем он может быть использован при разработке биоудобрений и биопестицидов.

Ключевые слова: биоудобрения, бактерии, растения, биофунгицид, биосурфактант, *Pantoea*, *Fusarium*

DOI: 10.31857/S0555109922040079

Поражение сельскохозяйственных культур патогенными микромицетами может иметь катастрофические последствия для агропроизводства, несмотря на все профилактические меры, принятые для контроля их распространения. Широкое использование химических веществ для борьбы с болезнями растений нарушает баланс сообществ микроорганизмов в почве, что приводит не только к развитию устойчивых штаммов-патогенов, но и загрязнению грунтовых вод и очевидным рискам для здоровья людей [1]. Разработка альтернативы химическим пестицидам для борьбы с болезнями сельскохозяйственных культур – одна из актуальных проблем, с которыми сталкиваются микробиологи и фитопатологи [2].

Более 80% всех известных болезней растений вызваны грибами – самой распространенной группой возбудителей [3]. В настоящее время эффективным методом контроля этих болезней растений является широкое применение химических фунгицидов. Однако активное использование химикатов наносит значимый ущерб окружающей среде, что вынуждает искать новые подходы, позволяющие свести к минимуму их использование. Применение микроорганизмов, обладающих биоконтрольными свойствами считается одним из них [4].

Способность ризобактерий контролировать рост патогенной микрофлоры растений осуществляется, с одной стороны, за счет стимулирующего воздействия на рост растения и улучшения его жизненного статуса: увеличение по-

ступления минеральных элементов, фосфора, азота, расщепление сложных белков и др., с другой – за счет выделения соединений, обладающих фунгицидными свойствами и способных подавлять развитие фитопатогенных бактерий и грибов в ризосфере [5]. Одной из стратегий преодоления ограничений в использовании бактериальных удобрений является использование автохтонных микроорганизмов, приспособленных к климатическим условиям каждого региона [6]. Таким образом, актуальным становится поиск эффективных адаптированных микроорганизмов, способных действовать как против патогенов растений, так и одновременно способствовать росту растений и повышать урожайность, при этом, не нарушая агроценоза и качества почвы.

Ранее из почв Республики Татарстан были выделены гидролизующие фитаты штаммы, идентифицированные молекулярно-генетическими методами как *Pantoea brenneri* [7]. В предыдущих исследованиях уже были показаны их RGP-свойства: установлена способность к секреции комплекса гидролитических ферментов (фитазы, протеазы, целлюлазы), деструкции цианидов (HCN), способность штаммов синтезировать фитогормоны и сидерофоры. Установлено, что штамм *P. brenneri* подавлял (>87%) рост микромицетов рода *Fusarium* [7, 8, 10].

Цель работы – очистка и идентификация секретируемого *P. brenneri* AS3 вещества, обладаю-

шего фунгицидной активностью по отношению к микромицетам рода *Fusarium*.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служил выделенный из почвы Республики Татарстан (Россия) бактериальный штамм *P. brenneri* AS3, способный к синтезу фитазы на дифференциальной среде PSM. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под номером ВКМ В-12911 [11].

Выделение соединений *P. brenneri* AS3 с фунгицидной активностью. Штамм *P. brenneri* AS3 культивировали на среде NBRIP, следующего состава (г/л): глюкоза – 10.0; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – 5.0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 5.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.25; KCl – 2.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.1; агар-агар – 20, pH 6.8–7.0. Культивирование проводили в течение 24 ч при 37°C на качалке при 200 об./мин до достижение плотности клеток 10^8 КОЕ/мл. Полученную культуральную жидкость фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.22 мкм (“Millipore”, Германия). Фильтрат центрифугировали с использованием центрифужного концентратора Amicon Ultra-15ml Ultracel 3K (“Millipore”, Германия) при 3500 g (rcf). Полученную фракцию, содержащую низкомолекулярные вещества массой менее 3000 Да, концентрировали пропуская через картридж Discovergy DSC C-18 SPE (“Superlco”, США) для твердофазной экстракции. Сконцентрированные органические вещества промывали от остатков солей 1.5 мл 0.1%-ного раствора трифторуксусной кислоты (ТФУ) и 1 мл воды. Затем органические вещества элюировали 500 мкл 80%-ного раствора ацетонитрила (“Biosolve”, Франция). Растворитель упаривали в центрифужном испарителе Concentrator Plus (“Eppendorf”, Германия) при 45°C под вакуумом. Полученный сухой остаток разводили в 5%-ном растворе ацетонитрила.

Фракционирование методом ВЭЖХ (HPLC). Полученные образцы фракционировали на жидкостном хроматографе UltiMate 3000 (“Thermo Scientific”, США) на колонке Acclaim Polar Advantage II (“Dionex”, США), C18 5 мкм, 120А, 4.6 × 250 мм.

Объем пробы, нанесенной на колонку – 50 мкл. Разделение проводили в условиях градиента: 2 мин 5%-ный ацетонитрил (АЦН), градиент 5–70% АЦН 10 мин, 70%-ный АЦН 4 мин, от 70–95% АЦН 5 мин, 95%-ный АЦН 5 мин со скоростью 1 мл/мин при температуре 25°C. Собранные фракции высушивали на центрифужном испарителе, а затем разводили в 20 мкл воды.

Повторная хроматография на колонке Zorbax C-18. Для последующего выделения активной фракции с фунгицидной активностью проводили рехроматографию на колонке Zorbax C-18, 2.1 ×

× 150 мм, 5 мкм (“Agilent”, США). На колонку наносили 80 мкл пробы, вещества разделяли в условиях градиента: 2 мин 40%-ный АЦН, от 40–90% АЦН 10 мин, 90%-ный АЦН 5 мин, градиент от 90–40% АЦН 5 мин со скоростью 0.5 мл/мин при температуре 25°C. Собранные фракции высушивали на центрифужном испарителе, разводили в 20 мкл воды и проверяли на фунгицидную активность.

Определение фунгицидной активности штамма *P. brenneri* AS3 и полученных при разделении фракций метаболитов. Оценку фунгицидной активности фракций после хроматографии проводили на среде Чапека (г/л): сахароза – 30; NaNO_3 – 3.0; KH_2PO_4 – 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; KCl – 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; агар-агар – 20. Контролем служил посев гриба *Fusarium solani* без добавления ингибирующего метаболита. В центр чашки Петри на агаризованную среду высевали штамм микромицета, на одинаковом расстоянии от посева раскладывали диски фильтровальной бумаги, пропитанные каждой фракцией [9].

Идентификация веществ. Идентификацию активного вещества проводили на масс-спектрометре QTrap 6500 (“AB Sciex”, Канада). Фракцию разводили в 600 мкл воды и делили на 2 части. В одну часть добавляли 20 мкл 100 мМ раствора формиата аммония для получения спектра в режиме отрицательной ионизации; во вторую – добавляли муравьиную кислоту до конечной концентрации 0.1% для получения спектра в режиме положительной ионизации. Пробу вводили шприцом со скоростью 7 мкл/мин. Параметры сканирования, следующие: IS voltage – напряжение на источнике 5500 В, 250°C, режим сканирования MS Q1. Выбранные ионы далее отправлялись на фрагментацию в режиме MS Q2.

Программное обеспечение. Анализ масс-спектрометрических данных проводили с использованием программного обеспечения PeakView®2.1 (Sciex) и MasterView®1.1 (Sciex), которые осуществляют поиск по библиотечным базам данных, представленным на серверах <http://www.massbank.jp>; <http://www.chemspider.com>.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективный метод разделения сложных смесей методом ВЭЖХ был использован для выделения, очистки и идентификации, секретиремых штаммом *P. brenneri* AS3 веществ, обладающих фунгицидными свойствами. На первом этапе проводили фракционирование высушенного филтраты культуральной жидкости штамма. Были получены низкомолекулярные вещества с массой менее 3000 Да, которые подвергали разделению на колонке Acclaim Polar Advantage II по степени гидрофобности. Результаты хроматографического анализа

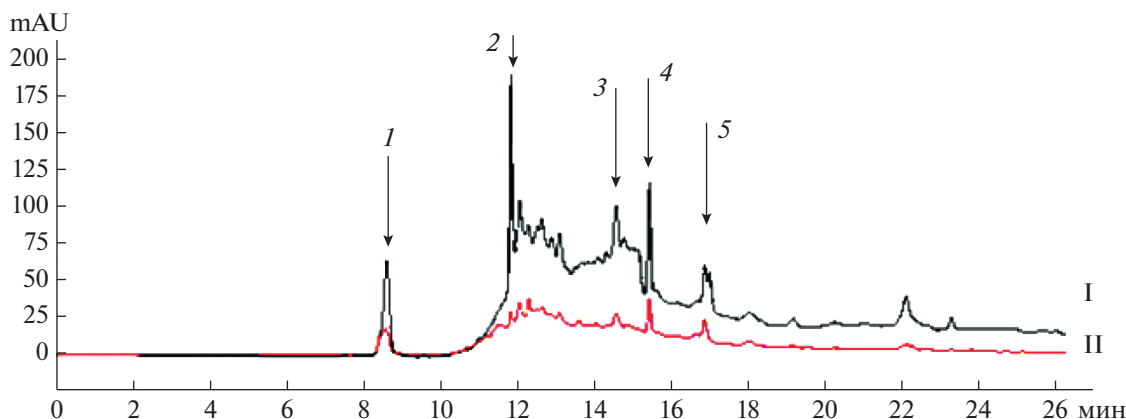


Рис. 1. Фракционирование культуральной жидкости *P. brenneri* AS3 методом ВЭЖХ на колонке Acclaim Polar Advantage II: I – 260 нм, II – 220 нм, 1–5 фракции с наибольшей ОП при 220–260 нм.

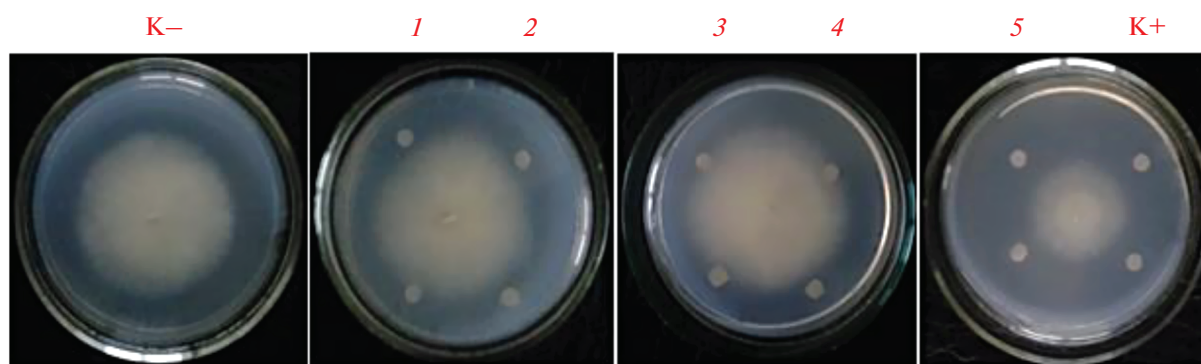


Рис. 2. Подавление роста мицелия *F. solani* фракциями 1–5, полученными при разделении методом ВЭЖХ: K_1 – контроль, посев гриба без дисков с фракциями; 1–5 – фракции (см. рис. 1), нанесенные на диски, в двух повторностях; K_2 – исходный образец до разделения.

представлены на рис. 1. Было отобрано 5 фракций объемом 10 мкл с наибольшей оптической плотностью при 220–260 нм, которые далее исследовали на фунгицидную активность.

Ранее было установлено, что максимальная ингибирующая способность *P. brenneri* AS3 проявлялась по отношению к микромицету *F. solani*, возбудителю корневой гнили и трахеомикозного увядания, предоставленному музеем кафедры микробиологии ИФМиБ К(П)ФУ. *F. solani* выделен из пораженных клубней картофеля в отделе сельскохозяйственной биотехнологии ГНУ Татарский НИИ сельского хозяйства Россельхозакадемии и идентифицирован нами ранее с помощью анализа последовательностей 5.8 S рРНК со стандартными праймерами ITS1 и ITS4. Рост микромицета ингибировался на 87% под действием бактериального штамма *P. brenneri* AS3. [8]. Активность отобранных в процессе хроматографии фракций проверяли, используя тест-штамм *F. solani* как наиболее чувствительный к фунгицидному соединению, продуцируемому штам-

мом *P. brenneri* AS3. Определение фунгицидной активности штамма *P. brenneri* AS3 и фракций метаболитов после разделения проводили по методу, описанному в статье [9] (рис. 2). Максимальное фунгицидное действие проявляла фракция № 5, активность которой соответствовала активности исходного не очищенного образца до разделения на хроматографе.

Выше описаны стадии разделения исходной фракции, полученной после разделения на фильтре на 2 части культуральной жидкости *P. brenneri*: с молекулярной массой ниже и выше 3000 Да. Анализ второй половины фильтрата с молекулярной массой выше 3000 Да показал отсутствие фунгицидной активности.

На следующем этапе проводили рехроматографию активной фракции № 5 на колонке Zorbax C-18 (рис. 3).

После разделения собрали 8 фракций, которые тестировали на присутствие метаболитов, ингибирующих рост фитопатогена *F. solani* с использованием дисков, пропитанных каждой из них

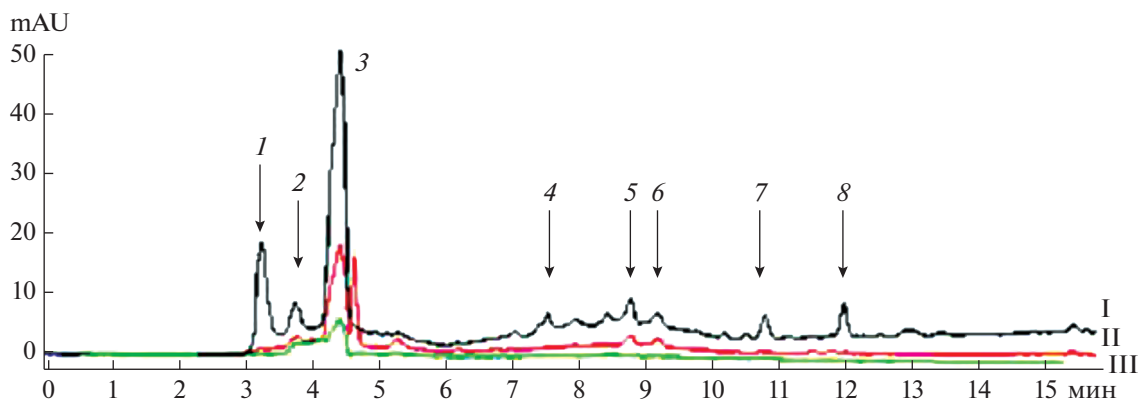


Рис. 3. Разделение активной фракции № 5 на колонке Zorbax C-18: I – 260, II – 220, III – 330 нм (1–8 – активные фракции).



Рис. 4. Определение фунгицидной активности фракций после рехроматографии методом ВЭЖХ на колонке Zorbax C-18: К – посев без нанесения фракций; 1–8 – диски с нанесенными активными фракциями.

(рис. 4). Фунгицидной активностью обладали фракции 1, 2, 3 и 4, которые были использованы для дальнейшего анализа и идентификации.

Идентификация фунгицидного соединения. Анализировали фракцию № 3, соответствующую максимальному пику на хроматограмме (рис. 3). Идентификацию активного вещества проводили с помощью масс-спектрометра QTrap 6500. Добавление муравьиной кислоты позволило положительно ионизировать пробу, что изменило характер спектра первичных ионов, появились интенсивные сигналы с m/z 274.3; 282.3; 290.4; 318.4; 563.7, которые далее фрагментировали в режиме MS Q2 с использованием ионной ловушки для идентификации химического соединения (рис. 5).

Установлено, что ион с m/z 318 принадлежал нестабильному соединению, которое распалось при низких энергиях SE (Collision energy). Поскольку данное вещество было нестабильно, вещества в пробе, подкисленной муравьиной кислотой, идентифицировали на масс-спектрометре TripleTOF 5600. Был обнаружен интенсив-

ный сигнал с m/z 362, при фрагментации которого образовывались ионы с m/z 318 и 274, а также с m/z 150. На рис. 6 представлены спектры фрагментации ионов с m/z 362, 318.

Выброс нейтральной частицы с массой 62 (разница m/z 318–256, 212–150, 256–194) характерен при фрагментации для метоксиметильных простых эфиров, этиленгликолей, этиленкеталей. Выброс нейтральной частицы с массой 26 (разница между дочерними ионами m/z 256–230) могут давать при фрагментации ароматические соединения (потеря C_2H_2) или нитрилы (потеря CN). В случае родительского иона с m/z 362 наблюдали потерю нейтральной частицы с массой 44 (является разницей между родительским ионом и дочерним ионом m/z 318, а также между дочерними ионами 318–274, 176–132, 158–114), которая характерна для спектров фрагментации пропилалканов, диметиламинов, этиламинов, циклоалканов, циклических простых эфиров и этиленкеталей. Нейтральный фрагмент с массой 18 (является разницей между парами ионов с m/z 318–300, 362–344, 274–

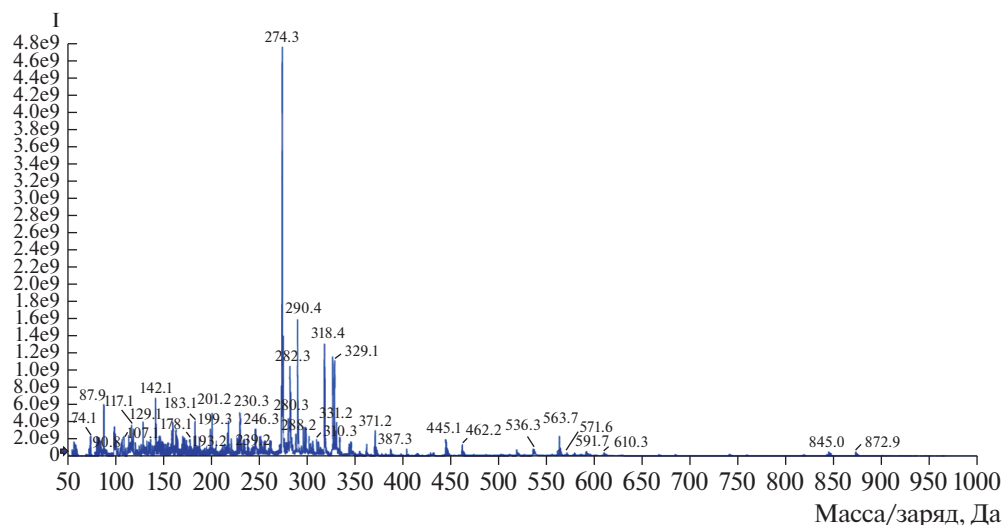


Рис. 5. Масс-спектр водного раствора фракции № 5 с добавлением муравьиной кислоты.

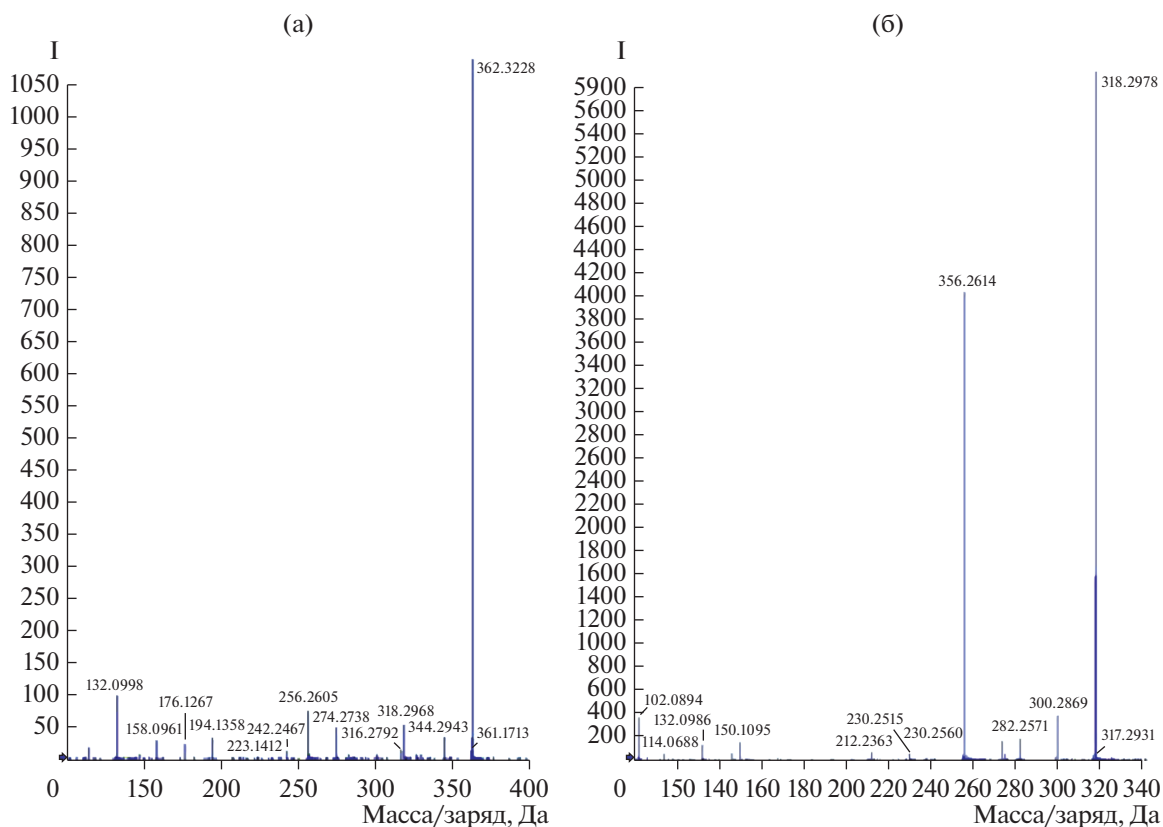


Рис. 6. Масс-спектры фрагментации ионов с m/z 362 (а); 318 (б).

256, 230–212, 150–132, 132–114, 194–176) принадлежит воде.

По предполагаемым нейтральным осколкам соединение, продуцируемое *P. brenneri* AS3, содержит кислород в составе спиртовых или эфирных групп, но не в составе карбоксильных групп,

поскольку нет характерных нейтральных выбросов 17 (18) и последующего выброса 28, свидетельствующих о декарбоксилировании [13].

Первичную обработку полученных в результате QTRAPMS/MS-анализа масс-спектрометрических данных проводили с использованием

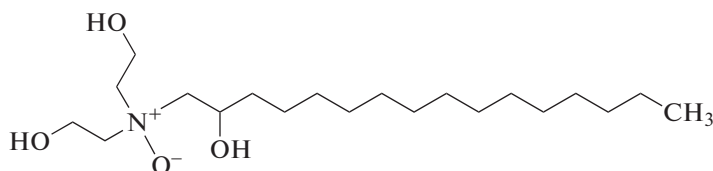


Рис. 7. Предполагаемое соединение, биосурфактант – n(2-гидроксигексадецил) диэтаноламинная кислота.

программного обеспечения PeakView®2.1 (Sciex). Программа позволяла вычислить точную массу и интерпретировать одновременно структуру вещества по массе, фрагментам и изотопному распределению [14]. Дальнейшую обработку результатов проводили с помощью подпрограммы MasterView®1.1 (Sciex), которая осуществляла поиск по библиотечным базам данных (Chem Spider) <http://www.massbank.jp>; <http://www.chemspider.com>.

Установлено (табл. 1), что первое соединение (C₁₉H₄₄N₃OP) не может быть искомым веществом, поскольку не встречается в природе. Наиболее вероятное соединение – C₂₀H₄₃NO₄ (структура представлена на рис. 7). Для него выявлены нейтральные осколки, соответствующие спектру исследуемого вещества, а также потеря трех молекул воды при фрагментации, свидетельствующая о наличии трех гидроксильных групп. На MS-спектре фрагментов родительского иона с *m/z* 362; 318 есть характерные для аминсоединений *m/z*: 114.132. Данные из базы Massbank позволяют утверждать, что в образце присутствуют аминсоединения с карбоксильной группой, поскольку имеются фрагменты ионов с более тяжелыми массами.

Результаты поиска по базе данных позволили предположить, что исследуемое вещество по наличию функциональных групп (неполярный алкановый фрагмент и полярные гидроксильные группы, аминогруппа) является биосурфактантом, то есть может нарушать целостность клеточной мембраны [12].

Исходя из анализа фрагментов и нейтральных выбросов, исследуемое вещество содержало остатки гидроксимиристиновой кислоты, связанной с многоатомным спиртом или углеводным остатком через остаток азота, что соответствует структуре, представленной на рис. 7.

Биосурфактанты – поверхностно-активные вещества бактериального происхождения с выраженными мультифункциональными свойствами. Они привлекают внимание как альтернатива химически синтезированным аналогам, ввиду их способности подвергаться деструкции, не вызывая загрязнения окружающей среды [15]. Биосурфактанты представляют собой химически гетерогенную группу, которая включает гликолипиды, липопептиды, фосфолипиды, жирные кислоты, нейтральные липиды, полимерные соединения [16]. Бактерии и другие микроорганизмы легко разлагают биосурфактанты, поэтому они не токсичны для окружающей среды [12]. Микробные сурфактанты могут изменять физико-химические свойства среды обитания и оказывать влияние на структуру развивающегося микробного сообщества, предотвращая бактериальные и грибковые заболевания, являясь фактором биоконтроля среды [17]. В настоящее время биосурфактанты рассматриваются в качестве средства для биологической борьбы с фитопатогенами [18]. Фунгицидная активность по отношению к фитопатогенным микромицетам была продемонстрирована у таких соединений, как гликолипиды, целлобиозные липиды [19], рамнолипиды [20] и циклических липопептидов [21] включая сурфактин, итурин и фенгицин [22].

Таблица 1. Результаты анализа иона с *m/z* 362 с помощью программы Master View (C₂₀H₄₃NO₄ предполагаемое соединение)

Формула	Оценка сходства	<i>m/z</i> , Да	Ошибка, ppm	Количество совпадений
C ₁₉ H ₄₄ N ₃ OP	78.7	362.32948	2.1	0
C₂₀H₄₃NO₄	34.6	362.32649	6.1	13
C ₁₆ H ₄₀ BN ₅ O ₃	52.3	362.3297	3.6	0
C ₂₁ H ₄₂ B ₂ NP	4.1	362.331198	9.5	0
C ₂₁ H ₃₉ N ₅	58.6	362.32782	2.4	2
C ₁₉ H ₄₃ N ₃ O ₃	0	362.33772	24.9	1
C ₁₅ H ₃₉ N ₉ O	0	362.33503	17.5	0
C ₁₆ H ₃₉ N ₇ O ₂	0	362.3238	13.5	0

Было показано, что бактерии рода *Pantoea* секретируют множество противомикробных соединений. Примером может служить вторичный метаболит, полученный из *Pantoea ananatis* 4G-9, обладающий противомикробной активностью в отношении *Mycosphaerella musicola*, представляющий собой по структуре производное индола [23]. Установлено, что бактерии рода *Pantoea* способны к синтезу бацитлломицина и итурина, подавляющих возбудителей коричневой гнили плодов — *Monilinia fructigena* и *M. laxa*. [24]. При исследовании антимикробной активности *P. agglomerans* против *Penicillium citrinum* выделены следующие соединения: аэругинальдегид и пуликатин С (C₁₁H₁₁NO₂S) [25]. Новый гликолипидный биосурфактант *P. ananatis* BRT175 оказывал цитотоксично действие на амёбы *Dictyostelium discoideum*, нарушая целостность клеток [26]. Штамм *Pantoea* sp. продемонстрировал способность к синтезу биосурфактантов, таких как гликолипид ананатозид А [27] и рамнолидов, обладающих выдающимся поверхностно-активными свойствами, а также полной биоразлагаемостью низкой токсичностью и хорошей стабильностью [28].

Полученные в работе результаты позволяют предположить, что *P. brenneri* AS3 может быть использован при получении препаратов биоудобрений и биопестицидов, поскольку обладал множественными биоконтрольными свойствами и синтезировал биосурфактант, ингибирующий рост фитопатогенного микромицета *F. solani*, вызывающего фузариозное увядание, сухую гниль клубней картофеля, плодов томатов, семян и зерновок хлебных злаков. [8].

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-38-90208.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aktar W., Sengupta D., Chowdhury A. // Interdiscip. Toxicol. 2009. V. 2. P. 1–12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
2. Bozkurt T. // American Journal of Plant Biology. 2017. V. 2. № 3. P. 28–31. <https://doi.org/10.11648/j.ajpb.s.2017020301.1>
3. Тутова Ю.А., Краснобаева И.Л. // АгроЭкоИнженерия. 2019. № 2. С. 164–183.
4. Etesami H., Beattie G.A. // Front. Microbiol. 2018. V. 9. P. 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00148>
5. Kosmidis C.D., Denning W. // Infectious Diseases (Fourth Edition). 2017. V. 2. P. 1681–1709.
6. Zahid M., Abbasi M.K., Hameed S.N. // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 1–15.
7. Сулейманова А.Д., Иткина Д.Л., Пудова Д.С., Шарипова М.Р. // Микробиология. 2021. Т. 90. № 1. С. 100–109.
8. Иткина Д.Л., Сулейманова А.Д., Шарипова М.Р. // Микробиология. 2021. Т. 90. № 2. С. 204–214.
9. Grady E.N., MacDonald J., Ho M.T., Weselowski B., McDowell T., Solomon O., Renaud J., Yuan Z. // BMC Microbiology. 2019. V. 19. № 5. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
10. Itkina D., Suleimanova A. // E3S Web of Conferences DAIC. 2020. V. 222. № 02055. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202022202055>
11. Suleimanova A.D., Beinhauer A., Valeeva L.R., Chastukhina I.B., Balaban N.P., Shakirov E.V., Greiner R., Sharipova M.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. № 19. P. 6790–6799.
12. Duong D.A., Stevens A.M. // Peer J. 2017. V.6. № 5. P. 41–45. <https://doi.org/10.7717/peerj.4145>
13. Преч Э., Бюльманн Ф., Аффольтер К. // Определенные строения органических соединений. Таблицы спектральных данных. М.: Мир, 2006. 438 с.
14. Ильиных Е.С., Ким Д.Г. // Масс-спектрометрия в органической химии: учебное пособие. / Ред. Ильиных Е.С., Ким Д.Г., Челябинск: Издательский центр ЮУрГУ, 2016. 63 с.
15. Nawrath M.M., Ottenheim C., Chuan Wu J., Zimmermann W. // Microbiologyopen. 2020. V. 9. № 5. P. 1–14.
16. Tacconelli E. Magrini N., Kahlmeter G., Singh N. // J. Med. Soc. 2017. V. 32. № 1. P. 76–77.
17. Farrar K., Bryant D., Cope-Selby N. // Plant Biotechnol. J. 2014. V. 12. № 9. P. 1193–1206.
18. Chopra A., Bobate S., Rahi P., Banpurkar A., Mazumder P.B., Satpute S. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2020. V. 8. № 861. P. 1–14.
19. Sato S., Fukuoka T., Saika A., Koshiyama T., Morita T. // J. Oleo Sci. 2019. V. 68. № 12. P. 1287–1294.
20. Yan F, Hu H, Lu L, Zheng X. // Pest Manag. Sci. 2016. V. 72. № 8. P. 1500–1507. <https://doi.org/10.1002/ps.4177>
21. Favaro G., Bogialli S., Gangi I.M. Di, Nigris S., Baldan E., Squartini A., Pastore P., Baldan B. // Rapid Commun Mass Spectrom. 2016. V. 30. № 20. P. 2237–2252.
22. Zhang F, Huo K., Song X., Quan Y., Wang S., Zhang Z., Gao W., Yang C. // Microb. Cell Fact. 2020. V. 19. № 1. P. 223–242. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01485-z>
23. Aman M., Rai R. // Biocont. Sci. Technol. 2015. V. 26. № 4. P. 1–35. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1126223>
24. Lahlali R., Aksissou W., Lyousfi N., Ezrari S., Blenzar A., Tahiri A., Amiri S. // Microbial Pathogenesis. 2019. V. 139. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103914>
25. Thissera B., Alhadrami H.A., Hassan M.H.A., Hassan H.M., Behery F.A., Bawazeer M., Yaseen I.M., Belbahri L., Rateb M.E. // Biomolecules. 2020. V. 10. № 2. P. 268. <https://doi.org/10.3390/biom10020268>
26. Smith D.D.N., Nickzad A., Deziel E., Stavrinides J. // ASM Journals, mSphere. 2016. V. 1. № 1. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00075-15>
27. Almeida F.C.G., Lins C.I.M., Vieira A.M., Vilar C.J., Mota Lins C., Campos-Takaki G.M., Tambourgi E.B. // Microbes in App. Res. 2012. P. 348–352. https://doi.org/10.1142/9789814405041_0070
28. Tan Y.N., Li Q. // Microb. Cell Fact. 2018. V. 17. № 1. P. 89–92. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0938-3>

Isolation, Purification and Identification of the Secrete Compound *Pantoea brenneri* AS3 with Fungicidal Activity

D. L. Itkina^{a, *}, A. D. Suleimanova^a, and M. R. Sharipova^a

^a Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, 420008 Russia

*e-mail: laia9301@mail.ru

The *Pantoea brenneri* AS3 strain stimulates plant growth and is active against pathogens, releasing secondary metabolites into the culture medium that inhibit the growth of fungi. An active secondary metabolite produced by the *P. brenneri* AS3 strain, a biosurfactant, n(2-hydroxyhexadecyl)diethanolamic acid, inhibiting the growth of the phytopathogen *Fusarium solani*, was isolated and identified using available methods. This suggests that it can be used in the production of biofertilizers and biopesticides.

Keywords: biofertilizers, bacteria, plants, biofungicide, biosurfactant, *Pantoea*, *Fusarium*