

УДК 582.284.51:577.115

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОГО СУБСТРАТА И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ, БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ ЭКСТРАКТОВ *Stagonospora cirsii* S-47

© 2020 г. А. О. Берестецкий<sup>1</sup>, \*, М. Ю. Белозерова<sup>1</sup>, Д. С. Прокофьева<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России,  
Ленинградская обл., п. Кузьмоловский, 188663 Россия

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

Поступила в редакцию 27.02.2019 г.

После доработки 01.08.2019 г.

Принята к публикации 30.08.2019 г.

Для определения токсигенного потенциала микогербицида на основе гриба *Stagonospora cirsii* S-47 исследовали влияние состава твердых и жидкых питательных субстратов на выход экстрактивных веществ (ВЭВ) из культур этого микромицета, а также спектр биологической активности и хроматографические профили полученных экстрактов. Максимальный ВЭВ из культурального фильтрата (около 250 мг/л) был получен через 2 нед. культивирования *S. cirsii* S-47 на жидкой питательной среде с соевой мукой. Такое же время инкубации было необходимо для получения максимального ВЭВ (около 1.5 г/кг) при культивировании гриба на перловой крупе. Экстракти из культуральных фильтратов проявляли более широкий спектр биологической активности, по сравнению с экстрактами из твердофазных культур *S. cirsii* S-47. Максимальная фитотоксическая и антибиотическая активность обнаружена у экстракта (экстрагент – хлористый метилен) трехнедельной культуры гриба на жидкой модифицированной среде Чапека, в таком же экстракте двухнедельной культуры обнаружена антиэстеразная активность. Цитотоксическую активность в отношении линии опухолевых клеток линии U251 проявлял экстракт (экстрагент этилацетат) из культурального фильтрата трехнедельной культуры гриба на жидкой среде ДМГ. Способ культивирования, а также состав питательной среды оказывали существенное влияние на набор продуцируемых грибом метаболитов.

**Ключевые слова:** *Stagonospora cirsii*, фитотоксичность, antimикробная активность, цитотоксичность, метаболиты грибов, стагонолид, гербарумин I, микогербицид

**DOI:** 10.31857/S0555109920010031

Биологические и биорациональные гербициды – это препараты для борьбы с сорными растениями на основе соответственно фитопатогенных микроорганизмов и их метаболитов. Токсикологические аспекты их применения, в том числе, селективность гербицидного действия, спектр биологической активности, экологическая безопасность, еще недостаточно изучены [1]. При этом хорошо известно, что многие фитопатогенные грибы являются продуcentами фитотоксинов и микотоксинов, которые могут обладать как широким, так и узким спектром биологической активности [2].

В настоящее время известны грибы родов *Fusarium* и *Myrothecium*, патогенные для сорных растений, экстракти которых обладают гербицидной активностью, однако их применение еще весьма

ограничено. Это связано с возможностью образования этими микромицетами микотоксинов, таких как трихотецины, которые могут нанести вред окружающей среде [3–8]. Однако, например, очищенный экстракт из культуральной жидкости *Ascochyta caulina* – потенциального микогербицида против мари белой, содержащий три полярных фитотоксина, обладал меньшей общей токсичностью в отношении рыб, водорослей, земляных червей, чем стандартные химические гербициды. В то же время высокочувствительной к нему оказалась дафния (*Daphnia magna*) на уровне 3 класса острой токсичности и 2 класса – хронической [9]. Эльсинохром А – основной токсический компонент экстрактов из культур патогена выонка перлового гриба *Stagonospora convolvuli*, обладал значительными antimикробными и цитотоксиче-

скими свойствами, однако не обнаруживался в обработанных микогербицидом растениях [10–12]. Аналогичные исследования проводятся и в отношении продуцентов микоинсектицидов и их метаболитов [13, 14].

Эти и многие другие работы не учитывают, что в изменяющихся условиях культивирования или в природе микроорганизмы—продуценты биопестицидов могут образовывать не только анализируемые в лабораторных условиях, но и совершенно иные метаболиты [15]. С целью выявления новых метаболитов микроорганизмов и уточнения их токсичности возможно использование подхода “один штамм – много метаболитов”. Он основан на том, что с помощью изменения состава среды и способа культивирования можно существенно влиять на образование вторичных метаболитов грибов и получать из одного продуцента различные по структуре и свойствам соединения. Примером может служить гриб *Ascochyta agropyri-na* var. *nana*, который при выращивании на перловой крупе образовывал папирапилловую кислоту [16], а на жидкой среде – другие фитотоксины – агропиренол и агропиренал [17]. Дрожжевой экстракт, который входит в состав многих жидких питательных сред, полученный от различных производителей, оказывал существенное влияние на количественный и качественный состав метаболитов, образуемых некоторыми штаммами грибов рода *Fusarium* [18]. На твердых субстратах изменения в составе токсинов *Fusarium* spp. были не столь значительными [19].

В качестве потенциального продуцента микогербицида интересен гриб *Stagonospora cirsii*. Штамм VIZR 1.42 этого гриба был изолирован из листьев бодяка полевого (*Cirsium arvense*) и предложен для биологической борьбы с этим сорняком [20]. Заявлен способ его применения в виде измельченного глубинного мицелия совместно с гербицидом глифосат, что позволяет значительно снизить норму расхода последнего для эффективного уничтожения бодяка [21]. Из больных листьев осота полевого (*Sonchus arvensis*), который наряду с бодяком полевым является широко распространенным и трудноискоренимым многолетним сорным растением, собранных в различных регионах Российской Федерации, были выделены несколько новых изолятов *S. cirsii* [22].

Гриб *Stagonospora cirsii* J.J. Davis, штамм С-163 (VIZR 1.41), выделенный из больных листьев бодяка полевого, оказался продуцентом биологически активных веществ (БАВ) из группы 10-членных макролидов (ноненолидов). Из культурально-го фильтрата этого гриба был выделен фитотоксин стагонолид А, который в концентрации ~1.0 mM вызывает некрозы на листьях различных растений и достоверно ингибирует рост корешков проростков бодяка и салата в концентрации ~1.0 мкМ [23].

## ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

Этот токсин проявлял антимикробную активность в отношении *Candida tropicalis*, *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* при концентрации 100 мкг/диск. Структурно близок к нему гербарумин I, который выявлен у *Phoma herbarum* и был синтезирован из стагонолида А восстановлением карбонильной группы [23]. Этот фитотоксин ингибирал рост корешков *Amaranthus hypochondriacus* в микромолярных концентрациях (ИК<sub>50</sub> = 50 мкМ) [24]. Из твердофазной культуры *S. cirsii* С-163 на пшенице были выделены стагонолиды В–Н и модиолид А [25, 26]. Из них фитотоксическими свойствами обладали стагонолид Н и модиолид А, которые вызывали некрозы на листьях бодяка в минимальной концентрации ~1.0 mM и 10 mM соответственно. При этом было показано, что стагонолид Н (из других грибов был выделен как курвулид B1/B2) не проявлял ни антимикробной, ни цитотоксической активности [27, 28]. Модиолид А, выделенный из твердофазной культуры *S. cirsii* С-163 и некоторых других грибов, демонстрировал антимикробную активность в отношении *Micrococcus luteus* и *Neurospora crassa* в минимальной ингибирующей концентрации около 15–30 мкг/мл [29], а также *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* при 3–12 мкг/мл [30]. Однако в других тестах некоторые мицелиальные грибы и виды бактерий, устойчивых к антибиотикам, были к нему нечувствительными [27, 31]. Синтетический стагонолид F обладал умеренной цитотоксичностью на линиях клеток ТНР-1 and U-937 (ИК<sub>50</sub> около 35 мкг/мл) и слабыми антимикробными свойствами [32]. Цитотоксичность гербарумина I не изучена, однако его региомер обладал слабой цитотоксической и антимикробной активностью [33]. Наряду со многими другими соединениями из группы ноненолидов все перечисленные выше метаболиты, образуемые *S. cirsii*, к настоящему моменту синтезированы [34, 35].

В представленной работе мы использовали штамм S-47 *S. cirsii*, выделенный из листьев осота полевого. С целью изучения токсигенного потенциала этого гриба проведена оценка фитотоксической, антимикробной, цитотоксической и антиэстеразной активности его экстрактов в зависимости от состава питательных сред, способа и сроков культивирования.

## МЕТОДИКА

**Штамм гриба и его культивирование.** В работе был использован штамм S-47 *S. cirsii*, выделенный из осота полевого (*Sonchus arvensis*), собранного на юго-востоке Алтайского края. Штамм хранится в коллекции Лаборатории фитотоксикологии и биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений.

В качестве посевного материала использовали двухнедельную культуру гриба, полученную на стандартной агаризованной картофельно-сахарозной среде.

Для жидкофазного культивирования гриба использовали три жидкие среды (г/л): СС (сахароза – 60, соевая мука – 15,  $Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.5,  $KH_2PO_4$  – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0; модифицированная среда Чапека с витаминами (ЧАВ, сахароза – 45,  $NaNO_3$  – 3,  $KH_2PO_4$  – 1.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.5,  $KCl$  – 0.5,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  – 0.01, тиамин – 100 мкг, биотин – 5.0 мкг); ДМГ (дрожжевой экстракт – 4; мальтозный экстракт – 10; глюкоза – 10), pH доводили до 6.0. В конические колбы на 500 мл вносили по 100 мл жидкой питательной среды.

Для твердофазного культивирования готовили субстраты на основе перловой, пшеничной и рисовой крупы. В конические колбы на 100 мл вносили 15 г крупы и 10 мл водопроводной воды, перемешивали и стерилизовали автоклавированием при 121°C в течение 15 мин. После охлаждения субстрата колбы встряхивали для предотвращения его слипания.

Инокуляцию жидких и твердых субстратов проводили двумя агаровыми блоками, вырезанными из края колонии посевной культуры гриба. *S. cirsii* выращивали в течение 3 нед. при 24°C. Колбы с твердыми субстратами встряхивали каждые 2 дня, чтобы избежать их комкования.

**Получение экстрактов.** Метаболиты *S. cirsii* извлекали из культурального фильтрата (100 мл) последовательной экстракцией хлористым метиленом и этилацетатом (двумя порциями по 75 мл). Экстракты обезвоживали фильтрованием через безводный сернокислый натрий. Растворители отгоняли на ротационном испарителе при 40°C, сухой остаток объединенных экстрактов взвешивали.

Экстракцию метаболитов из твердофазных культур *S. cirsii* на зерновых субстратах проводили в два этапа. Высушенный биоматериал (5 г) измельчали в лабораторной мельнице, заливали 100 мл 50%-ного водного ацетона и обрабатывали ультразвуком 5 мин. Полученный экстракт фильтровали в испарительную колбу, после чего повторяли извлечение грибных метаболитов. Из объединенных экстрактов отгоняли ацетон, после чего метаболиты переэкстрагировали вновь последовательно n-гексаном (как стадия обезжививания), хлористым метиленом и этилацетатом (каждым двумя порциями по 75 мл).

**Оценка биологической активности.** Для исследования фитотоксичности экстрактов использовали хорошо развитые листья осота полевого *Sonchus arvensis* (осот полевой, сем. Asteraceae) и *Elytrigia repens* (пырей ползучий, сем. Poaceae). Для оценки фитотоксической активности исследуе-

мый образец сначала растворяли в небольшом количестве этанола и доводили до необходимой концентрации дистиллированной водой, чтобы содержание этанола в растворе составляло 5%. Фитотоксичность 0.5%-ных экстрактов определяли методом листовых дисков [36]. Из листьев 3–5-недельных растений осота пробочным сверлом вырезали диски 1 см в диаметре; листья пырея нарезали на отрезки длиной около 2 см. Высечки и отрезки листьев растений помещали во влажную камеру. Каждую высечку в центре надкальвали острой препаратальной иглой, в область накола наносили 10 мкл исследуемого раствора. Определение диаметра некрозов для осота и длину некроза для пырея проводили через 48 ч инкубации при температуре 24°C и переменном искусственном освещении по 12 ч в день.

Антибиотическую активность полученных экстрактов в концентрации 500 мкг/диск оценивали на 3 тест-микроорганизмах (*Escherichia coli*; *Bacillus subtilis* и *Candida tropicalis*) методом бумажных дисков.

Для оценки цитотоксической активности экстрактов использовали клеточные линии адено-карциномы легких человека А549 и глиобластомы человека U251. Время экспозиции клеток с растворами экстрактов составляло 48 ч. Количества общего белка в лунках с клетками в качестве показателя прироста клеточной массы после воздействия исследуемых экстрактов определяли методом окраски с сульфородамином Б в соответствии с протоколом производителя (TOX6, “Sigma”, США) [14].

Оценку ингибирующего действия экстрактов по отношению к карбоксилэстеразе (КЭ) и бутирилхолинэстеразе (БХЭ) проводили как описано в работе [14] с незначительными модификациями [37, 38].

**Хроматографический анализ экстрактов.** Для анализа экстрактов методом тонкослойной хроматографии сухой остаток растворяли в ацетоне до концентрации 10 мг/мл. На линию старта пластин для ТСХ (TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>, “Merck”, Германия) наносили 5 мкл экстракта. Элюирование экстрактов проводили в системе растворителей гексан–этилацетат 1 : 1 (об./об.). Хроматограммы визуализировали при 254 нм и обработкой реагентом (анисовый альдегид–серная кислота–этанол 5 : 5 : 95, масса/об./об.) с последующим нагревом при температуре 120°C в течение нескольких минут до проявления полос. Учитывали хроматографическую подвижность полос и их цвет.

Для анализа экстрактов методом ВЭЖХ сухой остаток растворяли в ацетонитриле до концентрации 5 мг/мл. Разделение экстрактов производили на колонке Acquity UPLC BEH C18 2.1 × 50 мм с размером частиц 1.7 мкм с помощью хроматографической системы Acquity UPLC H-Class (“Wa-

ters”, США), снабженной диодно-матричным детектором (СВЭЖХ/ДМД). Объем вводимой пробы составлял 2 мкл. Элюирование экстрактов осуществляли при скорости потока элюента 300 мкл/мин и температуре колонки 40°C в системе ацетонитрил–0.1%-ная муравьиная кислота в градиентном режиме: от 10 до 100% ацетонитрила в течение 5 мин, затем 2 мин – 100% ацетонитрила. Детектирование веществ производили сканированием в диапазоне 190–600 нм при помощи функции MaxPlot программы Empower (“Waters”, США). Учитывали время удерживания и УФ-спектр мажорных соединений (уровень поглощения не менее 0.2). В этих условиях время удерживания ( $t_R$ ) стандартов составляло: 1.7 и 1.8 мин (стагонолид Н = курвулид B1/B2,  $\lambda_{\text{макс}} < 200$  нм), 3.1 мин (гербарумин I,  $\lambda_{\text{макс}} < 200$  нм), 3.3 мин (стагонолид A,  $\lambda_{\text{макс}} 234$  нм). Варьирование  $t_R$  в ходе экспериментов не превышало 5%. Указанные вещества были получены из культуры *S. cirsii* C-163, их структура подтверждена спектральными данными:  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-, УФ-спектроскопия и масс-спектрометрия [23–26].

**Статистический анализ.** Эксперименты проведены в 3–6 повторностях. Дисперсионный анализ данных проводили с помощью программы Statistica 8. Средние значения сравнивали на основании критерия наименьшей существенной разницы НСР при  $p = 0.05$  [39]. Кластерный анализ методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (UPGMA) проведен с целью сравнения различий экстрактов по хроматографическим профилям на базе матрицы, построенной на основе наличия или отсутствия метаболитов (следовые их количества не учитывали) с определенным временем удерживания и УФ-спектром.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Продуктивность.** Дисперсионный анализ полученных результатов показал, что различные крупы, входящие в состав твердого питательного субстрата, и сроки культивирования не оказывали существенного влияния (при  $p = 0.05$ ) на выход экстрактивных веществ (ВЭВ) из твердофазных культур *S. cirsii* S-47. Не было существенным и взаимодействие этих факторов. Выбор экстрагента и его взаимодействия с вышеуказанными факторами были достоверными на уровне  $p < 0.01$ . Максимальный ВЭВ был достигнут при экстракции метаболитов гексаном из культуры *S. cirsii* S-47 на пшенице (выход ~850 мг/кг), а также хлористым метиленом (выход 620–650 мг/кг) и из двухнедельных культур гриба независимо от состава твердого питательного субстрата (табл. 1). Максимальный суммарный ВЭВ (1.5 г/кг) был получен в результате последовательной экстракции грибных метаболитов тремя растворителями различ-

ной полярности из двухнедельной культуры *S. cirsii* на перловой крупе (табл. 1).

Состав жидкой питательной среды и сроки культивирования оказывали существенное влияние ( $p < 0.001$ ) на выход биомассы *S. cirsii* S-47, который варьировал от 1.7 до 25 г/л. Наиболее благоприятной для роста мицелия была среда СС: через 2 нед. культивирования наблюдали максимальный для эксперимента выход биомассы. Через 1 нед. культивирования гриба на среде СС дальнейшего прироста биомассы не наблюдали. При росте *S. cirsii* S-47 на средах ДМГ и ЧАВ рост биомассы гриба продолжался и на третьей неделе инкубации. Через 3 нед. культивирования выход мицелия гриба увеличивался в 3.6 раза на среде ДМГ и в 2.7 раза – на среде ЧАВ по сравнению со второй неделей (табл. 2).

Состав жидкой питательной среды и экстрагент оказали существенное влияние ( $p < 0.001$ ) на ВЭВ из культурального фильтрата *S. cirsii* S-47, тогда как влияние сроков культивирования на этот показатель не было достоверным (при  $p = 0.05$ ). Без учета продолжительности культивирования и экстрагента средний ВЭВ из культур гриба на среде СС был в 2 раза выше, чем на среде ДМГ и в 6 раз выше, чем на среде ЧАВ. При последовательной экстракции грибных метаболитов из культурального фильтрата *S. cirsii* S-47 растворителями различной полярности при использовании хлористого метиlena ВЭВ был существенно (примерно на 70%) выше, чем ВЭВ при использовании этилацетата. Наиболее продуктивной по ВЭВ оказалась двухнедельная культура гриба на среде СС: выход экстрактов (хлористый метилен) составил около 180 мг/л, этилацетатных – около 85 мг/л (табл. 3).

**Биологическая активность экстрактов.** Фитотоксическая активность.. Состав твердого питательного субстрата оказал существенное влияние ( $p < 0.01$ ) на фитотоксическую активность экстрактов из культур *S. cirsii* S-47 в отношении пырея и осота: вне зависимости от сроков культивирования и экстрагента экстракты из культур гриба на пшенице были в 1.5–2 раза токсичнее, чем экстракты из культур на перловой крупе. Различия в фитотоксичности экстрактов из культур *S. cirsii* S-47, полученных на пшенице и рисовой крупе, были несущественными на уровне  $p = 0.05$ . Листья осота были наиболее чувствительными к гексановым экстрактам из двухнедельных культур *S. cirsii* S-47 на пшенице, листья пырея – к хлористометиленовым экстрактам из трехнедельных культур гриба.

Важно отметить, что гексановые экстракты из культуры гриба на пшенице вне зависимости от сроков культивирования, а также этилацетатный экстракт из двухнедельной культуры на пшенице имели относительно высокую (диаметр некроза на листовых выщечках 3.5–4 мм) и селективную

Таблица 1. Продуктивность и биологическая активность экстрактов из твердофазных культур *S. cirsii S-47*

Субстрат	Время, нед	Экстрагент <sup>1</sup>	Выход экстрактивных веществ, мг/кг <sup>2</sup>	Фитотоксическая активность		Антимикробная активность <sup>5</sup>	Цитотоксическая активность <sup>6</sup>	Антиэстеразная активность <sup>7</sup>	TCX <sup>8</sup>
				осот <sup>3</sup>	пырей <sup>4</sup>				
Пшеничная крупа	2	Гексан	280	3.7	0	0	59	45	14
		Хлористый метилен	619	1.5	0	1	70	82	13
		Этилацетат	475	3.5	1.3	1	82	92	21
	3	Гексан	891	3.8	0.9	0	80	79	25
		Хлористый метилен	294	2.8	2.1	0	4	74	93
		Этилацетат	93	1.1	0	0	4	91	95
Рисовая крупа	2	Гексан	381	2.7	0.8	0	0	93	78
		Хлористый метилен	622	1.8	0	0	5	78	95
		Этилацетат	181	2.8	0	0	4	92	93
	3	Гексан	362	1.8	1	0	1	36	10
		Хлористый метилен	410	2.6	0	0	2	85	82
		Этилацетат	199	1.6	1	0	3	92	89
Перловая крупа	2	Гексан	521	3	0.8	0	3	89	82
		Хлористый метилен	665	1	0	0	6	93	102
		Этилацетат	315	1.8	0	0	6	90	107
	3	Гексан	281	1.4	0	0	0	98	92
		Хлористый метилен	263	1.5	0.9	0	0	96	82
		Этилацетат	335	1.7	0	0	0	92	102

Примечание. <sup>1</sup> – последовательная экстракция 3 размешанием растворителями; <sup>2</sup> – мг/кг сухого субстрата, НСР<sub>0,05</sub> = 190; <sup>3</sup> – диаметр некроза, мм, НСР<sub>0,05</sub> = 1.4; <sup>4</sup> – длина некрозы, мм, НСР<sub>0,05</sub> = 0.8; <sup>5</sup> – зона лизиса, мм; <sup>6</sup> – концентрация белка в лунках с клетками, % к контролю; <sup>7</sup> – ингибирование карбоксилэтеразы, % к контролю; <sup>8</sup> – дорожка на ТСХ-хроматограмме (рис. 1).

фитотоксическую активность в отношении осота (табл. 1). Несколько меньшую фитотоксичность (диаметр некроза 2.5–3 мм) для листьев осота проявили двухнедельные гексановые экстракты из культуры на рисе и перловой крупе, хлористометиленовые экстракты из трехнедельных культур, полученных на пшенице и рисе, этилацетатный экстракт из 2-недельной культуры на рисе. Остальные экстракты были фитотоксичны на уровне контроля или достоверно не отличались от него (табл. 1).

Отмечено достоверное влияние ( $p < 0.01$ ) состава жидкой питательной среды на фитотоксичность экстрактов из культурального фильтрата *S. cirsii* S-47 в отношении обоих тестируемых растений. Время культивирования гриба не оказывало существенного влияния на токсичность экстрактов в отношении осота (при  $p = 0.05$ ), тогда как различия в чувствительности пырея к экстрактам жидкых культур гриба, полученных в различное время культивирования, были достоверными (на уровне  $p < 0.01$ ) вне зависимости от экстрагента. Хлористометиленовые экстракты были достоверно более токсичными для осота, чем этилацетатные (на уровне  $p < 0.05$ ).

Максимальную неселективную фитотоксическую активность (диаметр некрозов около 7 мм на высечках из листьев осота, длина некрозов на отрезках листьев пырея – около 5 мм) проявил экстракт (полученный хлористым метиленом) из трехнедельного культурального фильтрата гриба, выращенного на среде ЧАВ. Фитотоксичность аналогичного экстракта из двухнедельных культур была примерно в 3 раза ниже (табл. 3).

Фитотоксическая активность комплексов экзометаболитов, образующихся при культивировании гриба на среде ДМГ, была в целом ниже, чем при выращивании на среде ЧАВ. Относительно высокую неселективную фитотоксичность (диаметр/длина некрозов более 3 мм) показали хлористометиленовые экстракты из двухнедельной и трехнедельной культур *S. cirsii* S-47. Экстракты, полученные с помощью этилацетата, были менее фитотоксичны, чем хлористометиленовые (табл. 3).

Относительно невысокую, но специфичную в отношении осота фитотоксическую активность (диаметр некроза 2–3.5 мм) выявили у экстрактов, полученных из фильтрата культур *S. cirsii* на среде СС. У экстрактов из двухнедельного культурального фильтрата гриба она была выше, чем у экстрактов из трехнедельного фильтрата. При этом, этилацетатные экстракты были более фитотоксичными, чем хлористометиленовые (табл. 3).

**Антимикробная активность экстрактов.** *Escherichia coli* и *Candida tropicalis* оказались нечувствительными к экстрактам *S. cirsii* S-47, выращенного на твердых средах. Заметная антибиотическая активность экстрактов гриба проявлялась только в отношении *Bacillus subtilis*. Вне зависи-

**Таблица 2.** Выход сухой биомассы *S. cirsii* S-47 в зависимости от состава питательной среды и сроков культивирования

Субстрат	Сроки культивирования, нед	Биомасса, г/л
ДМГ	2	1.7 <sup>a</sup>
	3	6.1 <sup>b</sup>
ЧАВ	2	5.7 <sup>b</sup>
	3	15.7 <sup>b</sup>
СС	2	25.2 <sup>c</sup>
	3	24.9 <sup>c</sup>

Примечание. Средние значения, отмеченные одной и той же буквой, не различаются при  $p = 0.05$

мости от зернового субстрата экстракты из 2-недельных культур гриба подавляли рост *B. subtilis* сильнее, чем экстракты из 3-недельных культур. Уровень активности хлористометиленовых и этилацетатных экстрактов в отношении этой бактерии был примерно одинаковым и превышал антибиотическую активность гексановых экстрактов.

Максимальную антибиотическую активность в отношении *B. subtilis* (зона лизиса 5–6 мм при концентрации экстрактов 500 мкг/диск) показали экстракты из двухнедельных культур гриба на пшеничной и перловой крупе. Несколько пониженным уровнем антибиотической активности обладали экстракты, полученные из двухнедельной культуры гриба рисовой крупе (табл. 1).

Рост тест-бактерий *E. coli* и *B. subtilis* был достоверно подавлен экзометаболитами *S. cirsii* S-47 из культурального фильтрата, тогда как дрожжевой гриб *C. tropicalis* был чувствительным лишь отдельным экстрактам. При культивировании гриба на жидких средах ДМГ и ЧАВ максимальная antimикробная активность экстрактов из культурального фильтрата проявлялась через 3 нед. культивирования, на более богатой по составу среде СС – через 2 нед.

Максимальную антибиотическую активность (зона лизиса колоний *B. subtilis* ~ 15 мм, *E. coli* ~ 11 мм при концентрации экстрактов 500 мкг/диск) наблюдали у экстрактов, полученных с использованием хлористого метиlena, из фильтрата двухнедельной культуры *S. cirsii* S-47 на среде СС и трехнедельного фильтрата культуры гриба, полученной на жидкой среде ЧАВ. Примерно на 30% ниже antimикробная активность в отношении изученных двух видов бактерий была у экстрактов, полученных с хлористым метиленом, из трехнедельной культуры гриба на среде ДМГ и двухнедельной – на среде ЧАВ, а также у этилаце-

**Таблица 3.** Продуктивность и биологическая активность экстрактов из культуральных фильтратов *S. chrysii* S-47, полученных при разном времени выращивания

Субстрат	Время, нед <sup>4</sup>	Экстрагент <sup>1</sup>	Выход экстрактивных веществ, мг/л <sup>2</sup>	Фитотоксическая активность		Антимикробная активность <sup>5</sup>	Цитотоксическая активность <sup>6</sup>	Антиэстеразная активность	ТСХ <sup>9</sup>
				осот <sup>3</sup>	пырей <sup>4</sup>				
ДМГ	2	Хлористый мелиен	82.7	4.0	2.2	6	8	77	47
		Этилацетат	50.0	2.0	1.4	2	6	88	98
	3	Хлористый мелиен	56.8	3.2	3.2	6	11	78	55
ЧАВ		Этилацетат	33.1	2.6	3.1	3	9	41	18
	2	Хлористый мелиен	32.4	2.3	2.0	5	10	93	49
		Этилацетат	17.0	3.7	2.1	8	11	H <sub>2</sub> O <sup>10</sup>	H <sub>2</sub> O
CC	3	Хлористый мелиен	27.6	6.9	5.6	11	16	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
		Этилацетат	20.7	2.8	2.2	0	5	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
	2	Хлористый мелиен	199.4	2.5	0	11	15	63	67
		Этилацетат	94.7	3.3	0	5	11	88	25
	3	Хлористый мелиен	174.4	2.0	0	6	7	65	26
		Этилацетат	84.2	2.3	0	3	6	48	22

Примечание: <sup>1</sup> – последовательная экстракция двумя растворителями; <sup>2</sup> – НСР<sub>0,05</sub> = 31; <sup>3</sup> – диаметр некроза, мм, НСР<sub>0,05</sub> = 1.5; <sup>4</sup> – длина некроза, мм, НСР<sub>0,05</sub> = 1.4; <sup>5</sup> – зона лизиса, мм; <sup>6</sup> – концентрация белка в лунках с клетками, % к контролю; <sup>7</sup> – ингибиция карбоксилэстеразы, % к контролю; <sup>8</sup> – ингибирование бутирилхолинэстеразы, % к контролю; <sup>9</sup> – дорожка на ТСХ-хроматограмме (рис. 1); 10 – H<sub>2</sub>O – не определяли.

татных экстрактов из двухнедельных культур на среде ЧАВ и СС (табл. 2).

**Цитотоксическая активность.** Большинство экстрактов из твердофазных культур *S. cirsii* S-47 проявляли слабую цитотоксическую активность: при концентрации экстрактов 100 мкг/мл ингибирование роста линий опухолевых клеток на уровне более 50% наблюдалось только при исследовании гексановых экстрактов из двухнедельной культуры гриба на пшенице и трехнедельной – на рисовой. Причем, последний был заметно токсичнее как для клеток линии А549 (~3-кратное ингибирование роста), так и для U251 (10-кратное ингибирование пролиферации клеток по сравнению с контролем, табл. 1).

Значительное ингибирование роста обеих клеточных линий вызывали этилацетатные экстракты из трехнедельного фильтрата культур гриба на ДМГ и СС: рост клеток линии А549 подавлялся на уровне 41–48% от контроля, линии U251 – 18–22%. Клетки линии U251 были чувствительны (при мерно 4-кратное ингибирование роста по сравнению с контролем) также к действию экстракта, полученного с использованием хлористого метилена, из двухнедельной культуры и этилацетатному экстракту из трехнедельной культуры гриба на СС. Примерно в 2 раза меньшую степень пролиферации клеток U251 по сравнению с контролем наблюдали при воздействии экстракта двухнедельных культур *S. cirsii* S-47 на ДМГ и ЧАВ, полученного при использовании хлористого метилена (табл. 2).

**Антиэстеразная активность.** Все изученные экстракты, показали высокую ингибирующую активность (9–32% относительно контроля) в отношении КЭ, тогда как активность БХЭ сокращение на уровне более чем 50% подавлял лишь хлористометиленовый экстракт из двухнедельной культуры *S. cirsii* S-47 на среде ЧАВ. Максимальной ингибирующей активностью (активность снижалась более чем в 10 раз по сравнению с контролем) в отношении КЭ обладал такой же экстракт двухнедельной культуры гриба на ЧАВ (табл. 3).

Экстракты из твердофазных культур *S. cirsii* S-47, а также экстракты из фильтрата жидких культур гриба на среде СС проявили в целом селективную, но относительно невысокую токсичность в отношении осота (диаметр некроза 3–4 мм), тогда как экстракты из фильтрата культур на ДМГ и ЧАВ были высоко токсичными как для листьев осота, так и пырея (табл. 1, 3). Это предположительно связано с наличием и различным содержанием в них селективного фитотоксина стагонолида Н и неселективного – стагонолида А [23, 26].

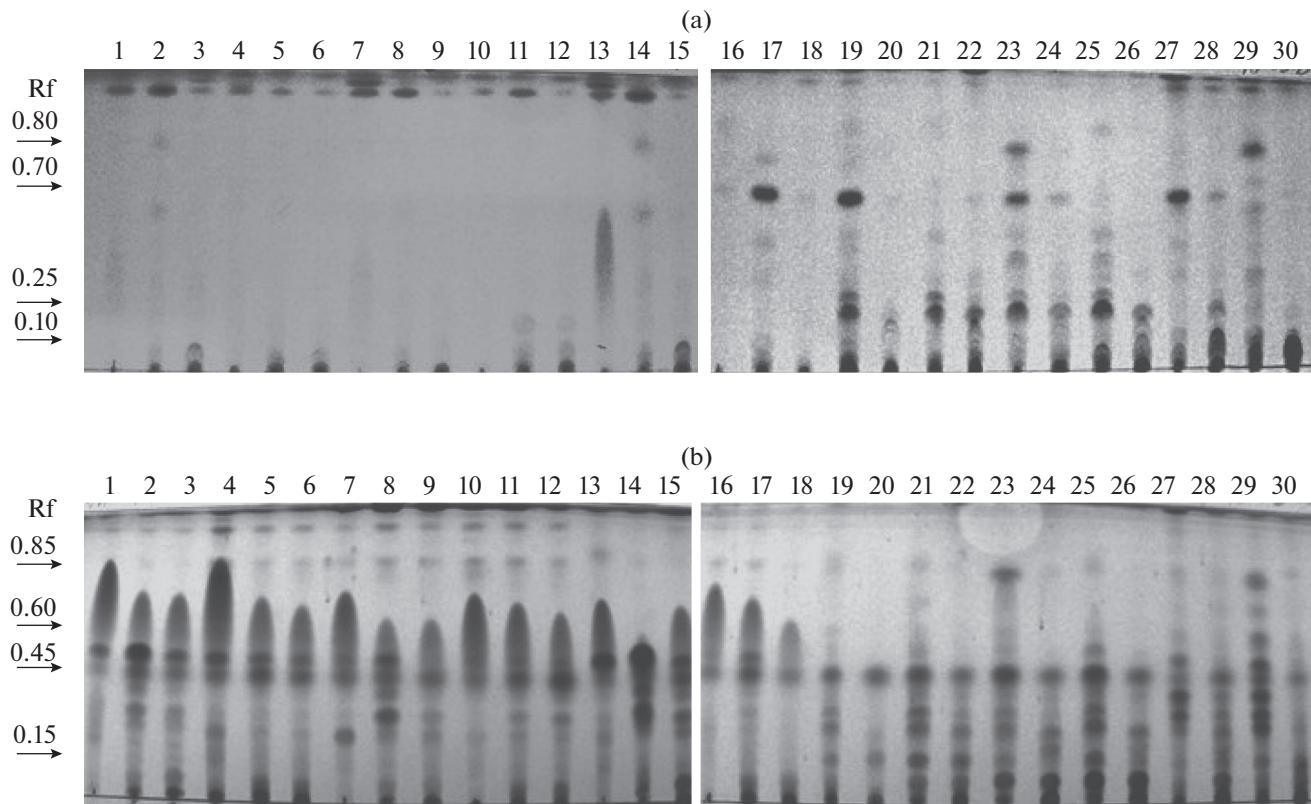
Корреляции между фитотоксической и цитотоксической или антиэстеразной активностью экстрактов не обнаружили. Цитотоксичность ноненолидов, в том числе и выявленных у *S. cirsii*,

изучена недостаточно. Как правило, они демонстрируют слабую токсичность для клеточных культур [34, 40]. Необходимо также отметить антиэстеразную активность экстрактов *S. cirsii*. Часто ее связывают с иммунносупрессивными свойствами, а также с потенциальной инсектицидной активностью. У метаболитов фитопатогенных грибов антиэстеразная активность изучена слабо. Известно лишь, что экстракты некоторых грибов из рода *Alternaria* способны ингибировать активность ацетилхолин- и бутирилхолинэстераз [41]. Ингибиторы этих ферментов могут быть использованы для лечения болезни Альцгеймера, увеличения стабильности лекарств и инсектицидов, подвергающихся быстрому расщеплению эстеразами [42–44]. Ингибирующая активность ноненолидов в отношении этих ферментов не изучена. Известно, что гербарумин I обладал сильной ингибирующей способностью в отношении кальмодулин-зависимой фосфодиэстеразы цАМФ на уровне известного ингибитора кальмодулина – хлорпромазина [45].

**Хроматографические профили экстрактов.** Проявление хроматограмм, полученных при разделении экстрактов с помощью ТСХ в системе гексан–этилацетат 1 : 1, реагентом на основе серной кислоты позволило выявить значительно больше соединений (от 3 до 11), чем при их детектировании в УФ-свете при  $\lambda$  254 нм (от 1 до 7). При этом, обнаружены заметные различия в качественном составе метаболитных комплексов, выделенных из жидких сред и зерновых субстратов (рис. 1). В экстрактах из твердофазных культур гриба преvalировали алифатические соединения, не поглощающие или слабо поглощающие при  $\lambda$  254 нм. В экстрактах гриба из фильтрата культуральной жидкости обнаруживались мажорные вещества с  $R_f$  0.1, 0.25, 0.7 и 0.8 хорошо поглощающие УФ-свет

Соединение, проявляемое реагентом в виде синего пятна в диапазоне  $R_f$  от 0.5 до 0.75, наблюдали только в экстрактах из твердофазных культур гриба. Вещество с  $R_f$  0.45, окрашенное реагентом в оливковый цвет, присутствовало в экстрактах из культур, полученных как на жидких, так и на твердых субстратах, тогда как соединение с  $R_f$  0.5 – образовывалось грибом преимущественно на твердых субстратах. Полосы с  $R_f$  0.25 и 0.30, окрашенные в оливковый, коричневый, красноватый цвет, обнаружены в хлористометиленовых экстрактах из твердофазных культур сред и из фильтрата культуры на среде ЧАВ. Вещество с  $R_f$  0.15 (фиолетовая окраска реагентом) обнаружено в экстрактах из жидких культур. Более активное его образование наблюдалось при культивировании гриба на средах ДМГ и СС (рис. 1).

При проведении ВЭЖХ экстрактов из культур *S. cirsii* S-47 выявлено более 30 индивидуальных пиков, характеризующихся определенным временем



**Рис. 1.** ТСХ-хроматограммы экстрактов из жидкого- и твердофазной культур гриба *S. cirsii* S-47: а – проявление реагентом на основе серной кислоты и анисового альдегида, б – проявление УФ-светом при 254 нм. Описание “дорожек” (1–30) приведено в табл. 1 и 2. Стрелки указывают обсуждаемые в тексте мажорные полосы.

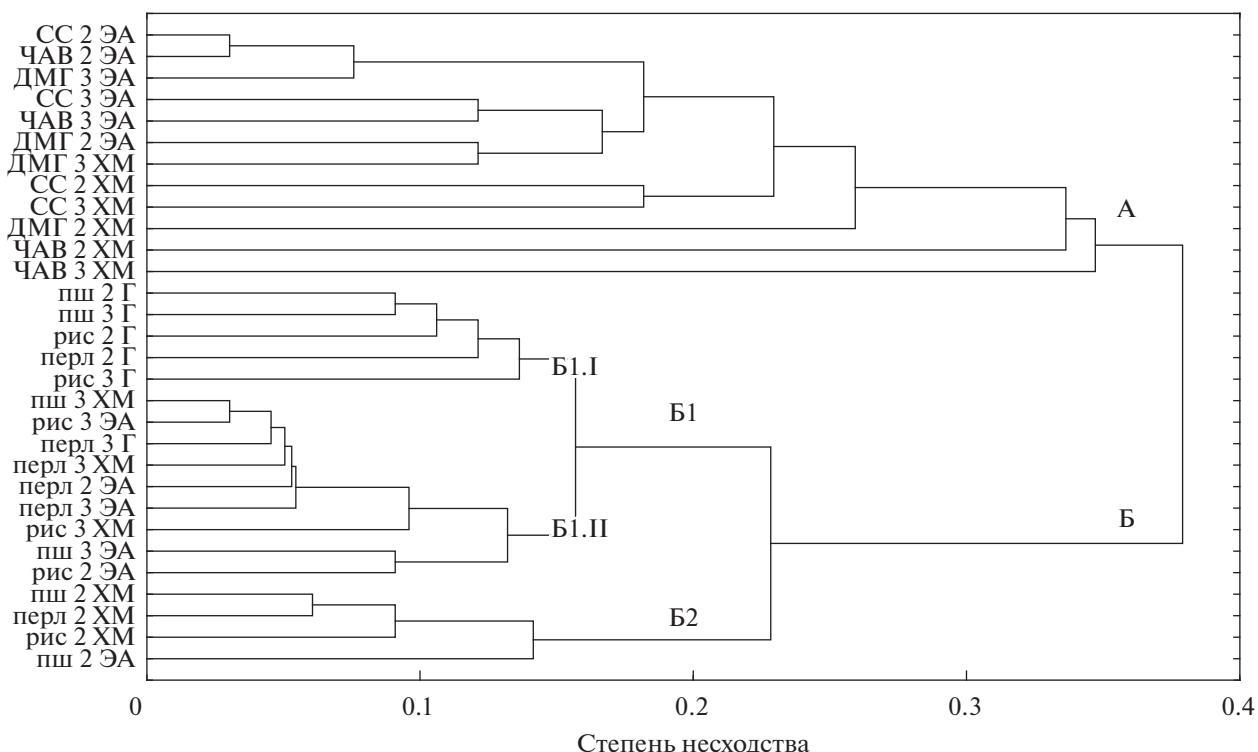
удерживания и УФ-спектром. Максимальное количество мажорных метаболитов обнаружено в гексановом экстракте из двухнедельной культуры на пшенице (14 пиков) и в этилацетатном экстракте из трехнедельной культуры гриба на среде ЧАВ (12 пиков). Типичные ВЭЖХ-хроматограммы экстрактов, проявивших заметную биологическую активность, представлены на рис. 3 и 4.

В результате кластерного анализа состава экстрактов они разделились на 2 основных ветви, различающиеся по способу культивирования *S. cirsii* S-47. Внутри кластера А, в который вошли экстракты, полученные из культурального фильтрата, необходимо отметить различия метаболитов в экстрактах, полученных с использованием этилацетата и хлористого метиленса. Кластер Б составили экстракты, полученные из твердофазных культур гриба, вне зависимости от сроков культивирования и экстрагента. Субкластер Б1 можно разделить на два подкластера: Б1.І – гексановые экстракты, полученные при культивировании гриба на твердых субстратах (преимущественно на пшеничной и рисовой крупах); Б1.ІІ – преимущественно хлористометиленовые и этилацетатные экстракты, полученные при культивировании гриба на разных твердых субстратах. В субкластер Б2

вошли преимущественно хлористометиленовые экстракты из двухнедельной твердофазной культуры *S. cirsii* вне зависимости от состава субстрата (рис. 2).

В гексановом экстракте из трехнедельной культуры *S. cirsii* S-47 на пшенице с широким спектром биологической активности (фитотоксической, антибактериальной и антиэстеразной) обнаружен гербарумин I ( $t_R$  3.14 мин). Интересны два неизвестных соединения ( $t_R$  4.38 мин и  $t_R$  4.55 мин) со сложными УФ-спектрами ( $\lambda_{\text{макс}}$  238, 265, 297, 389 нм и  $\lambda_{\text{макс}}$  233, 256, 300, 363 нм), которые еще не описаны у *S. cirsii* (рис. 3а). В этилацетатном экстракте также с высоким уровнем биологической активности преобладали среднеполярные и полярные соединения: в нем обнаружены стагонолид Н, гербарумин I и стагонолид А (рис. 3б).

В гексановом экстракте из трехнедельной культуры на рисе, который проявил заметную антиэстеразную активность в отношении КЭ и цитотоксическую активность в отношении обеих изученных клеточных линий, ранее идентифицированные токсичные метаболиты гриба не обнаружены. Обращает внимание присутствие неизвестных веществ с  $t_R$  4.89 мин и 4.99 мин (у



**Рис. 2.** Дендрограмма различий в составе экстрактов *S. cirsii* S-47 в зависимости от питательного субстрата, продолжительности культивирования и экстрагента. Г – гексан, ХМ – хлористый метилен, ЭА – этилацетат; пш – пшено, рис – рисовая крупа, перл. – перловая крупа; 2, 3 – продолжительность культивирования, нед.

обоих УФ  $\lambda_{\text{макс}} 230 \text{ нм}$ ), а также неполярных ( $t_R > 4.5 \text{ мин}$ ) алифатических соединений ( $\lambda_{\text{макс}} < 200 \text{ нм}$ ) (рис. 3в).

В экстракте, полученным хлористым метиленом, из фильтрата 2 недельной культуры *S. cirsii* S-47 на ДМГ, продемонстрировавшем высокую антиэстеразную активность и средний уровень антибиотической и фитотоксической активности, обнаружены следовые количества гербарумина I. Основными метаболитами экстракта были неизвестные вещества с  $t_R 2.60 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} < 215, 266–287 \text{ нм}$ ) и  $t_R 2.86 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} 271 \text{ нм}$ ) (рис. 4а). В этилацетатном экстракте, проявившем высокую цитотоксическую активность, обнаружен метаболит с  $t_R 3.1 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} 252, 311 \text{ нм}$ ).

В экстракте, полученным хлористым метиленом, 3-недельной культуры *S. cirsii* S-47 на среде ЧАВ мажорными метаболитами были стагонолид Н и стагонолид А, что, очевидно, обусловливало его высокую antimикробную и фитотоксическую активность. В экстракте присутствовали также и неизвестные вещества с  $t_R 2.38 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} < 200, 256 \text{ нм}$ ),  $t_R 2.67 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} 228 \text{ нм}$ ),  $t_R 2.56 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} 270 \text{ нм}$ ),  $t_R 3.47 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} 291 \text{ нм}$ ) (рис. 4б).

В показавшем высокую антибактериальную активность экстракте, полученным хлористым метиленом из фильтрата 2-недельной культуры

гриба на среде СС, преобладали стагонолид А и два неизвестных вещества с  $t_R 2.86 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} 271 \text{ нм}$ ) и  $t_R 3.46 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} 291 \text{ нм}$ ). (рис. 4в) Этилацетатный экстракт из этой же культуры со средним уровнем фитотоксической активности и высоким – цитотоксической и антиэстеразной, содержал стагонолид Н, гербарумин I, а также неизвестные соединения:  $t_R 2.52 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} < 200 \text{ нм}$ ),  $t_R 2.86 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} 271 \text{ нм}$ ),  $t_R 3.18 \text{ мин}$  ( $\lambda_{\text{макс}} 252, 312 \text{ нм}$ ).

С помощью ТСХ были показаны прежде всего, существенные различия в компонентном составе экстрактов из твердо- и жидкофазных культур *S. cirsii* S-47, а также менее существенные, но хорошо детектируемые различия экстрактов из культурального фильтрата (рис. 1). Сравнительное изучение ВЭЖХ-профилей экстрактов и УФ-спектров с использованием стандартов фитотоксинов (стагонолида А, стагонолида Н и гербарумина I) показало, что выделенный из осота полевого штамма *S. cirsii* S-47, образует те же основные фитотоксические метаболиты (стагонолид А и стагонолид Н), что и штамм С-163, изолированный из листьев бодяка. Гербарумин I выявлен у этого гриба впервые. Кластерный анализ ВЭЖХ/УФ-профилей экстрактов позволил подтвердить существенные качественные различия в их компо-

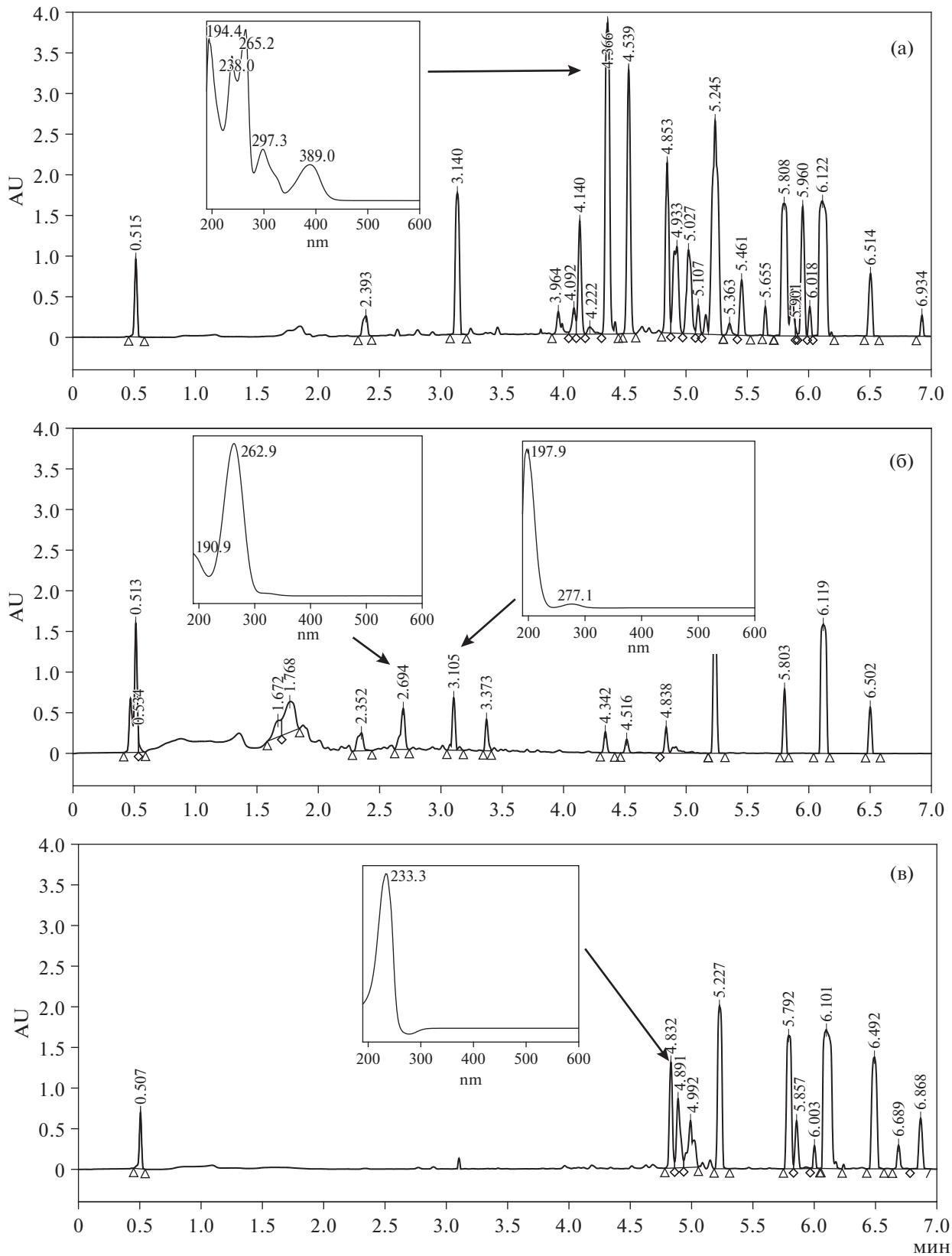
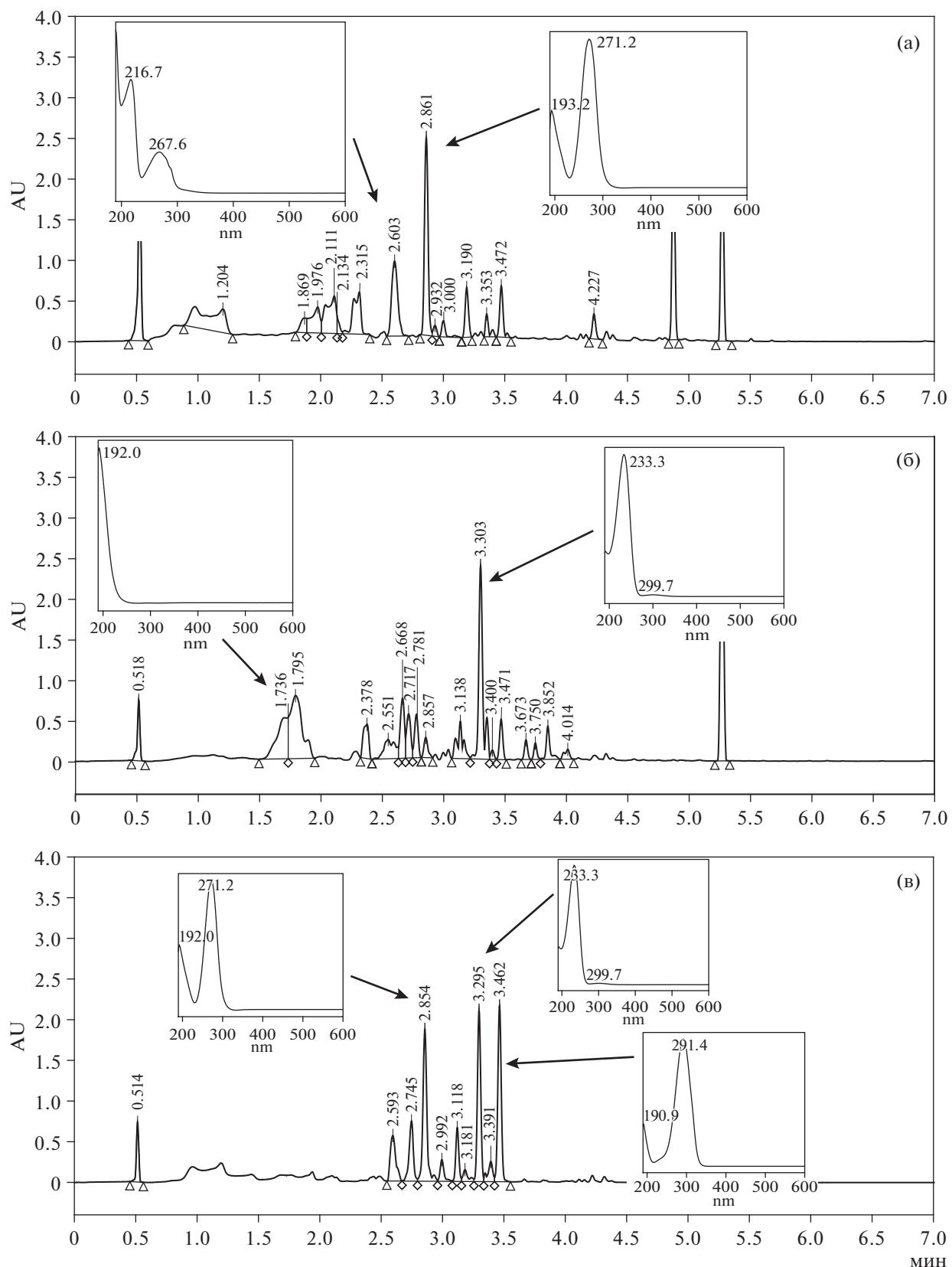


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограммы экстрактов, полученных из трехнедельных твердофазных культур *S. cirsii* S-47: а – гексановый экстракт из культуры, выросшей на среде с пшеницей; б – этилацетатный экстракт из той же культуры; в – гексановый экстракт из культуры на рисе. Пики с t<sub>R</sub> 4.8 и 5.2 мин - из растворителя. На врезках приведены УФ-спектры характерных мажорных метаболитов.



**Рис. 4.** ВЭЖХ-хроматограммы экстрактов (хлористый метилен), полученных из культурального фильтрата *S. cirsii* S-47: а – экстракт из 2-недельной культуры на ДМГ; б – экстракт из 3-недельной культуры на среде Чапека с витаминами; в – экстракт из 2-недельной культуры на среде СС. Пики с  $t_R$  4.8 и 5.2 из растворителя.

нентом составе в зависимости от состава питательного субстрата и экстрагента.

Таким образом, в большинстве случаев биологическая активность экстрактов была обусловлена присутствием в них известных токсинов, однако в некоторых экстрактах, проявивших активность, их содержание было незначительным либо они отсутствовали. Следовательно, биологическая активность экстрактов может быть обусловлена и другими их компонентами. Так, практически во всех изученных экстрактах гриба выявлены соединения, ранее не описанные для *S. cirsii*. В целом следует отметить содержание в экстрактах из твердофазных культур неизученных пигментов, а в экстрактах из культурального фильтрата веществ с  $\lambda_{\text{макс}}$  при 260, 270 и 290 нм. Их дальнейшее изучение представляется важным с точки зрения более полной характеристики БАВ продукта потенциального микогербицида на основе *S. cirsii* S-47: выявления факторов его вирулентности и для токсикологической оценки.

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 16-16-00085).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Берестецкий А.О. // Вестник защиты растений. 2017. Т. 91. № 1. С. 5–12.
2. Берестецкий А.О. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 5. С. 501–514.
3. Ahmed N.E., Sugimoto Y., Babiker A.G.T., Mohamed O.E., Ma Y., Inanaga S., Nakajima H. // Weed Sci. 2001. V. 49. № 3. P. 354–358.
4. Abouzeid M.A., Boari A., Zonno M.C., Vurro M., Evidente A. // Weed Sci. 2004. V. 52. № 3. P. 326–332.
5. Anderson K.I., Hallett S.G. // Weed Sci. 2004. V. 52. № 4. P. 623–627.
6. Hoagland R.E., Weaver M.A., Boyette C.D. // Allelopathy J. 2007. V. 19. № 1. P. 179–192.
7. Lee H.B., Kim J.-C., Hong K.-S., Kim C.-J. // Plant Pathol. J. 2008. V. 24. № 4. P. 453–460.
8. Nzjoki H.S., Oyosi F., Morris C.E., Kaya E., Pilgeram A.L., Baker C.S., Sands D. // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1121.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01121>
9. Fumagalli P., Andolfi A., Avolio F., Boari A., Cimmino A., Finizio A. // Pest Manag. Sci. 2013. V. 69. № 7. P. 850–856.
10. Favilla M., Macchia L., Gallo A., Altomare C. // Food Chem. Toxicol. 2006 V. 44. № 11. P. 1922–1931.
11. Skrobek A., Boss D., Défago G., Butt T.M., Maurhofer M. // Toxicol. Lett. 2006. V. 161. № 1. P. 43–52.
12. Boss D., Maurhofer M., Schläpfer E., Défago G. // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 59. № 1. P. 194–205.
13. Kouvelis V.N., Wang C., Skrobek A., Pappas K.M., Typas M.A., Butt T.M. // Mutat. Res. 2011. V. 722. № 1. P. 1–6.
14. Berestetskiy A.O., Ivanova A.N., Petrova M.O., Prokof'eva D.S., Stepanycheva E.A., Uspanov A.M., Lednev G.R. // Microbiol. 2018. V. 87. № 2. P. 200–214.
15. Deising H.B., Gase I., Kubo Y. // J. Plant Dis. Prot. 2007. V. 124.  
<https://doi.org/10.1007/s41348-017-0109-5>
16. Evidente A., Berestetskiy A., Cimmino A., Tuzi A., Superti S., Melck D., Andolfi A. // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. № 23. P. 11168–11173.
17. Andolfi A., Cimmino A., Vurro M., Berestetskiy A., Troise C., Zonno M.C., Motta A., Evidente A. // Phytochem. 2012. V. 79. P. 102–108.
18. Sørensen J.L., Sondergaard T.E. // Int. J. Food Mirobiol. 2014. V. 170. P. 55–60.
19. Shi W., Tan Y., Wang S., Gardiner D.M., De Saeger S., Liao Y., Wang C., Fan Y., Wang Z., Wu A. // Toxins. 2017. V. 9.  
<https://doi.org/10.3390/toxins9010006>
20. Патент РФ. 2014. № 2515899.
21. Патент РФ. 2015. № 2543665.
22. Артохин К.С. Сорные растения. М.: Печатный город, 2007. 166 с.
23. Yuzikhin O., Mitina G., Berestetskiy A. // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. № 19. P. 7707–7711.
24. Rivero-Cruz J.F., García-Aguirre G., Cerda-García-Rojas C., Mata R. // Tetrahedron. 2000. V. 56. № 30. P. 5337–5344.
25. Evidente A., Cimmino A., Berestetskiy A., Mitina G., Andolfi A., Motta A. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. P. 31–34.
26. Evidente A., Cimmino A., Berestetskiy A., Andolfi A., Motta A. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. № 11. P. 1897–1901.
27. Greve H., Schupp P.J., Eguereva E., Kehraus S., König G.M. // J. Nat. Prod. 2008. V. 71. № 9. P. 1651–1653.
28. Zheng C.-J., Shao C.-L., Chen M., Niu Z.-G., Zhao D.-L., Wang C.-Y. // Chem. Biodiversity. 2015. V. 12. № 9. P. 1407–1414.
29. Tsuda M., Mugishima T., Komatsu K., Sone T., Tanaka M., Mikami Y., Kobayashi J. // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. № 3. P. 412–415.
30. Trisuwan K., Rukachaisirikul V., Phongpaichit S., Preedanon S., Sakayaroj J. // Arch. Pharm. Res. 2011. V. 34. № 5. P. 709–714.
31. Bhilabutra W., Techowisan T., Peberdy J.F., Lumyong S. // Res. J. Microbiol. 2007. V. 2. № 10. P. 749–755.
32. Perepogu A.K., Raman D., Murty U.S.N., Rao V.J. // Bioorg. Chem. 2009. V. 37. № 1. P. 46–51.
33. Jangili P., Kashanna J., Kumar C.G., Poornachandra Y., Das B. // Bioorganic Med. Chem. Lett. 2014. V. 24. № 1. P. 325–327.
34. Sun P., Lu S., Ree T.V., Krohn K., Li L., Zhang W. // Curr. Med. Chem. 2012. V. 19. № 20. P. 3417–3455.
35. Liu Q.-A., Zheng J.-J., Gu Y.-C., Wang C.-Y., Shao C.-L. // Studies in Natural Products Chemistry. 2015. V. 44. P. 353–401.
36. Берестецкий А.О., Юзихин О.С., Каткова А.С., Добродумов А.В., Сивогризов Д.Е., Коломбет Л.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 1. С. 84–88.

37. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. // Biochem. Pharmacol. 1961. V. 7. № 1. P. 88–95.
38. Yang Z.P., Dettbarn W.D. // Biochem. Pharmacol. 1998. V. 55. № 8. P. 1419–1426.
39. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
40. Sudhakar C., Reddy P.R., Kumar C.G., Sujitha P., Das B. // Eur. J. Org. Chem. 2012. V. 2012. № 6. P. 1253–1258.
41. Singh B., Bhagat J., Chadha B.S., Kaur A. // Biologia. 2014. V. 69. № 1. P. 10–14.
42. Grossberg G.T. // Curr. Ther. Res. Clin. Exp. 2003. V. 64. № 4. P. 216–235.
43. Koitka M., Höchel J., Gieschen H., Borchert H.H. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2010. V. 51. № 3. P. 664–678.
44. Čolović M.B., Krstić D.Z., Lazarević-Pašti T.D., Bondžić A.M., Vasić V.M. // Curr. Neuropharmacol. 2013. V. 11. № 3. P. 315–335.
45. Rivero-Cruz J.F., Macías M., Cerdá-García-Rojas C.M., Mata R. // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. № 4. P. 511–514.

## Effects of Substrate and Duration of Cultivation on Productivity, Biological Activity, and Chromatography Profiles of Extracts Obtained from *Stagonospora cirsii* S-47

A. O. Berestetskiy<sup>a,\*</sup>, M. Yu. Belozyorova<sup>a</sup>, and D. S. Prokof'eva<sup>b</sup>

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

<sup>b</sup>Research Institute for Hygiene, Occupational Pathology, and Human Ecology, Leningrad region, Kuz'molovskiy, 188663 Russia

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

Received February 27, 2019; revised August 01, 2019; accepted August 30, 2019

In order to determine possible toxic properties of the potential mycoherbicide based on the fungus, *Stagonospora cirsii* S-47 effects of solid and liquid media composition on yield of extractive matter (YEM), spectrum of biological activity and chromatography profiles of extracts obtained from cultures of this fungus were studied. Maximal YEM (~250 mg/L) was obtained from filtrates taken from 2-week culture of *S. cirsii* S-47 grown on sucrose-soy meal medium. The same time was optimal for production of maximal YEM (~1.5 g/kg) when the fungus was grown on pearl barley substrate. The fungal extracts showed phytotoxic, antimicrobial, cytotoxic and anti-esterase activity. Generally, extracts from culture filtrates demonstrated higher level and wider spectrum of biological activity than extracts from solid culture of *S. cirsii* S-47. Maximal phytotoxic and antimicrobial activity was found in dichloromethane extracts from the filtrate of the 3-week fungal culture on Czapek medium while the extracts from 2-week culture strongly inhibited carboxyl esterase. Maximal cytotoxic activity against cell line U251 was found in ethyl acetate extract from 3-week culture of *S. cirsii* S-47 produced on YMg liquid medium. The composition of extracts was varied considerably depending on culture substrate.

**Keywords:** *Stagonospora cirsii*, extracts, phytotoxicity, antimicrobial activity, cytotoxicity, anti-esterase activity, stagonolide, herbarumin I, mycoherbicide