

Оригинальная статья / Original article

УДК 632.91

DOI: 10.18470/1992-1098-2022-4-101-110

Изучение роли микроэлементов для синтеза антигрибных метаболитов штамма бактерии-антагониста *Bacillus velezensis*

Наталья С. Томашевич¹, Татьяна М. Сидорова¹, Ольга И. Киселева²,
Илья Ю. Курбатов², Валерия В. Аллахвердян¹, Анжела М. Асатурова¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный центр биологической защиты растений», Краснодар, Россия

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия

Контактное лицо

Наталья С. Томашевич, к.с.-х.н., с.н.с.
лаборатории микробиологической защиты
растений, ФГБНУ ФНЦБЗР; 350039 Россия,
г. Краснодар, п/о-39.

Тел. +79280388165

Email tom-s2@yandex.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7297-5929>

Формат цитирования

Томашевич Н.С., Сидорова Т.М., Киселева О.И.,
Курбатов И.Ю., Аллахвердян В.В., Асатурова А.М.
Изучение роли микроэлементов для синтеза
антигрибных метаболитов штамма бактерии-
антагониста *Bacillus velezensis* // Юг России:
экология, развитие. 2022. Т.17, N 4. С. 101-110.
DOI: 10.18470/1992-1098-2022-4-101-110

Получена 21 августа 2022 г.

Прошла рецензирование 29 сентября 2022 г.

Принята 25 октября 2022 г.

Резюме

Цель. Изучить состав экзометаболизма бактерий штамма *Bacillus velezensis* BZR336g с применением с применением двумерной газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (GC×GC-MS) метода при культивировании на питательных средах, различающихся по содержанию микроэлементов.

Материалы и методы. Объект исследования – штамм бактерии *B. velezensis* BZR 336g. Он является перспективным для разработки на его основе биопрепарата для защиты растений от фитопатогенных грибов. Из жидкой культуры выделяли экзометаболиты и анализировали из метаболомный профиль методом GC×GC-MS.

Результаты. Среди идентифицированных соединений можно увидеть предшественники биологически активных метаболитов бактерий штамма *B. velezensis* BZR336g. Анализ суммарного накопления жирных кислот и их аналогов, а также аминокислот и пептидов бактериями *B. velezensis* BZR336g на питательных средах, различающихся по содержанию ионов металлов, показывает, что ионы Co^{2+} в сочетании с ионами Mn^{2+} и Zn^{2+} играют важную роль в индуцировании их синтеза. На синтез пептидных составляющих наибольшее влияние оказывает присутствие в питательной среде иона Co^{2+} . Если убрать его из питательной среды, количество пептидов, аминокислот и пептидов уменьшается почти в два раза. Соединения бензольной природы могут выступать в роли прекурсоров ароматических углеводов, которые также представляют интерес при анализе метаболизма бактерий, так как они обладают антимикробной активностью.

Заключение. Количество соединений, которые являются прекурсорами метаболитов липопептидной природы, зависит от содержания ионов металлов в питательной среде. Этот факт может изменяться в зависимости от того, в какой комбинации присутствуют металлы.

Ключевые слова

Экзометаболиты, *Bacillus velezensis*, антигрибные липопептиды, газовая хроматография-масс-спектрометрия, метаболомный профиль.

Determining the role of microelements for the synthesis of antifungal metabolites of the antagonistic *Bacillus velezensis* strain

Natalia S. Tomashevich¹, Tatiana M. Sidorova¹, Olga I. Kiseleva², Ilya Yu. Kurbatov², Valeria V. Allahverdyan¹ and Anzhela M. Asaturova¹

¹Federal Research Centre of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russia

²Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

Principal contact

Natalia S. Tomashevich, Ph D (Agriculture), Senior Researcher, Microbiological Plant Protection Laboratory, Federal Research Centre of Biological Plant Protection; p/o-39 Krasnodar, Russia 350039
Tel. +79280388165

Email tom-s2@yandex.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-7297-5929>

How to cite this article

Tomashevich N.S., Sidorova T.M., Kiseleva O.I., Kurbatov I.Yu., Allahverdyan V.V., Asaturova A.M. Determining the role of microelements for the synthesis of antifungal metabolites of the antagonistic *Bacillus velezensis* strain. *South of Russia: ecology, development*. 2022, vol. 17, no. 4, pp. 101-110. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2022-4-101-110

Received 21 August 2022

Revised 29 September 2022

Accepted 25 October 2022

Abstract

Aim. To study the structure of bacteria exometabolites of the *Bacillus velezensis* BZR336g strain using the GC×GC-MS method when cultivated on nutrient media differing in the content of microelements.

Material and Methods. The object of the study is the *B. velezensis* BZR336g bacterium strain. It shows promise for the development of a biopreparation on its basis for protecting plants against phytopathogenic fungi. Exometabolites were isolated from the liquid culture and their metabolomic profile was analysed with the GC×GC-MS method using a LECO Pegasus BT-4D device.

Results. Among the identified compounds one can see the precursors of biologically active metabolites of bacteria of the strain *B. velezensis* BZR336g. Analysis of the total accumulation of fatty acids and their analogs, as well as of amino acids and peptides, by *B. velezensis* BZR336g bacteria on nutrient media differing in the content of metal ions, shows that Co²⁺ ions in combination with Mn²⁺ and Zn²⁺ ions play an important role in inducing their synthesis. The presence of the Co²⁺ ion in the nutrient medium has the greatest influence on the synthesis of peptide components. If it is removed from the nutrient medium, the amount of amino acids and peptides decreases by almost two times. Benzene compounds can act as precursors of aromatic hydrocarbons, which are also of interest in the analysis of bacterial metabolism, since they have antimicrobial activity.

Conclusions. The number of compounds that are precursors of lipopeptide metabolites depends on the content of metal ions in the nutrient medium. This fact may vary depending on the combination in which the metals are present.

Key Words

Exometabolites, *Bacillus velezensis*, antifungal lipopeptides, gas chromatography-mass spectrometry, metabolomic profile.

ВВЕДЕНИЕ

Применение полезных микроорганизмов в качестве агентов биоконтроля считается одним из наиболее перспективных методов эффективной и безопасной защиты растений. Род *Bacillus* включает некоторые из наиболее коммерчески важных бактерий, используемых для производства широкого спектра промышленных ферментов и микробиологических препаратов. Все чаще эти бактерии используют в качестве противогрибных средств биоконтроля [1; 2]. С биотехнологической точки зрения многие штаммы различных видов в пределах рода *Bacillus* продуцируют широкий спектр биоактивных пептидов и других структурно различных антагонистических веществ. Такие виды как *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. pumilus*, являются очень эффективными продуцентами молекул антибиотиков, и их ингибирующая активность против патогенов растений посредством прямого антибиоза является наиболее известным механизмом. Среди указанных выше антибиотиков особый интерес представляют липопептиды бацилл. Благодаря особенностям строения эти соединения амфифильны и устойчивы к гидролизу пептидазами и протеазами, а также нечувствительны к окислению, действию относительно высоких температур. Вместе с тем, их цистеиновые остатки могут окисляться до сульфидов и изменять структуру до характерных внутримолекулярных C–S-связей [3]. Циклические липопептидные соединения с тремя основными семействами итируина, сурфактина и фенгицина, а в последнее время также с представителями семейства курстакинов, являются хорошо известными соединениями с однозначными доказательствами в качестве ключевых факторов в биоконтроле [4].

Синтезом метаболитов бактерий можно управлять путем изменения условий культивирования, способствующих активации генов, ответственных за набор ферментов, необходимых для синтеза того или иного метаболита. Эффективным подходом для раскрытия метаболического потенциала, а также для активации «молчащих» генов является изменение состава макро- и микроэлементов (МЭ) питательной среды. Уровни индукции, подавления или даже ингибирования зависят от различных типов и количества металлов в питательной среде. Были опубликованы многочисленные сообщения о важности ионов металлов в биосинтезе метаболитов, особенно антибиотиков [5]. У некоторых актиномицетов было замечено, что использование металлов в технологии культивирования вызывает изменение биосинтетических метаболических путей, приводящих к формированию новых метаболитов, которые не образуются в изолятах дикого типа при нормальных условиях роста. Кроме того, синтез различных веществ усиливается, когда определенные металлические МЭ добавляются в питательную среду штаммов микроорганизмов, устойчивых к тяжелым металлам [5]. Их важность также подчеркивается тем, что почти 30% всех биосинтетических ферментов микроорганизмов взаимодействуют с металлическим кофактором.

Некоторые металлы с окислительно-восстановительными функциями, такие как Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Ni, Mo и Mg, являются ключевыми факторами для многих микробных ферментов, участвующих в путях

биосинтеза метаболитов. Ионы марганца (Mn^{2+}) представляют большую значимость для питания микроорганизмов и, как было установлено, специфически участвуют в различных клеточных процессах, в том числе, в обмене веществ. Очевидно, что Mn^{2+} является важным регуляторным ионом микроорганизмов и играет значительную роль в биосинтезе предшественников липопептидных метаболитов, таких как жирные кислоты и липиды. Добавление в питательную среду Mn^{2+} (0,01 мМ) повысило продукцию сурфактина от 0,33 до 2,6 г/л [6]. Цинк (Zn) является важным металлом и, как сообщалось, участвует в различных биохимических реакциях, выполняя каталитические, структурные, окислительно-восстановительные и регуляторные функции. Как и в случае с железом, цинк играет решающую роль в формировании структурных элементов, стабилизации белковых складок микроорганизмов и, что наиболее важно, в регулировании функций различных метаболических ферментов в форме кофакторов и коактиваторов, участвующих в реакциях биосинтеза. Кобальт (Co) является важным металлом, поскольку он действует как кофактор для витамин B12-зависимых ферментов. Роль кобальта в продуцировании метаболитов была хорошо продемонстрирована у различных микроорганизмов, и есть несколько сообщений о регуляции продуцирования антибиотиков у актиномицетов.

Газовая хроматография-масс-спектрометрия (GC×GC-MS), являясь высокочувствительной и высокопроизводительной аналитической платформой, зарекомендовала себя как полезный инструмент для нецелевых исследований первичного метаболизма в различных областях применения [7]. Результаты анализа состава промежуточных соединений, полученных в ходе метаболизма бактерий, дают возможность сделать заключение о синтезе структур, обладающих биологической активностью.

Метаболомное исследование с применением метода GC×GC-MS представляет собой многоступенчатую процедуру. В связи с этим, стандартизация нецелевого протокола метаболомного профилирования методом GC×GC-MS требует комплексной оптимизации преаналитических, аналитических и вычислительных этапов. Основным отличием технологии GC×GC-MS от других аналитических платформ метаболомики, включая жидкостную хроматографию в тандеме с масс-спектрометрией (LC-MS), является необходимость дериватизации экстрактов метаболитов в летучие и термически стабильные производные, причем последние количественно определяются в метаболомных профилях. Этот аналитический этап требует особой тщательности при оптимизации нецелевого экспериментального протокола исследования метаболома методом GC×GC-MS. Более того, для надежной идентификации и первичной количественной оценки обнаруженных метаболитов необходимо применять специализированные методики процессирования экспериментальных данных [7]. Данный метод позволяет селективно и с высокой чувствительностью обнаруживать и определять различные типы низкомолекулярных соединений в пробах сложного состава.

Цель исследования – с применением GC×GC-MS метода изучить структуру экзометаболитов бактерий штамма *B. velezensis* BZR336g при культивировании на питательных средах, различающихся по содержанию МЭ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – оригинальный штамм бактерии *B. velezensis* BZR 336g из Биоресурсной коллекции Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр биологической защиты растений» (ФГБНУ ФНЦБЗР) «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов» и перспективный для разработки на его основе биопрепарата для защиты растений от фитопатогенных грибов [8].

Культивирование штамма бактерии проводили на оптимизированной питательной среде (ОПС) с добавлением комплекса МЭ [9] и ОПС с добавлением комплекса МЭ с поочередным исключением целевых ионов металлов (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}). Схема эксперимента включала следующие варианты:

1 вариант – *B. velezensis* BZR 336g (ОПС All) – Опытный образец биопрепарата на основе штамма *B. velezensis* BZR 336g, культивируемый на ОПС с добавлением комплекса МЭ (Cu^{2+} ; I^- ; Mn^{2+} ; Mo^{6+} ; B^{3+} ; Co^{2+} ; Zn^{2+} ; Fe^{2+});

2 вариант – *B. velezensis* BZR 336g (ОПС без Mn^{2+}) – Опытный образец биопрепарата на основе штамма *B. velezensis* BZR 336g, культивируемый на ОПС с добавлением комплекса МЭ за исключением Mn^{2+} (Cu^{2+} ; I^- ; Mo^{6+} ; B^{3+} ; Co^{2+} ; Zn^{2+} ; Fe^{2+});

3 вариант – *B. velezensis* BZR 336g (ОПС без Zn^{2+}) – Опытный образец биопрепарата на основе штамма *B. velezensis* BZR 336g, культивируемый на ОПС с добавлением комплекса МЭ за исключением Zn^{2+} (Cu^{2+} ; I^- ; Mn^{2+} ; Mo^{6+} ; B^{3+} ; Co^{2+} ; Fe^{2+});

4 вариант – *B. velezensis* BZR 336g (ОПС без Co^{2+}) – Опытный образец биопрепарата на основе штамма *B. velezensis* BZR 336g, культивируемый на ОПС с добавлением комплекса МЭ за исключением Co^{2+} (Cu^{2+} ; I^- ; Mn^{2+} ; Mo^{6+} ; B^{3+} ; Zn^{2+} ; Fe^{2+}).

Жидкую культуру (ЖК) на основе штамма *B. velezensis* BZR 336g получали методом периодического культивирования в ротационном шейкере-инкубаторе Excella E25 (New Brunswick Scientific, США) при 180 об/мин, + 25,0°C и pH 7,0 в течение 48 часов.

Для выделения биологически активных экзометаболитов штамма *B. velezensis* BZR 336g, культивируемого на различных питательных средах, ЖК очищали от микробных компонентов центрифугированием в течение 20 мин. при 10000 об./мин. (Eppendorf AG, Германия). Повторность опыта трехкратная.

Выделение метаболитов из полученной культуральной жидкости проводили экстракцией этилацетатом (х.ч.) (2:1, об./об.) при перемешивании в ротационном шейкере-инкубаторе Excella E25 (New Brunswick Scientific, США) в течение 1ч. После разделения органической и водной части этилацетат упаривали досуха на ротационном вакуумном испарителе IKA RV 10 при температуре 40°C. Для анализа метаболомного профиля опытных образцов биопрепаратов методом GC×GC-MS использовали высушенный экстракт экзометаболитов, которые затем перерастворяли в 100 мл этилацетата (х.ч.) в течение

18 часов в шейкере-инкубаторе, поддерживая температуру 25°C.

Для того, чтобы избавиться от потенциальной контаминации сложными липидами и восками, высушенные экстракты перерастворяли в 500 мкл 50% раствора ацетонитрила, центрифугировали (13 000 g, 2 мин, 4°C), и вновь высушивали надосадочную жидкость в центрифужном испарителе Vacufuge Plus (Eppendorf AG, Германия). Для выравнивания содержаний метаболитов проводили нормировку по количеству колониеобразующих единиц.

Для проведения хромато-масс-спектрометрии экзометаболитов использовали этилацетатный экстракт (5–10 мл ЖК). К каждому высушенному досуха образцу добавляли 10 мкл раствора гидрохлорида метоксимирина в пиридине (20 мг/мл) и далее перемешивали в течение 90 мин. в термошейкере ThermoMixer C (Eppendorf AG, Германия) при температуре 30°C. В качестве внутренних стандартов использовали смесь метиловых эфиров жирных кислот. После добавления силилирующего агента MSTFA и внутреннего стандарта к исследуемым образцам, пробирки с реакционной смесью перемешивали в течение 30 мин. в термошейкере при температуре 37°C, переносили в инактивированные стеклянные вставки и направляли на хромато-масс-спектрометрический анализ.

Непосредственно после высушивания образцы подвергали дериватизации.

Для метаболомного профилирования использовали прибор LECO Pegasus BT-4D (LECO, США). Конфигурация прибора включает двумерный газовый хроматограф Agilent 7890B, времяпролетный масс-спектрометр субноминального разрешения и магистральный пробоотборник L-PAL3. В рамках данного эксперимента использовали комбинацию низкополярной (Rxi-5MS, длина 29,69 м, внутренний диаметр 250 мкм, Restek) и среднеполярной (Rxi-17Sil MS, длина 1,95 м, внутренний диаметр 250 мкм, Restek) хроматографических колонок. Хромато-масс-спектрометр управлялся с помощью ПО ChromaTOF (v.5.51.06.0.64572, (LECO, США)). Перед экспериментом проводили процедуру калибровки с помощью стандарта перфтортрибутиламина (PFTBA, FC43).

Эксперимент проводили в двух технических повторениях для каждого образца. Образец (1 мкл) подавался в хроматограф через нагретый до 250°C инжектор в split-режиме. Стартовая температура в хроматографической печи составляла 60°C и поддерживалась в течение минуты, далее начинался температурный градиент (10°C/мин, 12 мин.). Период модуляции составлял 4 с. (горячий пульс – 1,2 секунды, холодный пульс – 0,8 секунды). Температура трансферной линии между газовым хроматографом и масс-спектрометром поддерживалась на уровне 280°C. Ионизацию элюирующихся соединений осуществляли методом электронного удара (EI, 70 eV). Выдерживали 350-секундная отсрочка в записи GC×GC-MS файла для выхода неинформативных соединений (силилирующие агенты, пиридин) из хроматографической колонки.

Полученные хромато-масс-спектрометрические данные также обрабатывали в программе ChromaTOF Tile (LECO, США) – времена удерживания, величины m/z и интегрированные площади пиков корректировали. Для уменьшения многомерности экспериментальных данных применяли программное обеспечение ChromaTOF Tile (v.1.01, LECO, США), основанное на

использовании коэффициента Фишера. Принцип обработки этого программного обеспечения заключается в сравнении двух соответствующих областей хроматограммы (т.н. tiles) для обозначения находок низкой и высокой дисперсий. Диапазон анализируемых масс был ограничен $m/z = 85$ и $m/z = 700$. Метаболиты идентифицировали на основе их масс-спектров и времени удерживания с использованием библиотек Национального института стандартов и технологий (NIST), библиотек Mainlib и

Feihn, а также открытого репозитория PubChem в Национальном институте здравоохранения (NIH). Для дальнейшей интерпретации выбирали идентификации с показателями прямого и обратного сходства (similarity и reverse similarity) более 800 [10].

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью метода GC×GC-MS удалось обнаружить соединения, которые накапливались в ходе синтеза метаболитов бактериального штамма (табл. 1).

Таблица 1. Основные экзометаболиты штамма *B. velezensis* BZR 336g, обнаруженные методом GC×GC-MS

Table 1. Major exometabolites of *B. velezensis* strain BZR 336g, detected by GC×GC-MS

| Класс Class | Подкласс Subclass | Молекулярная формула Molecular formula | m/z характеристичного иона Characteristic ion m/z | Количественная оценка содержания метаболитов (относительные единицы) * Quantification of metabolites content (relative units) * | | | |
|---|--|---|--|--|---|---|---|
| | | | | ОПС All ОСМ All | ОПС без Mn ²⁺ ОСМ without Mn ²⁺ | ОПС без Zn ²⁺ ОСМ without Zn ²⁺ | ОПС без Co ²⁺ ОСМ without Co ²⁺ |
| Карбоновые кислоты и производные Carboxylic acids and derivatives | Аминокислоты, пептиды и аналоги Amino acids, peptides, and analogues | C ₄ H ₉ NO ₂ | 85 | 23 | 35 | 23 | 12 |
| Карбоновые кислоты и производные Carboxylic acids and derivatives | Аминокислоты, пептиды и аналоги Amino acids, peptides, and analogues | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | 86 | 3067 | 9128 | 16303 | 10015 |
| Карбоновые кислоты и производные Carboxylic acids and derivatives | Аминокислоты, пептиды и аналоги Amino acids, peptides, and analogues | C ₃ H ₇ NO ₃ | 218 | 98 | 869 | 190 | 125 |
| Карбоновые кислоты и производные Carboxylic acids and derivatives | Аминокислоты, пептиды и аналоги Amino acids, peptides, and analogues | C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₃ | 154 | 581 | 972 | 2096 | 1351 |
| Карбоновые кислоты и производные Carboxylic acids and derivatives | Аминокислоты, пептиды и аналоги Amino acids, peptides, and analogues | C ₅ H ₇ NO ₃ | 156 | 478 | 2277 | 1280 | 3146 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензойные кислоты и производные Benzoic acids and derivatives | C ₈ H ₈ O ₂ | 90 | 83 | 159 | 349 | 87 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензойные кислоты и производные Benzoic acids and derivatives | C ₇ H ₆ O ₄ | 193 | 3973 | 1697 | 20782 | 3361 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензойные кислоты и производные Benzoic acids and derivatives | C ₇ H ₆ O ₃ | 269 | 4 | 0 | 131 | 32 |

| | | | | | | | |
|---|--|-------------------|-----|-------|--------|--------|--------|
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензойные кислоты и производные Benzoic acids and derivatives | $C_7H_7NO_2$ | 266 | 3696 | 6750 | 6679 | 1572 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензойные кислоты и производные Benzoic acids and derivatives | $C_7H_6O_2$ | 105 | 49873 | 274784 | 784745 | 663921 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензойные кислоты и производные Benzoic acids and derivatives | $C_7H_6O_3$ | 267 | 571 | 753 | 4267 | 1612 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензонитрилы Benzonitriles | C_7H_5NO | 176 | 105 | 258 | 384 | 178 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Производные бензоила Benzoyl derivatives | C_8H_8O | 91 | 10257 | 28018 | 24191 | 4880 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Производные бензоила Benzoyl derivatives | C_7H_6O | 135 | 895 | 1903 | 6033 | 2230 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Производные бензоила Benzoyl derivatives | C_8H_8O | 121 | 489 | 1316 | 1152 | 263 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензиловые спирты Benzyl alcohols | $C_7H_8O_2$ | 179 | 32312 | 248709 | 483806 | 164416 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензиловые спирты Benzyl alcohols | C_7H_8O | 91 | 24463 | 233408 | 233082 | 191590 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензилцианиды Benzyl cyanides | C_8H_7NO | 190 | 19772 | 45278 | 61538 | 21254 |
| Бензол и производные Benzene and derivatives | Бензилтиоцианаты Benzyl thiocyanates | C_8H_7NS | 91 | 38 | 190 | 3029 | 710 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Эфиры жирных кислот Fatty acid esters | $C_{10}H_{18}O_2$ | 127 | 52 | 59 | 55 | 420 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{16}H_{30}O_2$ | 117 | 6805 | 36953 | 17063 | 8350 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_4H_6O_2$ | 147 | 4 | 11 | 12 | 8 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_5H_8O_2$ | 157 | 1065 | 2875 | 4139 | 1294 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты | $C_6H_8O_2$ | 169 | 408 | 146 | 6910 | 1013 |

| | | | | | | | |
|-----------------------------|--|-------------------|-----|--------|--------|--------|-------|
| | Fatty acids and conjugates | | | | | | |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_5H_{10}O_3$ | 145 | 333 | 454 | 1003 | 668 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_5H_8O_2$ | 172 | 4 | 10 | 26 | 7 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{14}H_{26}O_2$ | 129 | 4475 | 7894 | 6111 | 2116 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{10}H_{20}O_2$ | 117 | 2528 | 8411 | 8116 | 3464 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{11}H_{22}O_2$ | 129 | 668 | 857 | 817 | 757 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{12}H_{24}O_2$ | 117 | 4405 | 8739 | 8037 | 5394 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{17}H_{34}O_2$ | 117 | 56131 | 74155 | 48971 | 15998 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{16}H_{32}O_2$ | 117 | 97813 | 136849 | 105473 | 44689 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_6H_{12}O_2$ | 159 | 12996 | 13839 | 57007 | 33537 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_9H_{16}O_4$ | 151 | 169 | 289 | 647 | 293 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{18}H_{36}O_2$ | 117 | 13475 | 17135 | 12818 | 10253 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_8H_{16}O_2$ | 117 | 6944 | 13268 | 25799 | 7647 |
| Жирные ацилы Fatty Acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{18}H_{34}O_2$ | 117 | 7131 | 31186 | 19287 | 13718 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_{15}H_{30}O_2$ | 117 | 112028 | 139647 | 72406 | 39356 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and conjugates | $C_6H_{12}O_2$ | 147 | 1986 | 5050 | 8830 | 4141 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные кислоты и конъюгаты Fatty acids and | $C_{11}H_{22}O_2$ | 117 | 197 | 327 | 450 | 196 |

| | | conjugates | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|----|-----|------|-----|-----|
| Жирные ацилы Fatty acyls | Жирные спирты Fatty alcohols | C ₁₄ H ₃₀ O | 97 | 9 | 10 | 13 | 6 |
| Жирные ацилы Fatty acyls | Амиды жирных кислот Fatty amides | C ₁₈ H ₃₅ NO | 86 | 132 | 1075 | 980 | 710 |

Примечание: * – интегрированные площади под хроматографическими пиками

Note: * – integrated areas under chromatographic peaks

Среди идентифицированных соединений можно увидеть предшественники биологически активных метаболитов бактерий штамма *B. velezensis* BZR336g. Представители рода *Bacillus* считаются «микробными фабриками» по производству широкого спектра биологически активных молекул, потенциально подавляющих патогенные грибы и бактерии *Bacillus* spp., продуцирующие нерибосомно синтезированные липопептиды и пептиды, проявляют сильную антимикробную активность, которая основана на их химической структуре [11]. Липопептиды *Bacillus* состоят из липидного хвоста, связанного с коротким линейным или циклическим олигопептидом, и обладают очень сложными механизмами биосинтеза, катализируемого нерибосомными пептидными синтетазами, большими ферментными комплексами с модульной структурой, где каждый модуль отвечает за включение определенной аминокислоты. Молекулы известных липопептидов содержат от 4 до 16 аминокислотных остатков в L- или D-конфигурации. Семейство сурфактинов (сурфактин, лихенизин, пумилацидин, галобацилин, бамилоцин) представляет собой гептапептиды. Они включают β-гидроксигептациклические депсипептиды с возможными вариациями аминокислот аланина, валина, лейцина или изолейцина в положениях 2, 4 и 7 в циклическом депсипептидном фрагменте и вариациями от C₁₃ до C₁₆ в цепях β-гидроксигирных кислот. Фенгицин представляет собой циклический липодекапептид, содержащий β-гидроксигирную кислоту с боковой цепью, состоящей из 16–19 атомов углерода. Он имеет различные изоформы, которые различаются длиной и разветвлением фрагмента β-гидроксигирной кислоты, а также аминокислотным составом пептидного кольца. Гомологи фенгицина представляют собой серию липопептидов с вариациями как по длине, так и по разветвлению β-гидроксигирной кислоты. Эти липопептиды продуцируются многими штаммами, которые были коммерциализированы как агенты биологической борьбы против грибных патогенов растений и как стимуляторы роста растений. Соединения представляют собой циклические гептапептиды с алкильной боковой цепью переменной длины, которая придает свойства поверхностной активности, что приводит к сродству с мембранами грибов. Итурины различаются по структуре, их различия заключаются в типе аминокислотных остатков, а также в длине и разветвлении цепи жирной кислоты. Гетерогенность по длине и разветвлению цепи жирных кислот четко демонстрируется итурином А, который имеет до 8 изомеров с 10–14 атомами углерода и различается конфигурациями цепи жирной кислоты.

Таким образом, прекурсорами метаболитов липопептидной природы являются жирные кислоты и их производные, а также пептидные соединения и аминокислоты. Поэтому среди соединений,

идентифицированных GC×GC-MS методом, мы анализируем жирные кислоты и их производные, а также пептиды и аминокислоты. Следует отметить, что жирные кислоты и их производные представлены значительным набором соединений, среди которых преобладают структуры C₆, C₁₀, C₁₁, а также с наличием двойных связей между C=C атомами. Такие структуры соединений в наибольшей степени отражают потенциал бактерий для производства антимикробных метаболитов. Это связано с тем, что такие структуры, являясь предшественниками антимикробных соединений, более других способны в процессе метаболизма превращаться в биологически активные вещества. Если рассматривать роль присутствующих в питательной среде ионов металлов, то можно отметить в отдельных вариантах значение иона Co²⁺, когда его отсутствие в питательной среде приводит к снижению синтеза жирных кислот почти в 2 раза. Культивирование бактерии в питательной среде без Zn²⁺ влечет за собой уменьшение накопления жирных спиртов, в то время как на синтез других производных жирных кислот оказывает незначительное либо отрицательное влияние. На синтез пептидных составляющих наибольшее влияние оказывает присутствие в питательной среде ионов Mn²⁺ и Co²⁺, так как их количество уменьшается почти в два раза при отсутствии в питательной среде этих микроэлементов (табл. 1).

Анализ суммарного накопления жирных кислот и их аналогов, а также аминокислот и пептидов бактерией *B. velezensis* BZR336g на питательных средах, различающихся по содержанию ионов металлов, показывает, что ионы Co²⁺ в сочетании с ионами Mn²⁺ и Zn²⁺ играют важную роль в индуцировании их синтеза (рис. 1).

Тот факт, что ионы металлов выступают в роли индукторов продуцирования микроорганизмами биологически активных метаболитов, отмечался и другими авторами, при этом наиболее четко это отмечалось при одновременном присутствии двух-трех ионов металлов в питательной среде. Хотя в отдельных случаях одновременное влияние нескольких МЭ может давать обратный эффект [6]. Это можно отметить и для нашего исследования, когда для большинства изучаемых метаболитов присутствие в питательной среде ионов всех трех металлов зачастую приводит к снижению синтеза предшественников антигрибных метаболитов.

Соединения бензольной природы могут выступать в роли прекурсоров ароматических углеводородов, которые также представляют интерес при анализе метаболизма бактерий, так как они обладают антимикробной активностью. Синтез отдельных структур этих метаболитов так же индуцируется ионами Co²⁺ и Zn²⁺. При этом ионы Mn²⁺ ингибируют синтез некоторых из них. Суммарное

количество соединений этого класса значительно повышается, когда присутствуют ионы двух или нескольких металлов. В наибольшей степени такая

закономерность отмечается в вариантах, когда одновременно присутствуют ионы Co^{2+} и Zn^{2+} .

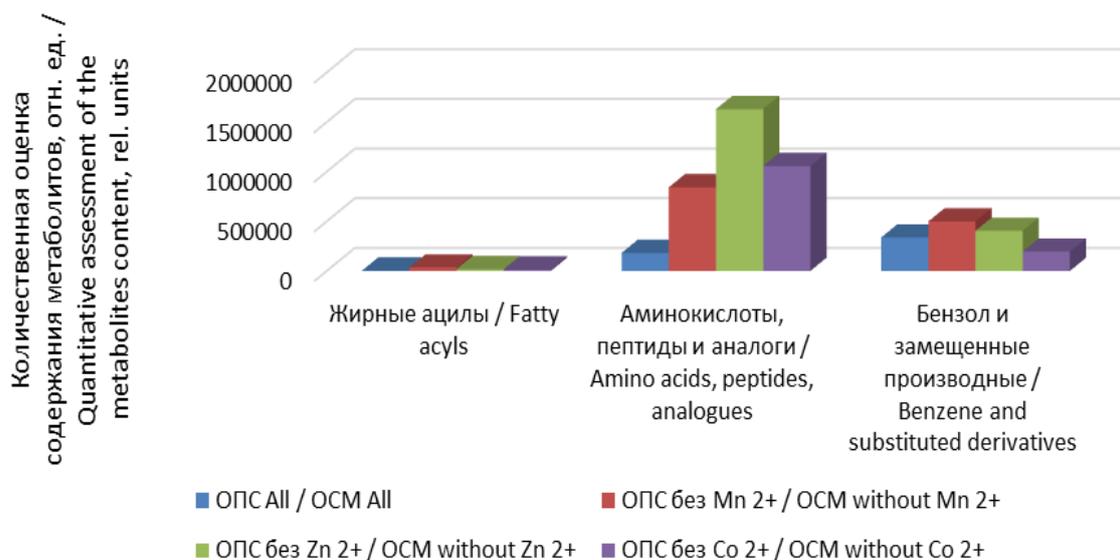


Рисунок 1. Соотношение представленности основных классов экзометаболитов штамма *B. velezensis* BZR 336g
Figure 1. Representation of major classes of *B. velezensis* strain BZR 336g exometabolites

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате анализа экзометаболитов перспективного штамма бактерий *B. velezensis* BZR336g методом газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией обнаружено, что на количество соединений, которые являются прекурсорами метаболитов липопептидной природы, влияет содержание ионов металлов в питательной среде. Это влияние может изменяться в зависимости от того, присутствуют металлы по одному или в сочетании друг с другом. Такая закономерность отмечается для всех трех анализируемых классов соединений. В наибольшей степени она проявляется в сочетаниях Mn^{2+} и Co^{2+} , Zn^{2+} и Co^{2+} для жирных кислот и их аналогов, а также для аминокислот и пептидов. Для соединений бензольных структур это сочетание Co^{2+} и Zn^{2+} . Полученные результаты дают возможность сделать вывод о содержании ионов металлов в питательной среде для оптимизации продуцирования биологически активных метаболитов, составляющих основу антимикробной активности будущего биопрепарата.

БЛАГОДАРНОСТЬ

- Исследования выполнены при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-1651.2021.5.
- Авторы выражают благодарность ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ) за выполнение масс-спектрометрических экспериментов.

ACKNOWLEDGMENT

- The research was supported by grant of the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists No. MK-1651.2021.5.
- The authors are grateful to the Human Proteome Core Facility, Institute of Biomedical Chemistry (IBMC) for assistance with the generation of mass spectrometry data.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Harwood C.R., Mouillon J.-M., Pohl S., Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group // *FEMS Microbiology Reviews*. 2018. V. 42. P. 721–738. DOI: 10.1093/femsre/fuy028
- Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И. Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов (обзор) // *Сельскохозяйственная биология*. 2018. Т. 53. С. 29–37. DOI: 10.15389/agrobiol.2018.1.29rus
- Максимов И.В., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Хайруллин Р.М., Сингх Б.П. Перспективы применения бактерий – продуцентов липопептидов для защиты растений (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56. С. 19–34. DOI: 10.31857/S0555109920010134
- Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species // *Journal of biotechnology*. 2018. V. 285. P. 44–55. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00925
- Dubey M.K., Meena M., Aamir M., Zehra A., Upadhyay R.S. Regulation and role of metal ions in secondary metabolite production by microorganisms // *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. 2019. P. 259–277. DOI: 10.1016/B978-0-444-63504-4.00019-0
- de Oliveira Schmidt V.K., de Souza Carvalho J., de Oliveira D., de Andrade C.J. Biosurfactant inducers for enhanced production of surfactin and rhamnolipids: an overview // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2021. V. 37. N 21. P. 27–43. DOI: 10.1007/s11274-020-02970-8
- Papadimitropoulos, M.E.P., Vasilopoulou, C.G., Maga-Nteve, C., Klapa, M.I. Untargeted GC-MS Metabolomics. In: Theodoridis, G., Gika, H., Wilson, I. (eds). *Metabolic Profiling. Methods in Molecular Biology*. 2018. V. 1738. Humana Press, New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-4939-7643-0_9
- Асатурова А.М., Дубяга В.М. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* для получения биопрепарата против фитопатогенных грибов: пат. 2553518 Рос. Федерация № RU2013151377/10А. Заявл. 20.11.2013; опубл. 20.06.2015.

9. Asaturova A.M., Gyurnets E.A., Allakhverdian V.V., Astakhov M.M., Saenko K.U. The study of the antifungal activity of the *Bacillus subtilis* BZR 336g strain under the conditions of periodic cultivation with the addition of citric acid, corn extract and some microelements // XI International Scientific and Practical Conference «Biological Plant Protection is the Basis of Agroecosystems Stabilization». 2020. V. 21. P. 9. DOI: 10.1051/bioconf/20202100015

10. Koek M.M., Jellema R.H., van der Greef J. et al. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives // *Metabolomics*. 2011. V. 7. P. 307–328. DOI: 10.1007/s11306-010-0254-3

11. Сидорова Т.М., Асатунова А.М., Аллахвердян В.В. Особенности антагонизма бактерий рода *Bacillus* по отношению к грибам *Fusarium* при защите от болезни и контаминации микотоксинами // Юг России: экология, развитие. 2021. Т. 16. N 4. С. 86–103. DOI: 10.18470/1992-1098-2021-4-86-103

REFERENCES

1. Harwood C.R., Mouillon J.-M., Pohl S., Arnau J. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group FEMS. *Microbiology Reviews*, 2018, vol. 42, pp. 721–738. DOI: 10.1093/femsre/fuy028

2. Sidorova T.M., Asaturova A.M., Homyak A.I. Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms (review). *Agricultural Biology*, 2018, vol. 53, no. 1, pp. 29–37. (In Russian) DOI: 10.15389/agrobiology.2018.1.29rus

3. Maksimov I.V., Cherepanova E.A., Burkhanova G.F., Khairullin R.M., Singh B.P. Prospects and applications of lipopeptide-producing bacteria for plant protection (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2020, vol. 56, no. 1, pp. 19–34. (In Russian) DOI: 10.31857/S0555109920010134

4. Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J., Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of biotechnology*, 2018, vol. 285, pp. 44–55. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00925

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Наталья С. Томашевич разработала научный дизайн, концепцию и написала статью. Татьяна М. Сидорова разработала концепцию, проанализировала и интерпретировала материал, написала статью. Валерия В. Аллахвердян собрала материал. Анжела М. Асатунова разработала научный дизайн, корректировала рукопись до подачи в редакцию. Ольга И. Киселева и Илья Ю. Курбатов провели эксперименты, обработали экспериментальные данные. Все авторы в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

5. Dubey M.K., Meena M., Aamir M., Zehra A., Upadhyay R.S. Regulation and role of metal ions in secondary metabolite production by microorganisms. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, 2019, pp. 259–277. DOI: 10.1016/B978-0-444-63504-4.00019-0

6. de Oliveira Schmidt V.K., de Souza Carvalho J., de Oliveira D., de Andrade C.J. Biosurfactant inducers for enhanced production of surfactin and rhamnolipids: an overview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, vol. 37, no. 21, pp. 27–43. DOI: 10.1007/s11274-020-02970-8

7. Papadimitropoulos M.E.P., Vasilopoulou C.G., Maga-Nteve C., Klapa M.I. Untargeted GC-MS Metabolomics. In: Theodoridis G., Gika H., Wilson I. (eds). *Metabolic Profiling. Methods in Molecular Biology*. 2018, vol 1738. Humana Press, New York, NY. DOI: 10.1007/978-1-4939-7643-0_9

8. Asaturova A.M., Dubyaga V.M. *Shtamm bakterii Bacillus subtilis dlya polucheniya biopreparata protiv fitopatogennykh gribov* [Bacillus subtilis bacterial strain for obtaining a biological product against phytopathogenic fungi]. Patent RF N RU2013151377/10A (In Russian)

9. Asaturova A.M., Gyurnets E.A., Allakhverdian V.V., Astakhov M.M., Saenko K.U. The study of the antifungal activity of the *Bacillus subtilis* BZR 336g strain under the conditions of periodic cultivation with the addition of citric acid, corn extract and some microelements. XI International Scientific and Practical Conference «Biological Plant Protection is the Basis of Agroecosystems Stabilization», 2020, vol. 21, p. 9. DOI: 10.1051/bioconf/20202100015

10. Koek M.M., Jellema R.H., van der Greef J. et al. Quantitative metabolomics based on gas chromatography mass spectrometry: status and perspectives. *Metabolomics*, 2011, vol. 7, pp. 307–328. DOI: 10.1007/s11306-010-0254-3

11. Sidorova T.M., Asaturova A.M., Allakhverdian V.V. Specific features of antagonism of *Bacillus* bacteria against toxinogenic *Fusarium* fungi in protecting plants against disease and contamination with mycotoxins (review). *South of Russia: ecology, development*, 2021, vol. 16, no. 4, pp. 86–103. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2021-4-86-103

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Natalia S. Tomashevich participated in the scientific design, concept development and writing of the article. Tatiana M. Sidorova undertook analysis, interpretation and development of the scientific material and participated in the writing of the article. Valeria V. Allahverdyan collected material. Anzhela M. Asaturova participated in the scientific design and proofread the manuscript before submission to the Editor. Olga I. Kiseleva and Ilya Yu. Kurbatov conducted experiments and processed experimental data. All authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgressions.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Наталья С. Томашевич / Natalia S. Tomashevich <http://orcid.org/0000-0002-7297-5929>
Татьяна М. Сидорова / Tatiana M. Sidorova <http://orcid.org/0000-0003-4281-5278>
Ольга И. Киселева / Olga I. Kiseleva <http://orcid.org/0000-0003-3032-1983>
Илья Ю. Курбатов / Ilya Yu. Kurbatov <https://orcid.org/0000-0002-3704-092>
Валерия В. Аллахвердян / Valeria V. Allahverdyan <http://orcid.org/0000-0002-8679-6139>
Анжела М. Асатунова / Anzhela M. Asaturova <http://orcid.org/0000-0002-0060-1995>