

Оригинальная статья / Original article
УДК 579.64
DOI: 10.18470/1992-1098-2023-2-70-81

Изучение метаболитов новых перспективных штаммов бактерий-антагонистов рода *Bacillus* для повышения эффективности биопрепаратов фунгицидного действия на их основе

Наталья С. Томашевич, Татьяна М. Сидорова, Валерия В. Аллахвердян, Анжела М. Асатурова
Федеральный научный центр биологической защиты растений, Краснодар, Россия

Контактное лицо

Валерия В. Аллахвердян, м.н.с. лаборатории микробиологической защиты растений, Федеральный научный центр биологической защиты растений; 350039 Россия, г. Краснодар, п/о-39.

Тел. +79648950107

Email lera_arm@mail.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-8679-6139>

Формат цитирования

Томашевич Н.С., Сидорова Т.М., Аллахвердян В.В., Асатурова А.М. Изучение метаболитов новых перспективных штаммов бактерий-антагонистов рода *Bacillus* для повышения эффективности биопрепаратов фунгицидного действия на их основе // Юг России: экология, развитие. 2023. Т.18, N 2. С. 70-81. DOI: 10.18470/1992-1098-2023-2-70-81

Получена 2 марта 2023 г.

Прошла рецензирование 17 апреля 2023 г.

Принята 27 апреля 2023 г.

Резюме

Цель. Изучить метаболомный профиль перспективных для разработки биофунгицидов штаммов бактерий рода *Bacillus* с использованием методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), биоавтографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС).

Материалы и методы. Объекты исследования – штаммы бактерий рода *Bacillus*. Из жидкой культуры выделяли экзометаболиты и анализировали их метаболомный профиль методами ТСХ, биоавтографии и ВЭЖХ-МС.

Результаты. Методом биоавтографии с тест-культурой гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F6 идентифицированы метаболиты штаммов бактерий рода *Bacillus* сурфактин, итурин и фенгицин. Количественный анализ с применением ВЭЖХ-МС анализа позволяет констатировать, что штаммы *B. velezensis* BZR 336g и *B. amyloliquefaciens* BZR 277 продуцируют больше сурфактина, чем другие. Обнаружено повышенное содержание липопептидов итуриновой природы у штаммов *B. velezensis* BZR 517 и *B. velezensis* BZR 336g. По способности продуцировать фенгицины штаммы *B. velezensis* BZR 517 и *B. velezensis* BZR 336g, опережают другие штаммы.

Заключение. Исследования с использованием двух аналитических методов позволяют обнаружить, что штаммы продуцируют все три антигрибных липопептида. Это важно, поскольку метаболиты способны не только подавлять фитопатогенные грибы, но и усиливать антигрибной эффект за счет синергизма. Полученные результаты позволяют констатировать о возможности использования всех четырех штаммов в качестве продуцентов эффективных биофунгицидов.

Ключевые слова

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

The study of metabolites of new promising strains of bacterial-antagonists of the genus *Bacillus* to increase the effectiveness of fungicidal biological products based on them

Natalia S. Tomashevich, Tatiana M. Sidorova, Valeria V. Allahverdyan and Anzhela M. Asaturova

Federal Research Centre of Biological Plant Protection, Krasnodar, Russia

Principal contact

Valeria V. Allahverdyan, junior researcher
laboratory of microbiological plant protection,
Federal Research Centre of Biological Plant
Protection; 350039 Russia, Krasnodar, p/o-39.
Tel. +79648950107

Email lera_arm@mail.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0002-8679-6139>

How to cite this article

Tomashevich N.S., Sidorova T.M., Allahverdyan V.V., Asaturova A.M. The study of metabolites of new promising strains of bacterial-antagonists of the genus *Bacillus* to increase the effectiveness of fungicidal biological products based on them. *South of Russia: ecology, development*. 2023, vol. 18, no. 2, pp. 70-81. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2023-2-70-81

Received 2 March 2023

Revised 17 April 2023

Accepted 27 April 2023

Abstract

Aim. To study the metabolomic profile of bacterial strains of the genus *Bacillus* promising for the development of biofungicides using thin layer chromatography (TLC), bioautography and high performance liquid chromatography with mass spectrometry (HPLC-MS).

Materials and Methods. The objects of study are strains of bacteria of the genus *Bacillus*. Exometabolites were isolated from the liquid culture and their metabolomic profile was analyzed by TLC, bioautography, and HPLC-MS.

Results. By the method of bioautography with a test culture of the fungus *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F6 metabolites of bacterial strains of the genus *Bacillus* surfactin, iturin and fengycin were identified. Quantitative analysis using HPLC-MS analysis allows us to state that the *B. velezensis* BZR 336g and *B. amyloliquefaciens* BZR 277 strains produce more surfactin than the others. An increased content of ituric lipopeptides was found in strains *B. velezensis* BZR 517 and *B. velezensis* BZR 336g. According to the ability to produce fengycins, strains of *B. velezensis* BZR 517 and *B. velezensis* BZR 336g are ahead of other strains.

Conclusion. Studies using two analytical methods reveal that the strains produce all three antifungal lipopeptides. This is important, since metabolites are able not only to suppress phytopathogenic fungi, but also to enhance the antifungal effect due to synergism. The results obtained allow us to state the possibility of using all four strains as producers of effective biofungicides.

Key Words

Metabolites, *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 коммерчески перспективных бактерий, используемых для производства широкого спектра промышленных микробиологических препаратов. Все чаще эти бактерии используют в качестве средств биоконтроля грибов [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. Виды *Bacillus*, такие 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. 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 итурина, сурфактина и фенгицина, а в последнее время также с представителями семейства курстакинов, являются хорошо известными соединениями с однозначными доказательствами их биоконтрольных свойств [4]. Нерибосомные липопептиды представляют собой гетерогенную группу соединений, состоящую из аминокислот, гидроксильных или аминокислотных жирных кислот, очень часто модифицированных метилированием, ацилированием или гликозилированием. Большинство из них имеют циклическую структуру, состоящую из семи или десяти аминокислотных остатков с множеством изомерных форм, из-за различий в аминокислотном составе или разной длины цепи жирных кислот. Многие штаммы *Bacillus*, продуцирующие более одного семейства липопептидов, могут увеличивать свою способность за счет синергетического взаимодействия между различными соединениями. Несколько исследований показали одновременное противомикробное действие отдельных сочетаний липопептидов, в основном достигаемое *in vitro*, такое как комбинация сурфактина и итурина, сурфактина и фенгицина, итурина и фенгицина, бацилломицина и фенгицина, субтулена и итурина [5].

Для анализа метаболитов микроорганизмов и их свойств возможно использовать несколько методов в отдельности или в сочетании. Так, на основе R_f -значения, тонкослойная хроматография может предоставлять информацию о полярности, спектральных свойствах (поглощение, флуоресценция) и размере молекул аналита. Это чувствительный, качественный метод, поэтому он подходит на начальных этапах исследований, а также для целенаправленного выделения соединений. Высокоэффективная жидкостная хроматография является аналитическим методом химического профилирования липопептидов и является

необъемлемым этапом подтверждения выделенных соединений [5]. Биоавтография – это биологический метод, который является важным инструментом для идентификации биологически активных соединений, в том числе перспективных в качестве фунгицидов и/или фунгистатиков.

В связи с этим целью данной работы было изучить метаболомный профиль перспективных для разработки эффективных биофунгицидов новых штаммов бактерий рода *Bacillus* с использованием современных аналитических методов быстрого и надежного обнаружения соединений липопептидной природы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования – новые оригинальные штаммы бактерий *Bacillus velezensis* BZR 336g, *Bacillus velezensis* BZR 517, *Bacillus amyloliquefaciens* BZR 277 и *Bacillus siamensis* BZR 86, перспективные для разработки на их основе биопрепаратов для защиты растений от фитопатогенных грибов [6], а также тест-культуры грибов *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F6 и *Alternaria* sp. BZR F12 из БРК ФГБНУ ФНЦБЗР «Государственная коллекция энтомоакарифагов и микроорганизмов».

Культивирование микроорганизмов и изучение антигрибных метаболитов бактерий *Bacillus* методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и биоавтографии проводили на базе лаборатории микробиологической защиты растений с использованием материально-технической базы УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения» [7]. Изучение метаболомного профиля жидких культур (ЖК) на основе штаммов бактерий с использованием ESI-Q-TOF масс-спектрометра проводили на базе ЦКП «Масс-спектрометрические исследования» (г. Новосибирск).

ЖК бактерий получали методом периодического культивирования в ротационном шейкере-инкубаторе New Brunswick Scientific Excella E25 на основе штаммов бактерий *B. velezensis* BZR 336g, *B. velezensis* BZR 517 и *B. amyloliquefaciens* BZR 277, *B. siamensis* BZR 86. Для изучения количественных закономерностей роста исследуемых штаммов использовали метод Коха [8]. Повторность опыта трехкратная. Подсчет выросших колоний осуществляли с использованием системы для автоматического подсчета колоний Color Qcount, Spiral Biotech. Выделение метаболитов проводили методом ТСХ, а выявление метаболитов с антигрибной активностью проводили методом биоавтографии [9; 10].

В ходе анализа метаболитов жидкой культуры бактерий методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) стандарты разводили в 200 мкл 100% метанола так, чтобы концентрация каждого соединения составляла 10-4М. Хроматографировали смесь стандартов, а не индивидуальные соединения.

Образцы разводили в 5 мл 100% метанола каждый. Из растворов отбирали по 1 мл экстракта, центрифугировали при 4°C в течение 10 минут при 13,2g и проводили ВЭЖХ-МС анализ полученных экстрактов [11; 12].

В ходе ВЭЖХ-МС анализа смеси стандартов (сурфактин, итурин А, фенгицин) было установлено, что для каждого соединения наблюдается по 4 пика в

хроматограмме полного ионного тока, которые соответствуют различным формам исходных соединений, отличающимся длиной углеродной цепи. Для сурфактина – C12–C15, для итурина – C14–C17, для

фенгигина C16–C19. Время выхода всех 4 форм для итурина 3.6–4.5 минут; для фенгигина – 4.1–6 минут, для сурфактина 10.1–15.2 минут (рис. 1–3).

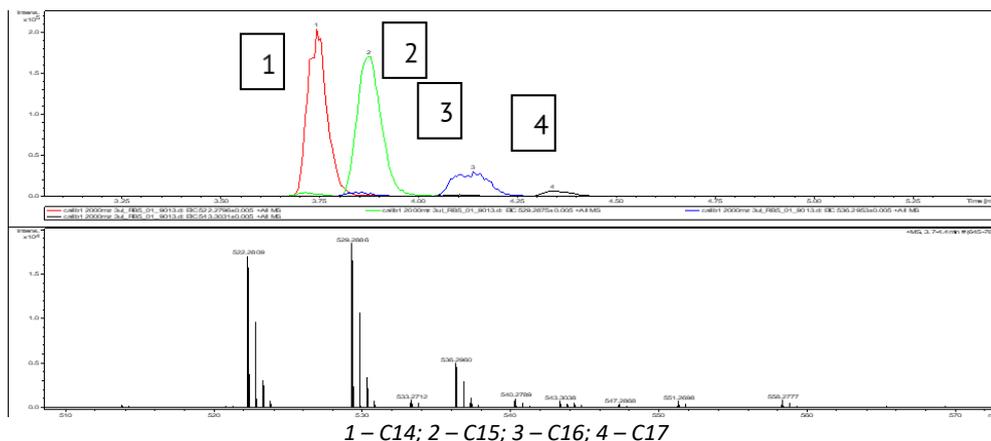


Рисунок 1. Хроматограммы выделенного ионного тока по двухзарядным ионам, соответствующим разным формам итурина

Figure 1. Chromatograms of the isolated ion current for doubly charged ions corresponding to different forms of iturin

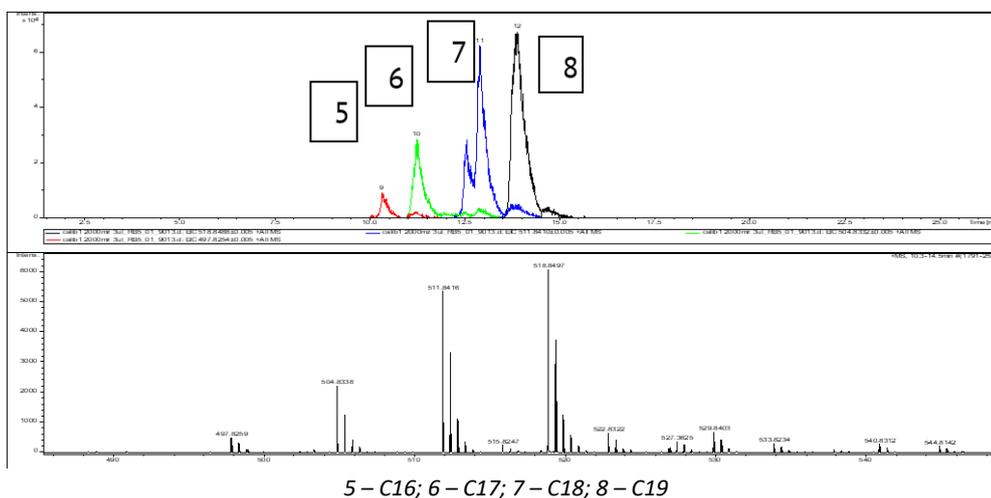


Рисунок 2. Хроматограммы выделенного ионного тока по двухзарядным ионам, соответствующим разным формам фенгигина

Figure 2. Chromatograms of the isolated ion current for doubly charged ions corresponding to different forms of fengycin

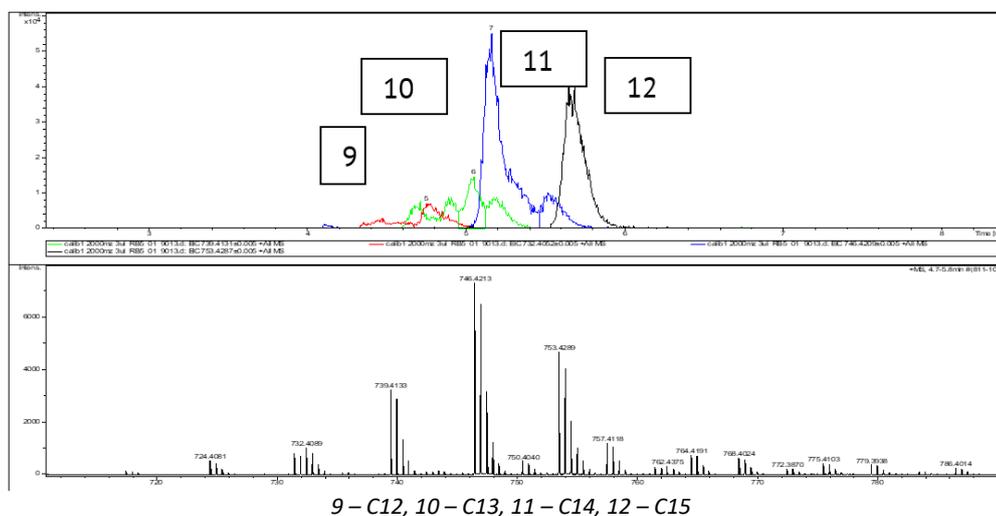


Рисунок 3. Хроматограммы выделенного ионного тока по двухзарядным ионам, соответствующим разным формам сурфактина

Figure 3. Chromatograms of the isolated ion current for doubly charged ions corresponding to different forms of surfactin

Интегрирование сигналов от каждого стандарта проводили по 4 сигналам суммарно. Для итурина хроматограмма выделенного ионного тока была построена по сигналам от двухзарядных ионов C14–C17 с m/z 522.2796, 529.2874, 536.2952, 543.3031. Для фенгицина хроматограмма выделенного ионного тока была построена по сигналам от двухзарядных ионов

C16–C19 с m/z 732.4052, 739.4130, 746.4209, 753.4287. Для сурфактина – по сигналам от двухзарядных ионов C12–C15 с m/z 497.8259, 504.8331, 511.8410, 518.8495. На рисунке 4 представлены калибровочные кривые для сурфактина, итурина и фенгицина. На вставках в каждом графике указаны уравнения аппроксимации.

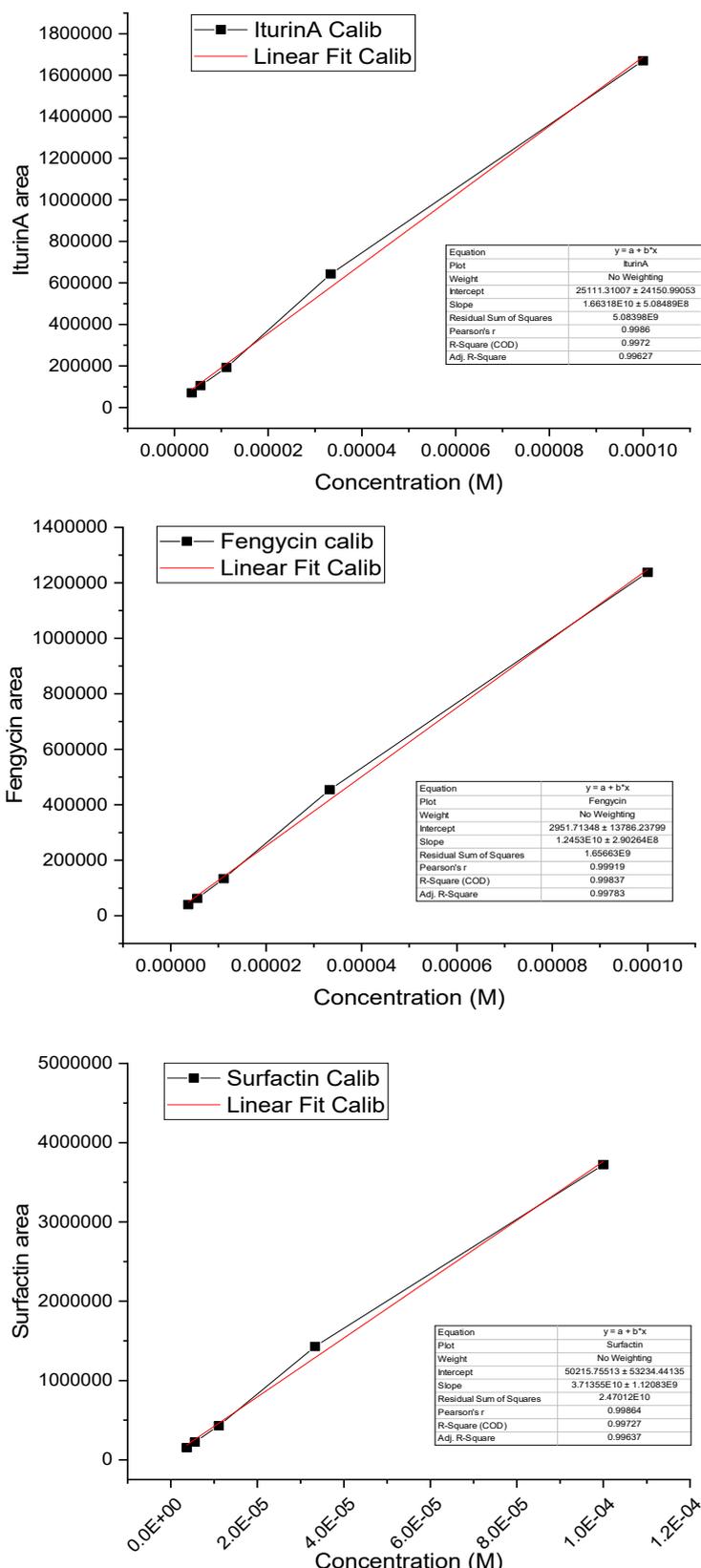


Рисунок 4. Калибровочные кривые для стандартов метаболитов
 Figure 4. Calibration curves for metabolite standards

Каждый экстракт метаболитов *B. siamensis* BZR 86, *B. amyloliquefaciens* BZR 277, *B. velezensis* BZR 336g, *B. velezensis* BZR 517 разводили в 2,5 мл 100% метанола. Из результатов предварительного анализа были установлены ориентировочные величины разведения образцов для одновременного определения концентраций трех типов соединений в сложной смеси. Экстракт метаболитов *B. siamensis* BZR 86 разводили в 1.2, 2.4 и 6 раз, *B. amyloliquefaciens* BZR 277 – в 1.5, 12 и 24 раза, *B. velezensis* BZR 336g – в 3, 4 и 24 раза, *B. velezensis* BZR 517 – в 3, 4 и 12 раз. ВЭЖХ-МС анализ проводили для 12 образцов, в каждом из которых определяли площадь под суммарным сигналом от 4 форм каждого из интересующих липопептидов. Далее концентрацию сурфактинов, фенгицинов и итуринов в образцах нормировали на 90 мл объема среды, из которой были экстрагированы метаболиты. Все коэффициенты разведений учитывали при расчетах.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение метаболитов бактерий методом ТСХ и предварительный анализ их химической структуры
ТСХ становится все более важным инструментом в анализе природных соединений. Она используется не

только как простой метод разделения, идентификации и количественного определения природных компонентов, но и как метод изучения потенциальных свойств выделенных соединений за счет использования различных биологических тестов, совместимых с ТСХ. Это связано с преимуществами метода: возможность простого, быстрого и гибкого анализа множества образцов параллельно, без необходимости специальных этапов очистки образцов, получения визуальных результатов и возможности множественных детекций [10].

В результате анализа хроматограмм образцов под ультрафиолетовым светом (366 нм) можно сделать вывод о присутствии в этилацетатных экстрактах супернатантов ЖК бактерий *B. velezensis* BZR 336g, *B. amyloliquefaciens* BZR 277 и *B. siamensis* BZR 86 соединений фенольной природы (голубое свечение) (Rf 0,52–0,59), а *B. velezensis* BZR 517 (Rf 0,48–0,54), а также циклических липопептидов (зеленое свечение) (Rf 0,82–0,90) (рис. 5).

Таким образом, визуальная оценка с применением ультрафиолетового света с длиной волны 366 нм дает основание предположить наличие среди выделенных метаболитов соединений липопептидной природы.

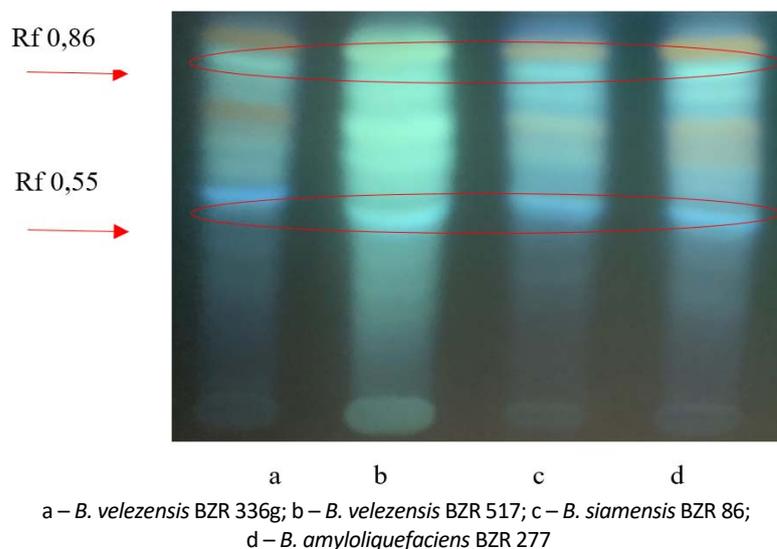


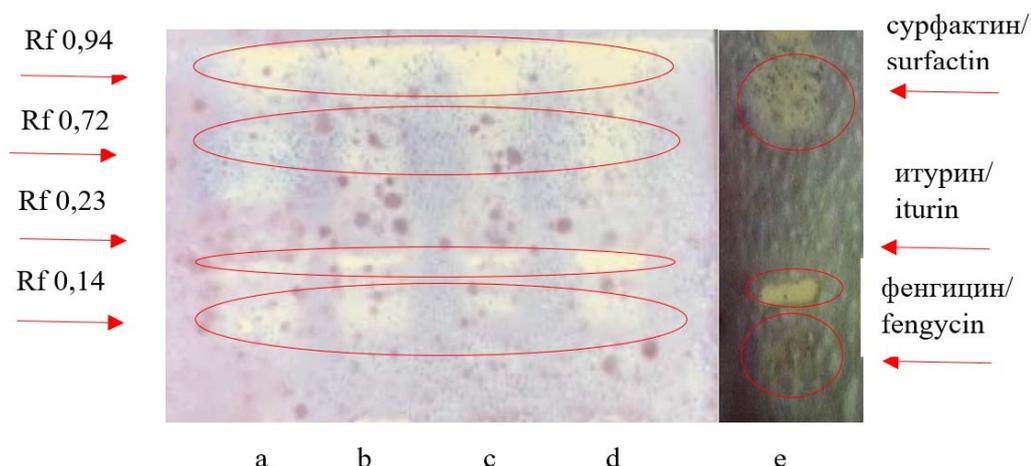
Рисунок 5. Тонкослойные хроматограммы метаболитов бактерий рода *Bacillus* под ультрафиолетом 366 нм
Figure 5. Thin-layer chromatograms of metabolites of bacteria of the genus *Bacillus* under ultraviolet 366 nm

Изучение антигрибной активности метаболитов штаммов методом биоавтографии

На биоавтограммах всех вариантов опыта с тест-культурой гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F6 обнаруживалась значительная по площади зона ингибирования гриба метаболитами сурфактиновой природы (рисунок 6). Это можно констатировать в результате проведенных экспериментов по выявлению соответствующей хроматографической подвижности (Rf 0,70) и характерному подавлению роста гриба (фунгистатичность) для стандарта сурфактина. Наиболее выражена данная зона у штаммов *B. velezensis* BZR 336g и *B. amyloliquefaciens* BZR 277. Хочется подчеркнуть, что сурфактин играет особую роль в защите растений от фитопатогенных грибов, так как не только фунгистатически подавляет гриб, но и способствует стимуляции системной устойчивости растений к

фитопатогенам, а также благоприятно воздействует на образование биопленок [12]. Его важным свойством является способность синергетически влиять на биологическую активность метаболитов итуриновой и фенгициновой структур [13; 14].

Можно также отметить продуцирование штаммами метаболитов итуриновой природы (Rf 0,21–0,25). Зона ингибирования гриба этим метаболитом была наиболее выражена у *B. amyloliquefaciens* BZR 277, наименьшая зона подавления – у штаммов *B. siamensis* BZR 86 и *B. velezensis* BZR 336g. Кроме того, все штаммы продуцировали фенгицин (Rf 0,13–0,15). Незначительная зона ингибирования тест-культуры гриба метаболитом фенгициновой природы была отмечена только у штамма *B. siamensis* BZR 86.



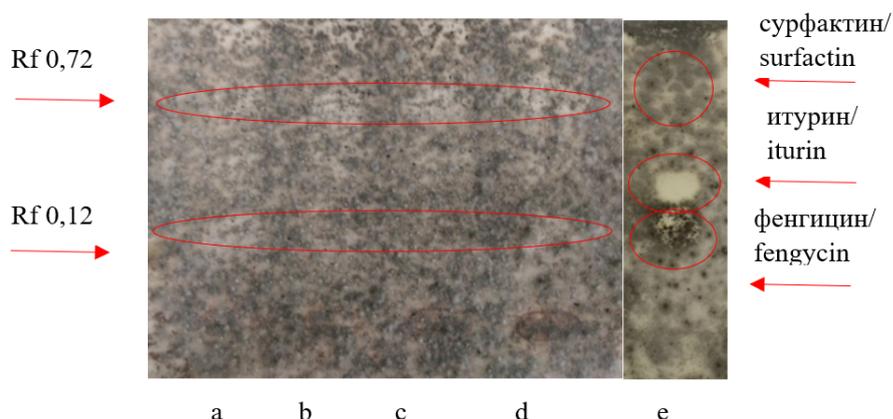
a – *B. velezensis* BZR 336g; b – *B. velezensis* BZR 517; c – *B. siamensis* BZR 86; d – *B. amyloliquefaciens* BZR 277; e – стандарты метаболитов / metabolite standards

Рисунок 6. Биоавтограммы метаболитов бактерий рода *Bacillus* и стандарты метаболитов с тест-культурой гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F6

Figure 6. Bioautograms of metabolites of bacteria of the genus *Bacillus* and standards of metabolites with a test culture of the fungus *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F6

На биоавтограммах обнаруживались также довольно значительные по площади зоны полного подавления роста тест-гриба (фунгицидность) (Rf 0,93–0,95) (неидентифицированные антигрибные соединения, которые нуждаются в дополнительной идентификации). На биоавтограммах с тест-культурой гриба *Alternaria* sp. BZR F12 у всех штаммов в равной степени отмечались

зоны подавления роста гриба, которые соответствуют сурфактину (Rf 0,70–0,74) и его гомологам. Можно также отметить незначительное подавление роста гриба в зоне фенгицина (Rf 0,10–0,14), которое визуально было больше у штаммов *B. velezensis* BZR 336g и *B. amyloliquefaciens* BZR 277 (рис. 7).



a – *B. velezensis* BZR 336g; b – *B. velezensis* BZR 517; c – *B. siamensis* BZR 86; d – *B. amyloliquefaciens* BZR 277; e – стандарты метаболитов / metabolite standards

Рисунок 7. Биоавтограммы метаболитов бактерий рода *Bacillus* и стандарты метаболитов с тест-культурой гриба *Alternaria* sp. BZR F12

Figure 7. Bioautograms of metabolites of bacteria of the genus *Bacillus* and standards of metabolites with a test culture of the fungus *Alternaria* sp. BZR F12

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что штаммы продуцируют значительное количество метаболитов, в особенности сурфактина и его гомологов. Применение тест-культуры гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F6 позволило выявить три группы липопептидов, в отличие от варианта с тест-культурой гриба *Alternaria* sp. BZR F12, где не происходило ингибирование гриба метаболитом итуриновой природы. Данное обстоятельство, вероятно, можно объяснить различиями механизмов действия в отношении указанных грибов.

Изучение хроматографических профилей с применением методом ВЭЖХ-МС

В ходе химического профилирования липопептидов с использованием ВЭЖХ-МС анализа образцов экстрактов экзометаболитов бактериальных культур обнаружено, что во всех образцах штаммов бактерий рода *Bacillus* BZR 86, BZR 277, BZR 336g, BZR 517 присутствовали сурфактин, итурин и фенгицин (рис. 8–11).

Стоит отметить, что в образце метаболитов *B. siamensis* BZR 86 концентрация итурина и фенгицина была меньше, чем в остальных образцах. Кроме того, в этом образце наблюдались сигналы от форм итурина

C14-C16. Формы C17 итурина не наблюдалось. В остальных образцах бактерий рода *Vacillus* штаммах BZR 277, BZR 336g, BZR 517 наблюдались все формы сурфактина, итурина и фенгицина.

Количественный анализ липопептидов проводился с использованием калибровок, полученным по стандартным соединениям (рис. 12). На калибровочные кривые нанесены по три точки для каждого образца с различными разбавлениями. Концентрации сурфактина в образцах бактерий рода *Vacillus* штаммов

BZR 86, BZR 277 и BZR 336g были высокими, поэтому не все измеренные значения попали в калибровочный диапазон: два значения для *V. velezensis* BZR 336g и по одному значению для *V. siamensis* BZR 86 и *V. amyloliquefaciens* BZR 277 оказались вне калибровочной кривой для сурфактина. Остальные значения усреднялись для каждого липопептида.

В таблице 1 представлена концентрация сурфактинов, фенгицинов и итуринов в образцах культур.

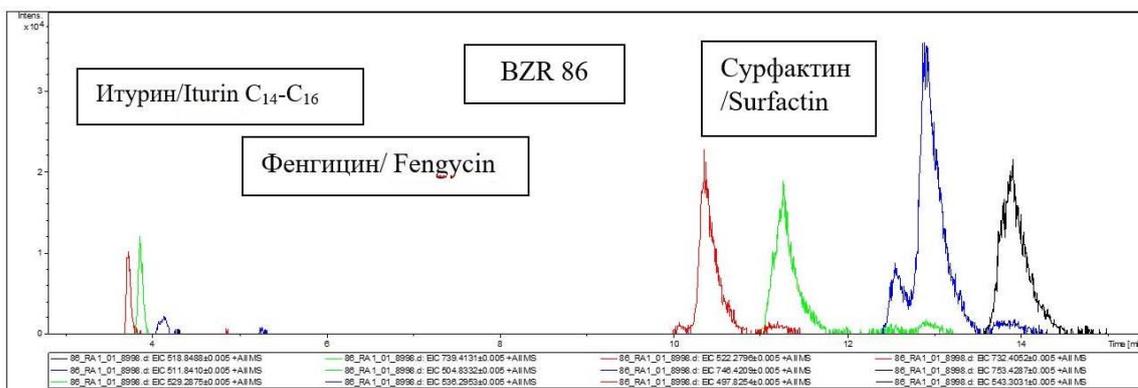


Рисунок 8. ВЭЖХ анализ метаболитов штамма *B. siamensis* BZR 86
 Figure 8. HPLC analysis of metabolites of *B. siamensis* BZR 86 strain

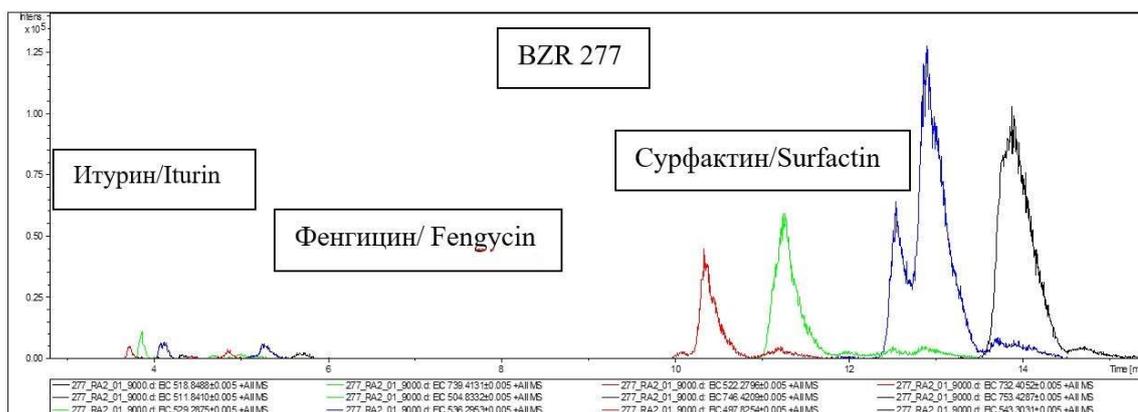


Рисунок 9. ВЭЖХ анализ метаболитов штамма *B. amyloliquefaciens* BZR 277
 Figure 9. HPLC analysis of metabolites of *B. amyloliquefaciens* BZR 277

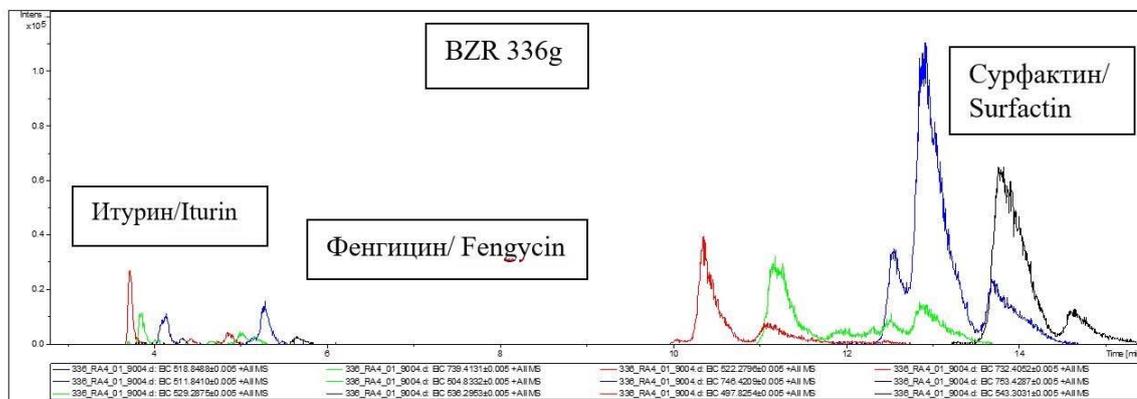


Рисунок 10. ВЭЖХ анализ метаболитов штамма *B. velezensis* BZR 336g
 Figure 10. HPLC analysis of metabolites of *B. velezensis* BZR 336g

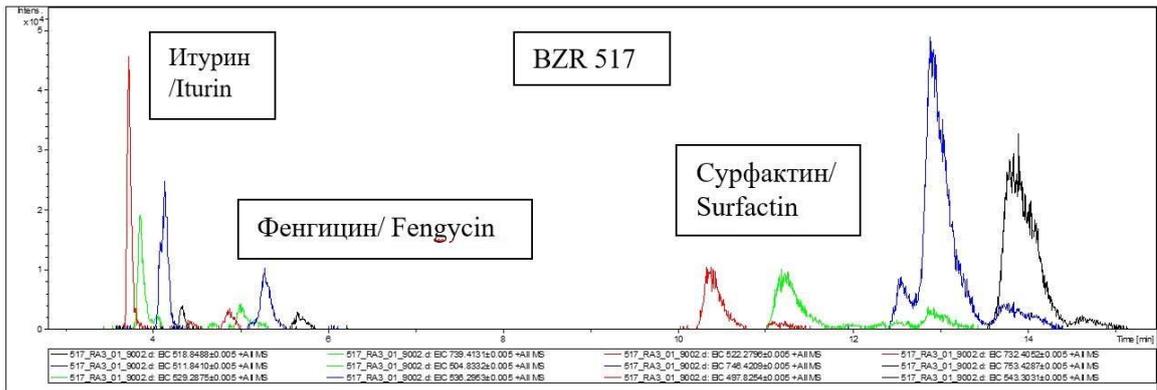
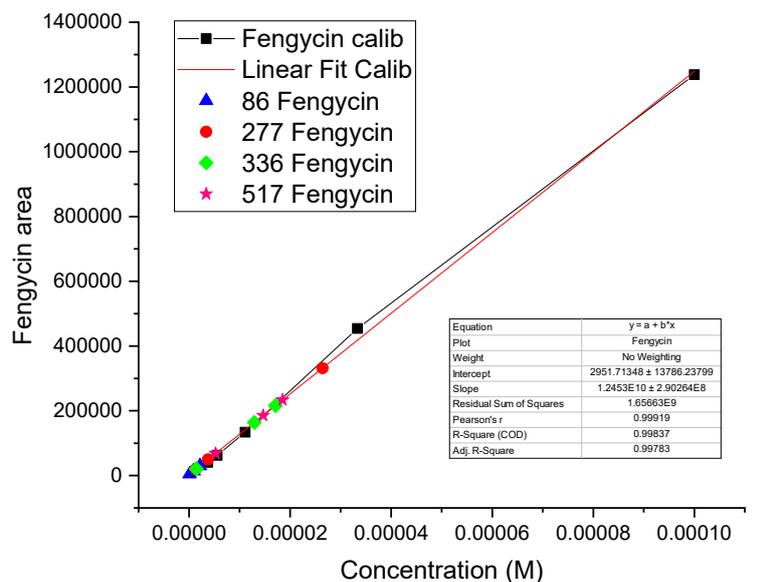
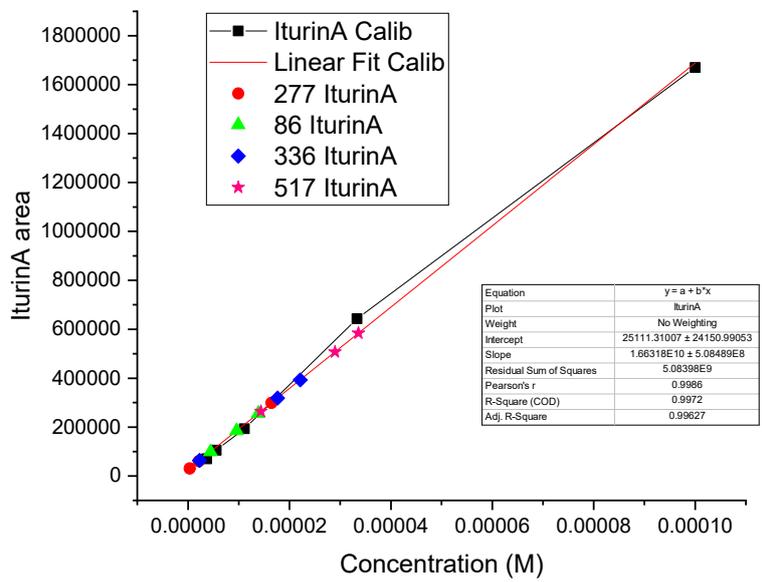


Рисунок 11. ВЭЖХ анализ метаболитов штамма *B. velezensis* BZR 517
Figure 11. HPLC analysis of metabolites of *B. velezensis* BZR 517



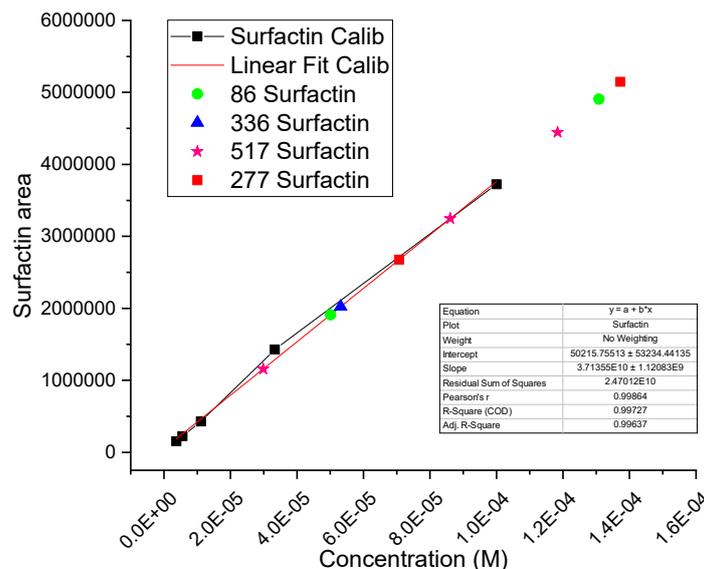


Рисунок 12. Количественный анализ метаболитов с применением калибровочных кривых
Figure 12. Quantitative analysis of metabolites using calibration curves

Таблица 1. Концентрация липопептидов, обладающих фунгицидным и фунгистатическим действием в отношении фитопатогенных грибов, в образцах метаболитов бактерий рода *Bacillus*

Table 1. Concentration of lipopeptides with fungicidal and fungistatic activity against phytopathogenic fungi in samples of metabolites of bacteria of the genus *Bacillus*

Штамм Strain	Концентрация сурфактинов, моль/л Concentration of surfactins, mol/l	Концентрация фенгицинов, моль/л Concentration of fengycins, mol/l	Концентрация итуринов, моль/л Concentration of iturins, mol/l
<i>B. siamensis</i> BZR 86	$(8,54 \pm 0,26) \times 10^{-6}$	$(7,23 \pm 0,84) \times 10^{-8}$	$(6,14 \pm 1,39) \times 10^{-7}$
<i>B. amyloliquefaciens</i> BZR 277	$(4,64 \pm 0,10) \times 10^{-5}$	$(1,18 \pm 0,11) \times 10^{-7}$	$(6,99 \pm 0,19) \times 10^{-7}$
<i>B. velezensis</i> BZR 336g	$(3,22 \pm 0,46) \times 10^{-5}$	$(1,43 \pm 0,06) \times 10^{-6}$	$(1,90 \pm 0,08) \times 10^{-6}$
<i>B. velezensis</i> BZR 517	$(9,79 \pm 0,20) \times 10^{-6}$	$(1,64 \pm 0,11) \times 10^{-6}$	$(3,60 \pm 1,05) \times 10^{-6}$

С использованием ВЭЖХ-МС анализа обнаружены все три липопептида, которые также проявлялись на биоавтограммах при выделении методом ТСХ. Количественный анализ с применением ВЭЖХ-МС позволяет констатировать, что штаммы *B. velezensis* BZR 336g и *B. amyloliquefaciens* BZR 277 продуцируют значительно больше сурфактина, чем *B. siamensis* BZR 86 и *B. velezensis* BZR 517. Содержание липопептидов итуриновой природы в ЖК штаммов *B. velezensis* BZR 517 и *B. velezensis* BZR 336g почти в 20 раз выше, чем в двух других. По способности продуцировать фенгицины штаммы *B. velezensis* BZR 517 и *B. velezensis* BZR 336g также опережают штаммы *B. siamensis* BZR 86 и *B. amyloliquefaciens* BZR 277.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этилацетатных экстрактах супернатантов ЖК исследуемых штаммов бактерий с помощью метода тонкослойной хроматографии обнаруживаются соединения липопептидной и фенольной природы. Метод биоавтографии с применением тест-культуры гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F6 позволяет обнаружить в экстрактах метаболитов штаммов *B. siamensis* BZR 86, *B. amyloliquefaciens* BZR 277, *B. velezensis* BZR 517, *B. velezensis* BZR 336g сурфактин, итурин и фенгицин.

Штамм *B. amyloliquefaciens* BZR 277 продуцирует наибольшее количество итурина, по сравнению с

остальными штаммами, что обнаруживается на биоавтограмме с тест-культурой гриба *F. oxysporum* var. *orthoceras* BZR F6. У штаммов *B. siamensis* BZR 86, *B. amyloliquefaciens* BZR 277, *B. velezensis* BZR 517, *B. velezensis* BZR 336g на биоавтограмме с тест-культурой гриба *Alternaria* sp. BZR F12 отсутствует зона ингибирования метаболитом итуриновой природы, что может свидетельствовать о его низкой концентрации в образцах. При изучении хроматографических профилей с применением ВЭЖХ-МС во всех образцах детектируются сурфактин, итурин и фенгицин. Количественный анализ с применением ВЭЖХ-МС анализа позволяет констатировать, что штаммы *B. velezensis* BZR 336g и *B. amyloliquefaciens* BZR 277 продуцируют значительно больше сурфактина, чем *B. siamensis* BZR 86 и *B. velezensis* BZR 517. Содержание липопептидов итуриновой природы в жидкой культуре штаммов *B. velezensis* BZR 517 и *B. velezensis* BZR 336g почти в 20 раз выше, чем в двух других. По способности продуцировать фенгицины штаммы *B. velezensis* BZR 517 и *B. velezensis* BZR 336g также опережают штаммы *B. siamensis* BZR 86 и *B. amyloliquefaciens* BZR 277.

В целом, проведенные исследования с использованием двух аналитических методов позволяют обнаружить, что исследуемые штаммы продуцируют все три антигрибных липопептида: сурфактин, итурин и фенгицин. Это весьма важно, поскольку идентифицированные метаболиты способны

не только подавлять фитопатогенные грибы индивидуально, но и усиливать антигрибной эффект за счет синергизма. Способность бактерий продуцировать значительное количество сурфактина и его гомологов является положительным фактом, поскольку данный липопептид может индуцировать устойчивость растений к фитопатогенам, а также усиливать биологическую активность других антигрибных метаболитов. Это позволяет сделать вывод о возможности использования всех четырех штаммов в качестве продуцентов эффективных биофунгицидов.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 21-76-00040, <https://rscf.ru/project/21-76-00040/>

Авторы выражают благодарность Международному томографическому центру Сибирского Отделения Российской Академии Наук за выполнение хроматографических профилей с применением метода ВЭЖХ-МС.

ACKNOWLEDGMENT

The study was supported by Russian Science Foundation grant No. 21-76-00040, <https://rscf.ru/project/21-76-00040/>
The authors express their gratitude to the International Tomographic Centre of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences for performing chromatographic profiles using the HPLC-MS method.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

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. V. 42. P. 721–738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
2. 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. N 1. С. 29–37. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.1.29rus>
3. Максимов И.И., Сингх Б.П., Черепанова Е.А., Бурханова Г.Ф., Хайруллин Р.М. Перспективы применения бактерий – продуцентов липопептидов для защиты растений (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2020. Т. 56. N 1. С. 19–34. <https://doi.org/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. Т. 285. P. 44–55. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00925
5. Dimkić I., Stanković S., Nišavić M., Petković M., Ristivojević P., Fira D., Berić T. The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains // *Frontiers in microbiology*. 2017. V. 8. P. 92–105. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00925
6. Асатурова А.М., Дубяга В.М. Штамм бактерий *Bacillus subtilis* для получения биопрепарата против фитопатогенных грибов. Пат. 2553518 РФ № RU2013151377/10А заявл. 20.11.2013; опубл. 20.06.2015.
7. УНУ «Технологическая линия для получения микробиологических средств защиты растений нового поколения». URL: <https://ckp-rf.ru/catalog/usu/671367/> (дата обращения: 15.02.2023)
8. Нетрусов Ф.И. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр «Академия», 2005. 608 с.
9. Сидорова Т.М., Асатурова А.М., Хомяк А.И., Томашевич Н.С. Выделение и характеристика антигрибных метаболитов штаммов *Bacillus subtilis* BZR 336g и *Bacillus*

- subtilis* BZR 517 модифицированным методом биоавтографии // *Сельскохозяйственная биология*. 2019. Т. 54. С. 178–185. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2019.1.178rus>
10. Hosh A., Cimpoiu C. Evaluation of various biological activities of natural compounds by TLC/HPTLC // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2020. V. 43. P. 305–318. <https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1725548>
 11. Yanshole V.V., Yanshole L.V., Snytnikova O.A., Tsentalovich Y.P. Quantitative metabolomic analysis of changes in the lens and aqueous humor under development of age-related nuclear cataract // *Metabolomics*. 2019. V. 15. Article number: 29. <https://doi.org/10.1007/s11306-019-1495-4>
 12. Бережная А.В., Евдокимова О.В., Валентович Л.Н., Сверчкова Н.В., Титок М.А., Коломиец Э.И. Молекулярно-генетический и функциональный анализ генома бактерий *Bacillus velezensis* БИМ в-439д // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55. N 4. С. 366–377. <https://doi.org/10.1134/S05551099190>
 13. Théâtre A., Cano-Prieto C., Bartolini M., Laurin Y., Deleu M., Niehren J., Fida T., Gerbinet S., Alanjary M., Medema M.H., Léonard A., Lins L., Arabolaza A., Gramajo H., Gross H., Jacques P. The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021. V. 2. N 9. Article number: 623701. DOI: 10.3389/fbioe.2021.623701
 14. Goswami M., Deka S. Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019. V. 178. P. 285–296. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.03.003

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. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
2. Sidorova T.M., Asaturova A.M., Khomyak 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) <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.1.29rus>
3. Maksimov I.I., Singh B.P., Cherepanova E.A., Burhanova G.F., Hajrullin R.M. 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) <https://doi.org/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
5. Dimkić I., Stanković S., Nišavić M., Petković M., Ristivojević P., Fira D., Berić T. The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in microbiology*, 2017, vol. 8, pp. 92–105. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00925
6. Asaturova A.M., Dubyaga V.M. *Shtamm bakterii Bacillus subtilis dlya polucheniya biopreparata protiv fitopatogennykh gribov* [A strain of *Bacillus subtilis* bacteria for obtaining a biological preparation against phytopathogenic fungi]. Patent 2553518 RF № RU2013151377/10A, 2015. (In Russian)
7. УНУ "Technological line for obtaining microbiological plant protection products of a new generation". Available at: <https://ckp-rf.ru/catalog/usu/671367/> (accessed 15.02.2023)
8. Netrusov F.I. *Praktikum po mikrobiologii* [Microbiology Workshop]. Moscow, Akademiya Publ., 2005, 608 p. (In Russian)

9. Sidorova T.M., Asaturova A.M., Khomyak A.I., Tomashevich N.S. Isolation and characterization of antifungal metabolites of *Bacillus subtilis* BZR 336g and *Bacillus subtilis* BZR 517 strains by modified bioautography method. *Agricultural biology*, 2019, vol. 54, pp. 178–185. (In Russian)
<https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.1.178rus>

10. Hosh A., Cimpoi C. Evaluation of various biological activities of natural compounds by TLC/HPTLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2020, vol. 43, pp. 305–318.
<https://doi.org/10.1080/10826076.2020.1725548>

11. Yanshole V.V., Yanshole L.V., Snytnikova O.A., Tsentalovich Y.P. Quantitative metabolomic analysis of changes in the lens and aqueous humor under development of age-related nuclear cataract. *Metabolomics*, 2019, vol. 15, article number: 29.
<https://doi.org/10.1007/s11306-019-1495-4>

12. Berezhnaya A.V., Yevdokimova O.V., Valentovich L.N., Sverchkova N.V., Titok M.A., Kolomiyets E.I. Molecular genetic

and functional analysis of the genome of *Bacillus velezensis* bacteria BIM in B-439D. *Applied biochemistry and microbiology*, 2019, vol. 55, no. 4, pp. 366–377.
<https://doi.org/10.1134/S0555109919013>

13. Théatre A., Cano-Prieto C., Bartolini M., Laurin Y., Deleu M., Niehren J., Fida T., Gerbinet S., Alanjary M., Medema M.H., Léonard A., Lins L., Arabolaza A., Gramajo H., Gross H., Jacques P. The surfactin-like lipopeptides from *Bacillus* spp.: natural biodiversity and synthetic biology for a broader application range. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, vol. 2, no. 9, article number: 623701. DOI: 10.3389/fbioe.2021.623701

14. Goswami M., Deka S. Biosurfactant production by a rhizosphere bacteria *Bacillus altitudinis* MS16 and its promising emulsification and antifungal activity. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019, vol. 178, pp. 285–296.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.003>

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Наталья С. Томашевич разработала научный дизайн и концепцию, написала статью. Татьяна М. Сидорова разработала концепцию, проанализировала и интерпретировала материал, написала статью. Валерия В. Аллаhverдян собрала материал. Анжела М. Асатунова разработала научный дизайн, откорректировала рукопись до подачи в редакцию. Все авторы в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Natalia S. Tomashevich undertook scientific design, concept development and writing of the article. Tatiana M. Sidorova undertook concept development, analysis and interpretation of the material, writing of the article. Valeria V. Allahverdyan collected material Anzhela M. Asaturova undertook scientific design and proofreading of the manuscript before submission to the Editor. 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>
 Валерия В. Аллаhverдян / Valeria V. Allahverdyan <http://orcid.org/0000-0002-8679-6139>
 Анжела М. Асатунова / Anzhela M. Asaturova <http://orcid.org/0000-0002-0060-1995>