

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«Южный федеральный университет»

На правах рукописи



Стаценко Варвара Николаевна

**Влияние генов с плеiotропным эффектом на эффективность
нерибосомального синтеза у споровых бактерий**

1.5.7. Генетика (биологические науки)

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук,
заведующий научной лабораторией
Празднова Евгения Валерьевна

Ростов-на-Дону - 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ	9
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1. Характеристика бактерий родов <i>Bacillus</i> и <i>Paenibacillus</i>	17
1.1.1. Бациллы	17
1.1.2. Пенибациллы	18
1.2. Вторичные метаболиты	20
1.2.1 Рибосомально синтезируемые метаболиты.....	21
1.2.2 Нерибосомально синтезируемые метаболиты	27
1.2.3 Поликетиды.....	36
1.3. Структурно-функциональная организация геномов родов <i>Bacillus</i> и <i>Paenibacillus</i>	40
1.4. Гены с плейотропным эффектом	41
1.4.1 Ген	42
1.4.2 Гены, участвующие в метаболизме углерода (<i>cspA</i> , <i>amyE</i> , <i>sfp</i>).....	43
1.4.3 Гены, участвующие в образовании биопленок (<i>abrB</i> , <i>spo0A</i>).....	46
1.4.3.3 Взаимодействия <i>Spo0A</i> , <i>CspA</i> , <i>AbrB</i> :.....	48
1.5 Практическое применение бактерий родов <i>Bacillus</i> и <i>Paenibacillus</i> в сельском хозяйстве	49
2.1.1. Штаммы микроорганизмов	54
2.1.2. Биосенсорные штаммы.....	55
2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	58
2.2.1 Микробиологические методы	58

2.2.2. Постановка биосенсорного теста	59
2.2.3 Молекулярно-генетические методы	61
2.2.4 Определение зеараленона методом ИФА	66
2.2.5 Биоинформатическая обработка данных	68
2.2.6 Статистическая обработка результатов.....	69
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	70
3.1. Отбор штаммов <i>Bacillus</i> и <i>Paenibacillus</i> для исследования. Определение спектра генов НРПС.....	70
3.2 Влияние мутаций в гене устойчивости к рифампицину (<i>rpoB</i>) на противогрибковую активность.....	71
3.3 Полногеномное секвенирование и изучение спектра мутаций штамма C76.2 Rif ⁺ в сравнении с исходным штаммом.....	93
3.4. Полногеномное секвенирование и сравнение <i>B. amyloliquefaciens</i> B-1895 и делеционного мутанта K15.....	99
3.5 Дифференциальная экспрессия генов, участвующих в метаболизме углерода (<i>csrA</i>) и генов, участвующих в образовании биопленок (<i>abrB</i>), на разных питательных средах	99
3.7 Изучение свойств штаммов, мутантных по <i>abrB</i>	117
ВЫВОДЫ	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	127
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	129

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

Сокращения на русском языке

АО	антиоксидантная активность
АМ	антимутагенная (ДНК-протекторная) активность
АС	анти-SOS-активность (способность подавлять SOS-ответ)
АТФ	аденозинтрифосфат
АФК	активные формы кислорода
ГМО	генетически модифицированный организм
ДИ	доверительный интервал
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИСП (ISR)	индуцированная системная резистентность растений (induced systemic resistance)
ИУК	индол-3-уксусная кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
ЛПС	липополисахарид
МБК	минимальная бактерицидная концентрация
МИК	минимальная ингибирующая концентрация
НРП	нерибосомальные пептиды
НРПС	нерибосомальная пептидсинтетаза (nonribosomal peptide synthetase)
ОП	оптическая плотность
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
ФЗ	Федеральный закон
ЭПС	экзопполисахарид(ы)

Сокращения и термины на английском языке

ABC-транспортёр	ATP-binding cassette transporter	—	АТФ-зависимый транспортный белок
ACP	acyl carrier protein	—	ацилпереносящий белок (домен НРПС/ПКС)

ANI average nucleotide identity — средняя нуклеотидная идентичность геномов

AT acyltransferase — ацилтрансфераза (домен поликетидсинтазы)

ATCC American Type Culture Collection — Американская коллекция типовых культур

BGC biosynthetic gene cluster — биосинтетический генный кластер

CAZymes carbohydrate-active enzymes — углевод-активные ферменты

CCR carbon catabolite repression — катаболитная репрессия углеводным метаболизмом

CDS coding sequence — кодирующая последовательность

CRISPR-Cas clustered regularly interspaced short palindromic repeats — система адаптивного бактериального иммунитета, используемая как инструмент геномного редактирования

DH dehydratase — дегидратаза (домен поликетидсинтазы)

DTT dithiothreitol — дитиотреитол

ER enoylreductase — еноилредуктаза (домен поликетидсинтазы)

GTDB Genome Taxonomy Database — база данных таксономии геномов

HPr histidine-containing phosphocarrier protein — гистидинсодержащий фосфопереносящий белок фосфотрансферазной системы

KS ketosynthase — кетосинтаза (домен поликетидсинтазы)

MALDI-TOF matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight — масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

MRSA methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* — метициллин-резистентный золотистый стафилококк

NGS next-generation sequencing — высокопроизводительное (полногеномное) секвенирование

NRPS nonribosomal peptide synthetase — нерибосомальная пептидсинтетаза

OD optical density — оптическая плотность

ORF open reading frame — открытая рамка считывания

PCP peptidyl carrier protein — пептидилпереносящий белок (домен НРПС)

PKS polyketide synthase — поликетидсинтаза

PPT / PPTases phosphopantetheinyl transferase(s) — фосфопантетеинилтрансфераза(ы), фермент(ы) активации доменов НРПС/ПКС

PTS phosphotransferase system — фосфотрансферазная система

QQ quorum quenching — подавление («гашение») кворум-сенсинга

QS quorum sensing — чувство кворума (межклеточная бактериальная коммуникация)

Rif^R rifampicin resistant — устойчивый к рифампицину (фенотип/мутант)

RNAP RNA polymerase — РНК-полимераза

SEM standard error of the mean — стандартная ошибка среднего

TE thioesterase — тиоэстераза (домен НРПС/ПКС, обеспечивающий высвобождение продукта)

Условные обозначения генов

abrB	ген глобального регулятора перехода из стадии активного роста в стационарную фазу и споруляции; регулятор образования биопленок
aiiA	ген лактоназы, гидролизующей N-ацилгомосеринлактоны (фермент кворум-гашения)
amyE	ген α -амилазы, маркерный ген в системе катаболитной репрессии
ccpA	ген каталитического белка-регулятора катаболитной репрессии углерода (catabolite control protein A)

cotA	ген белка оболочки споры, обладающего лакказной активностью
fusA	ген, входящий в кластер биосинтеза фузарицидина
pmxA, pmxB, pmxE (и др.)	гены оперона биосинтеза полимиксина
rocG	ген катаболической глутаматдегидрогеназы, регулируемый CsrA
rpoB	ген β -субъединицы РНК-полимеразы; мутации в гене определяют устойчивость к рифампицину
sfp	ген фосфопантетеинилтрансферазы, необходимой для активации НРПС/ПКС
spo0A	ген главного регулятора инициации споруляции
srfA	оперон биосинтеза сурфактина

Единицы измерения

°C	градус Цельсия
мкг/мл	микрограмм на миллилитр
мг/мл	миллиграмм на миллилитр
мкМ	микромоль на литр
мл	миллилитр
мин	минута
ч	час
п.н.	пара нуклеотидов
г	грамм

об/мин	оборотов в минуту
---------------	-------------------

Символы, используемые при статистической обработке данных

M	среднее арифметическое значение
$\pm$	знак «плюс-минус» (при среднем значении — интервал варьирования показателя)
α	уровень значимости
df	число степеней свободы
n	число независимых биологических повторностей
p	уровень статистической значимости
t	критическое значение (t-критерий) распределения Стьюдента
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Спорообразующие бактерии, прежде всего представители родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, известны как продуценты разнообразных вторичных метаболитов, с которыми связаны их антибактериальные, иммунодепрессивные, противогрибковые и противоопухолевые свойства (Grady E. N. et al., 2016). За счёт подавления фитопатогенных микроорганизмов, в том числе *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* и *Phytophthora aptisa*, бациллы и пенибациллы стимулируют развитие ряда сельскохозяйственных культур — огурцов, томатов, кукурузы и многих других (Naing K. W. et al., 2014).

B. subtilis хорошо известен производством циклических липопептидов, проявляющих сильную поверхностно-активную и антимикробную активность, таких как сурфактины, итурины и фенгицины. Известно несколько макролидов, полученных из поликетидов, а также нерибосомальных пептидов, дигидроизокумаринов и линейных липопептидов с антимикробными свойствами, что демонстрирует биосинтетический арсенал этой бактерии (Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M., 2019).

Ассоциированные с растениями виды *Paenibacillus* способны оказывать прямое стимулирующее действие на рост растений: они синтезируют индол-3-уксусную кислоту (ИУК) и другие ауксиновые фитогормоны, переводят недоступный фосфор в усвояемую корнями форму, а отдельные представители фиксируют и атмосферный азот (Weselowski et al., 2016). К азотфиксирующим относят более 20 видов этого рода. Помимо этого, *Paenibacillus* участвуют в подавлении фитопатогенов, индуцируя у растений системную резистентность (ISR) и/или образуя различные биоцидные соединения. ISR представляет собой защитную реакцию, формирующуюся в тканях растения и обеспечивающую повышенную устойчивость к широкому кругу патогенов. Эта реакция может реализовываться через накопление салициловой кислоты (SA-зависимый путь) либо по SA-независимому

механизму, сопровождающемуся усиленным отложением каллозы. У рода *Paenibacillus* способность вызывать ISR установлена для *P. polymyxa*, *P. alvei*, *P. elgii* и *P. lentimorbus* (Grady et al., 2016). Кроме того, показано, что представители *Paenibacillus* проявляют инсектицидную активность в отношении личинок насекомых-вредителей, в том числе жесткокрылых и чешуекрылых (Sharma et al., 2013; Neung et al., 2014).

Однако продукция целевых веществ в природных штаммах зачастую невысока и/или нестабильна, поэтому для использования данных штаммов в биопрепаратах и биотехнологии остро стоит проблема создания штаммов-высокоэффективных продуцентов. Одним из путей является воздействие на ключевые гены бактерий, имеющие множественные (плейотропные) эффекты.

Явление плейотропии возникает, когда один ген влияет на два или более фенотипических признака. Мутация в таком гене может оказывать влияние на несколько признаков одновременно из-за того, что продукт гена взаимодействует с несколькими другими белками или катализирует несколько реакций. Известно, что мутации в некоторых генах, таких, как *rpoB* (ген субъединицы критически важного фермента РНК-полимеразы), вызывают различные физиологические изменения у бактерий. Это связано с тем, что РНК-полимераза участвует в реализации генетической информации и таким образом влияет на работу всех остальных генов бактериального генома.

Например, у бактерий — продуцентов природных антибиотиков, в частности эритромицина (*Saccharopolyspora erythraea*) и ванкомицина (*Amycolatopsis orientalis*), отдельные мутации в гене *rpoB* способны повышать синтез соответствующих антибиотиков (Koch, 2014).

Было обнаружено, что каждое изменение аминокислоты в субъединице РНК-полимеразы приводит к собственному уникальному спектру воздействия на рост и развитие *Bacillus subtilis*, включая споруляцию, прорастание и способность к трансформации (Maughan, 2004). Также выяснено, что мутанты H485R и H485D продуцируют значительно большее количество итурина А по сравнению с диким штаммом, что обуславливает их противогрибковую

активность (Cai, 2017). Однако такие изменения не являются универсальными для всех бактерий.

Точечное воздействие на ген *groV*, как и на другие гены с плейотропным действием, представляется перспективным направлением в биотехнологии бактерий-продуцентов антибиотиков. Однако спектр эффектов такого воздействия на разных видах и штаммах *Bacillus* и *Paenibacillus* мало изучен и требует анализа с применением молекулярно-генетических методов, чтобы выбрать наиболее оптимальную стратегию для биоинженерии продуцентов и избежать нежелательных побочных эффектов.

В ранее выполненной дипломной работе (Стаценко В.Н., 2020) было изучено плейотропное действия гена *groV* на устойчивость к антибиотикам и синтез вторичных метаболитов. Однако мутации других бактериальных генов с плейотропными эффектами изучены недостаточно. Особенный интерес представляют гены-регуляторы, влияющие на экспрессию кластеров других генов. В данном диссертационном исследовании был расширен спектр изучаемых генов с плейотропным эффектом и штаммов-продуцентов, перспективных для биотехнологии.

Цель исследования

Целью данного исследования являлось изучение влияния генов с плейотропным эффектом на эффективность нерибосомального синтеза у споровых бактерий.

Задачи исследования

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. Получить мутантов, устойчивых к различным антибиотикам за счет изменений в ключевых генах с плейотропным эффектом, таких, как *groV*, с помощью мутагенеза и последующего отбора на селективных средах.
2. Изучить эффективность нерибосомального синтеза, продукцию полезных метаболитов и другие ключевые свойства у штаммов-мутантов по сравнению с диким типом.

3. Установить локализацию и характер мутаций в целевых генах, а также сопутствующих мутаций с помощью полногеномного секвенирования.

4. Изучить корреляцию экспрессии генов-регуляторов с плейотропным эффектом (*ccpA*, *abrB*) с эффективностью нерибосомального синтеза.

5. Провести сравнительную оценку влияния плейотропных мутаций в разных ключевых генах на образование и выход вторичных метаболитов и определить наиболее перспективные гены для будущих генно-инженерных модификаций.

Научная новизна работы

Современное сельскохозяйственное производство находится перед необходимостью одновременного решения двух ключевых задач: обеспечения надёжной защиты культурных растений от фитопатогенов, вредителей и сорной растительности, а также минимизации техногенной нагрузки на окружающую среду. В этом контексте одним из ведущих направлений в мировом растениеводстве становится биологизация земледелия — подход, направленный на последовательное сокращение применения химических средств защиты растений.

Особую актуальность в настоящее время приобретает поиск и создание новых штаммов-продуцентов вторичных метаболитов, перспективных для разработки на их основе биологических препаратов сельскохозяйственного назначения. Подобные биопрепараты открывают широкие возможности для повышения почвенного плодородия и проведения биоремедиации загрязнённых территорий, что в целом соответствует курсу на экологизацию аграрного производства. Развитие данного направления способно не только укрепить позиции России в области сельскохозяйственной биотехнологии, но и создать предпосылки для формирования новых экономических компетенций в сфере управления почвенными ресурсами.

В данной работе впервые получены Rif^R-мутанты штаммов *Bacillus* (*Bacillus amyloliquefaciens* B1895, *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933, *Bacillus*

subtilis C65A, C65B, *Bacillus spp.*- C15, C 49.1A, C 76.2, *Bacillus licheniformis* CL 33, CL 35, *Bacillus safensis* CL 56), и впервые охарактеризованы *abrB*-делеционные мутанты штамма *Bacillus amyloliquefaciens* B1895, с улучшенными антиоксидантными, ДНК-протекторными и противогрибковыми свойствами.

Установлена связь между мутациями в гене *abrB* и усилением антиоксидантной, антимутагенной и SOS-ингибирующей активности.

Впервые проведён сравнительный анализ влияния источников углерода (крахмал, пектин, глюкоза) на экспрессию гена *ssrA* у бацилл, установлена зависимость биосинтеза вторичных метаболитов от состава питательной среды.

Практическая значимость и внедрение результатов

1. Rif^R-мутанты штаммов *Bacillus* являются перспективной основой для получения постбиотических препаратов с улучшенными противогрибковыми и протекторными свойствами, не требующих прохождения процедуры сертификации ГМО.

2. *abrB*-делеционные мутанты штамма B1895 могут быть использованы в биотехнологическом производстве вторичных метаболитов с повышенной биологической активностью; вместе с тем их практическое применение потребует обязательной сертификации в соответствии с требованиями, предъявляемыми к генетически модифицированным организмам.

3. Полученные данные о влиянии источников углерода на экспрессию гена *ssrA* могут быть использованы при разработке оптимизированных питательных сред, обеспечивающих направленную регуляцию биосинтеза целевых метаболитов у бацилл.

4. Результаты работы имеют непосредственное прикладное значение: мутантные штаммы *Bacillus* планируются к внедрению в состав биопрепарата для свиноводства совместно с компанией-партнёром; производственные испытания запланированы на 2026 год.

Поскольку результаты настоящей работы могут быть использованы при разработке биологических средств защиты растений, они непосредственно соответствуют задачам обеспечения продовольственной безопасности и устойчивого развития аграрного сектора. Внедрение новых штаммов-продуцентов нерибосомальных соединений в практику позволит сократить зависимость от синтетических пестицидов, снизить экологическую нагрузку на агроэкосистемы и способствовать повышению продуктивности сельскохозяйственных культур.

В соответствии со Стратегией научно-технологического развития Российской Федерации одним из приоритетных направлений является переход к природоподобным технологиям, воспроизводящим механизмы живых систем. Настоящий проект в полной мере отвечает данному вектору, предусматривая применение биологических агентов для защиты растений, органично интегрируемых в функционирование природных экосистем.

Существенную роль в формировании нормативно-правовой базы отрасли сыграл Федеральный закон от 03.08.2018 № 280-ФЗ «Об органической продукции и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации». Данный закон регулирует весь цикл обращения органической продукции — от производства и хранения до транспортировки, маркировки и реализации — и закрепляет ключевые понятия в этой сфере. В числе основных ограничений при производстве органической продукции установлен запрет на использование агрохимикатов, пестицидов, антибиотиков, стимуляторов роста и откорма, гормональных препаратов, а также генетически модифицированных и трансгенных организмов и продукции на их основе.

Таким образом, применение биопрепаратов на основе бактериальных штаммов открывает возможность существенно сократить пестицидную нагрузку на сельскохозяйственные угодья и минимизировать негативные последствия использования химических средств защиты растений и удобрений для биосферы, что в полной мере согласуется с концепцией

ресурсосберегающего земледелия. Разработка отечественных препаратов и технологий защиты растений вносит вклад в укрепление технологического суверенитета страны и снижение зависимости от импортных решений — что приобретает особое значение в условиях внешнего санкционного давления и стратегической необходимости развития национального потенциала наукоёмких производств.

Задачи исследования предполагают проведение комплексного анализа и всесторонней характеристики коллекции штаммов споровых бактерий, обладающих хозяйственно ценными свойствами, в том числе пробиотической активностью, фитостимулирующим потенциалом, а также антимикробным и антифунгальным действием. В рамках работы получена линейка перспективных штаммов-продуцентов вторичных метаболитов нерибосомального происхождения, обеспечивающих антибактериальную, противогрибковую и противоопухолевую активность.

Положения, выносимые на защиту

1. Мутации в *rpoB*, приводящие к рифампицин-резистентности (Rif^R), значительно усиливают протекторную и противогрибковую активность штаммов за счет увеличения выхода вторичных метаболитов.

2. Делеция гена *abrB* снимает репрессию вторичного метаболизма и способствует усилению протекторных, антимутагенных и противогрибковых свойств.

3. Эпигенетическая регуляция синтеза вторичных метаболитов связана с углеродным катаболизмом (CCR); замена глюкозы в среде на сложные углеводы снижает интенсивность CCR и индуцирует продукцию биоактивных соединений (переключение стратегии на выживание: образование биопленки, конкуренция, усиление горизонтального переноса).

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на конференции в рамках II Школы молодых ученых ДГТУ, доклад «Influence of rifampicin-resistance mutations on the synthesis of antioxidant, DNA-protective, and SOS-inhibitory

metabolites» 21 октября, 2024 г., г. Ростов-на-Дону; III Школы молодых ученых ДГТУ, доклад «Regulation of Non-Ribosomal Peptide Synthesis Gene Expression in Spore-Forming Bacteria» 18 апреля, 2025 г., г. Ростов-на-Дону. А также на XIX Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития агропромышленного комплекса» («ИнтерАгро 2026») 25–27 февраля 2026 г., г. Ростов-на-Дону, доклад «Механизмы регуляции нерибосомального синтеза у споровых бактерий»; VIII Международном симпозиуме «Innovations in Life Sciences» 28-29 мая 2026, г. Белгород, тезисы «Регуляция нерибосомального синтеза у споровых бактерий»; II конференции Ростовского общества генетиков и селекционеров «Фундаментальные и прикладные аспекты генетики и селекции» 27 мая 2026 г., г. Ростов-на-Дону, тезисы «Инактивация гена *abrb* повышает продукцию вторичных метаболитов у бацилл».

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 157 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части и обсуждения результатов, выводов, списка литературы (174 источника). Работа иллюстрирована 49 рисунками и 12 таблицами.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 4 работы, 5 тезисов конференций, 2 патента, 1 база данных.

Конкурсная поддержка работы

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 25-66-00009, <https://rscf.ru/project/25-66-00009/>, а также программы «Приоритет-2030» в Молодежной лаборатории «Молекулярная генетика микробных консорциумов» и лаборатории «Биотехнологический кластер» Академии биологии и медицины им. Д. И. Ивановского Южного федерального университета (АБИМ ЮФУ), а также при поддержке гранта Российского научного фонда № 25-66-00009, <https://rscf.ru/project/25-66-00009/>.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*

1.1.1. Бациллы

По современным представлениям род *Bacillus* входит в семейство *Bacillaceae*. Это семейство было выделено на основе филогенетического анализа последовательности 16s-РНК и помимо рода *Bacillus* включает еще 18 различных родов (Vos et al., 2011). Род *Bacillus* включает в себя разнообразную группу бактерий, отличающихся общей чертой: способностью образовывать эндоспores при возникновении неблагоприятных условий роста. Использование *Bacillus* для стимуляции роста растений является областью с большим потенциалом для сельского хозяйства, поэтому данный род интенсивно изучается (Zeigler D. R., Perkins J. B., 2021). Непатогенная бактерия *Bacillus subtilis* с момента ее первой генетической трансформации, описанной в 1959 году, стала модельной системой для изучения многих аспектов биохимии, генетики и физиологии грамположительных бактерий, в частности споруляции (Harwood C. R., 1992).

Бациллы часто встречаются в почвах, способствуя переработке углерода и азота через производство и выделение ферментов, разлагающих крупные молекулы — протеаз, амилаз и целлюлоз. Также *Bacillus subtilis* и *Bacillus amyloliquefaciens*, важны для защиты растений от болезней и стимулирования их роста, поскольку эти бактерии способны эффективно заселять корневую систему (Празднова Е. В., Андриянов А. И., Васильченко Н. Г., 2018).

Обнаружено, что штаммы *Bacillus* GB-017 и GB-0356 производят противогрибковые вещества и подавляют *Botrytis cineria*, *Fusarium sp.*, *Pythium sp.* и *Rhizoctonia solani* (Kim H. S. et al., 2003). Штамм *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, колонизирующий корни растений, отличается своей способностью стимулировать рост растений и подавлять фитопатогены. Анализ генома FZB42 выявил наличие многочисленных кластеров генов, участвующих в синтезе нерибосомально синтезируемых циклических

липopeптидов и поликетидов с выраженным антимикробным действием (Chen X. H. et al., 2009).

Некоторые виды *Bacillus* (*Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilus*) входят в состав коммерческих пробиотических продуктов. Было обнаружено, что споры *B. pumilus* и штамма *B. subtilis* индуцируют противовоспалительный цитокин интерлейкин-6 в культивируемой линии макрофагальных клеток, а *in vivo* споры *B. pumilus* и *B. subtilis* индуцируют противовоспалительный цитокин фактор некроза опухоли-альфа. Штамм *B. pumilus* и штамм *B. cereus* (*B. cereus* var. *vietnami*) проявляют бактериоцин-подобную активность против других видов *Bacillus* (Duc L. H. et al., 2004).

1.1.2. Пенибациллы

Род *Paenibacillus* включает в себя виды бактерий, имеющие отношение к человеку, животным, растениям и окружающей среде. Первоначально виды *Paenibacillus* входили в состав рода *Bacillus*, который был описан еще в 1872 году на основании морфологии типового вида *Bacillus subtilis*. Однако после проведения филогенетического анализа в 1993 году был выделен самостоятельный род *Paenibacillus* с типовым видом *Paenibacillus polymyxa* (Grady et al., 2016).

Paenibacillus polymyxa (ранее *Bacillus polymyxa*), непатогенная и образующая эндоспоры бактерия, является одной из наиболее промышленно значимых факультативных анаэробных бактерий. Она встречается в природе в почве, ризосфере и корнях сельскохозяйственных культур и в морских отложениях. В течение последних двух десятилетий наблюдается растущий интерес к их экологическому и биотехнологическому значению, несмотря на их ограниченную геномную информацию. *P. polymyxa* обладает широким спектром свойств, включая фиксацию азота, стимуляцию роста растений, растворение фосфора в почве и производство экзополисахаридов, гидролитических ферментов, антибиотиков, цитокинина (Lal S., Tabacchioni S., 2009). Благодаря своей способности выживать в экстремальных условиях, включая высокую температуру, биоциды, давление и воздействие

ультрафиолета, эндоспоры могут переносить пастеризацию и сохраняться в промышленном оборудовании. *P. polymyxa* синтезирует ряд вторичных метаболитов, в том числе липопептид полимиксин, фузарицидины, пэнилипогептин, пэнилан и тридекаптин, которые рассматриваются как перспективные средства борьбы с инфекциями, обладающими множественной лекарственной устойчивостью, а также с другими патогенами растений и человека (Pandey A. K., Barbetti M. J., Lamichhane J. R., 2023).

Многие представители рода *Paenibacillus* оказывают прямое ростостимулирующее действие на сельскохозяйственные культуры за счёт биологической фиксации азота, растворения фосфатов, синтеза фитогормона индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) и выделения сидерофоров, способствующих усвоению железа. Наряду с этим они защищают растения от насекомых-фитофагов и фитопатогенов различной природы — бактерий, грибов, нематод и вирусов. Такая защита реализуется благодаря продукции разнообразных антимикробных и инсектицидных соединений, а также за счёт запуска защитной реакции растения, известной как индуцированная системная резистентность (ИСП). Антимикробные вещества, образуемые *Paenibacillus*, находят применение и в медицине; к ним относятся полимиксины и фузарицидины, представляющие собой нерибосомальные липопептиды (Grady et al., 2016).

Так, *P. polymyxa* 188 был выделен из образца морского осадка и показал отличную противогрибковую активность против многих грибов, патогенных для растений (*Fusarium tricinctum*, *Pestalotiopsis clavispora*, *Fusarium oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc), *Curvularia plantarum* и *Talaromyces pinophilus*) и для человека (*Aspergillus terreus*, *Penicillium oxalicum* и *Microsphaeropsis arundinis*). Всего в *P. polymyxa* 188 было идентифицировано 238 углевод-активных ферментов (CAZymes), а также два кластера генов антибиотиков, фузарицидин и тридекаптин (Shih S. Y. et al., 2024). У штамма *P. polymyxa* 2020, который производит большое количество экзополисахаридов

(до 68 г/л) были идентифицированы гены SacC (гликозидгидролаза) и sacB (левансахараза) (Liyaskina E. V. et al., 2021).

Благодаря эффективному производству ряда соединений, полезных в промышленных процессах, *P. polymyxa* является важным потенциальным биотехнологическим агентом. Несколько штаммов продуцируют ферменты, разрушающие клеточную стенку, такие как β -1,3-глюканазы, целлюлазы, хитиназы, протеазы, ксиланазы и β -глюкозидазы. Например, внеклеточные протеазы используются в формулах моющих средств, пищевой промышленности, обработке кожи, химическом синтезе и управлении отходами. Другим примером соединений, полезных в промышленности, являются микробные экзополисахариды (ЭПС), применяемые, среди прочего, для удаления ионов металлов при переработке минералов, производства косметики и пищевой промышленности (Langendries S., Goormachtig S., 2021). Продукты *P. polymyxa* также могут использоваться в медицине, где, например, фибринолитические ферменты могут разрушать фибрин в сгустках крови, чтобы помочь предотвратить или вылечить тромботические заболевания (Lu et al., 2007).

1.2. Вторичные метаболиты

Вторичные метаболиты представляют собой биологически активные вещества, синтезируемые бактериями в процессе жизнедеятельности. Эти соединения играют ключевую роль в межвидовых взаимодействиях микроорганизмов, защите от патогенов и адаптации к окружающей среде. В отличие от первичных метаболитов, необходимых для роста и размножения клеток, вторичные метаболиты не являются обязательными для выживания бактерии, однако обеспечивают ей конкурентное преимущество в экосистеме. Вопросы биосинтеза антибиотиков и генетического контроля этого процесса у бактерий-продуцентов подробно систематизированы и в отечественной литературе (Егоров, 1986).

Бактерии родов *Bacillus* и *Paenibacillus* производят широкий спектр вторичных метаболитов, как растворимых, так и летучих, которые обладают важными экологическими функциями. Последние достижения в области химического анализа и секвенирования генома значительно увеличили понимание их биохимической сложности (Tuc O. et al., 2017).

Большинство биоактивных соединений, синтезируемых бактериями в качестве вторичных метаболитов, являются низкомолекулярными продуктами и не являются необходимыми для роста производящих их организмов, а скорее агентами взаимодействия с другими организмами, в частности, растениями через их ризосферу и грибами. Взаимодействия почва-растение-микроб являются сложными мутуалистическими взаимодействиями, а высокое разнообразие бактерий в ризосфере и их адаптация к условиям стресса способствуют ускоренной эволюции новых биоактивных соединений (Pandey K. D. et al., 2021).

1.2.1 Рибосомально синтезируемые метаболиты

1.2.1.1. Лантибиотики

Катионный антимикробный пептид субтилин, продуцируемый штаммом *Bacillus subtilis* ATCC 6633, принадлежит к семейству лантиониновых антибиотиков, которое также включает пищевой консервант низин (E234). Субтилин продуцируется *B. subtilis* ATCC 6633 и включает два природных типа, субтилин и N-сукцинилизированный субтилин, который менее активен. Биосинтез лантиониновых антибиотиков включает посттрансляционные модификации синтезированных рибосомой пептидов-предшественников, которые приводят к образованию необычных аминокислот (например, лантионина, дегидроаланина и дегидробутирина). Субтилин проявляет антимикробную активность в наномолярном диапазоне против широкого спектра грамположительных бактерий (Parisot J. et al., 2008).

1.2.1.2. Бактериоцины

Бактериоцины представляют собой белки или рибосомальные пептиды с бактерицидной активностью по отношению к видам, которые часто тесно связаны с бактериями-продуцентами и демонстрируют изменчивую молекулярную массу, биохимические свойства, ингибирующие спектры и механизмы действия. Из-за их потенциального использования в качестве природных консервантов бактериоцины, продуцируемые молочнокислыми бактериями, стали предметом интенсивных исследований в последние годы. Представители *Bacillus* spp. также способны их синтезировать (Sansinenea E., Ortiz A., 2011).

Так, штамм *Bacillus*, продуцирующий бактериоцин-подобное вещество, был охарактеризован с помощью биохимического профилирования и секвенирования 16S рДНК. Антимикробное вещество подавляло патогенные и вызывающие порчу пищевых продуктов бактерии, такие как *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* и *Pasteurella haemolytica*. Оно было стабильным в широком диапазоне температур, но теряло активность при достижении температуры 121°C/15 мин (Lisboa M. P. et al., 2006).

Было описано несколько бактериоцинов, таких как лихенин, продуцируемый штаммом *B. licheniformis* 26-103RA, мегацин, продуцируемый штаммами *B. megaterium*, антилистериозный коагулин, продуцируемый *B. coagulans*, полиферментицин SCD, продуцируемый *B. polyfermenticus*, и цереин, продуцируемый штаммами *B. cereus* (Sansinenea E., Ortiz A., 2011). Более того, некоторые из этих бактериоцинов были указаны как потенциальные биоконсерванты в пищевых системах и напитках, как агенты биологического контроля фитопатогенов (Bais et al. 2004) и как предшественники антибиотиков.

1.2.1.3. Пеницидин А

Пеницидин А — гексациклический лантипептид, образуемый штаммом *P. polymyxa* NRRL B-30509. Он проявляет антагонистическую активность в отношении ряда грамположительных бактерий, включая *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* и *L. monocytogenes*.

Известен и пеницидин В, продуцируемый *Paenibacillus terrae* NRRL B-30644; при сходном с пеницидином А спектре действия он подавляет несколько более широкий круг грамположительных бактерий. Биосинтез пеницидина А обеспечивается геном *raeA*, расположенным в одном кластере с другими генами синтеза и транспорта лантибиотиков, среди которых дегидратаза (*raeB*) и циклаза (*raeC*). Экспорт пеницидина А осуществляют ABC-транспортёры, кодируемые генами *raeFEG* и *raeT* (Lohans et al., 2014).

1.2.1.4. Пенибациллин

Пенибациллин, образуемый штаммом *P. polymyxa* OSY-DF, относится к числу наиболее посттрансляционно модифицированных лантибиотиков (He et al., 2007). Его отличительной особенностью является наличие N-концевой ацетильной группы. Пенибациллин подавляет грамположительные бактерии, в том числе метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* и *Mycobacterium smegmatis* (Huang et al., 2014). Несмотря на то, что мишенью пенибациллина служат исключительно грамположительные микроорганизмы, в пределах этой группы он характеризуется достаточно широким спектром антимикробного действия.

1.2.1.5 Элгицин

Элгицин, продуцируемый штаммом *P. elgii* B69, представляет собой лантипептид с широким спектром антимикробного действия в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Его биосинтез определяется кластером генов (*elg*), включающим пять ORF — *elgT1*, *elgC*, *elgT2*, *elgB* и *elgA*, из которых *elgA* кодирует сам пептид. Гены *elgB* и *elgC* кодируют ферменты, осуществляющие посттрансляционную модификацию, а белки ElgT1 и ElgT2 обеспечивают транспорт элгицинов. У *P. elgii* B69 описаны четыре представителя семейства элгицинов: элгицин A1, A2, B и C (Teng et al., 2012).

1.2.1.6 Пенизин

Недавно у штамма A3 рода *Paenibacillus* sp., наиболее близкого по идентичности к *P. ehimensis*, был выявлен новый лантипептид — пенизин.

Предполагаемый кластер генов пенизина (*pen*) включает семь ORF: *penR*, *penD*, *penC*, *penT*, *penB*, *penA1* и *penA2*. Пенизин активен в отношении метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) и при этом лишён гемолитической активности. В отличие от большинства других лантибиотиков, он эффективно подавляет рост и грамотрицательных бактерий (Baindara et al., 2016).

1.2.1.7. Изокумарины

Метаболиты изокумаринового типа из микроорганизмов характеризуются аминосодержащим заместителем, который предположительно получен из лейцина, в 3-м положении в ядре дигидрокумарина. Известно несколько таких изокумариновых соединений, как бацифелацин, амикумадины и ксенокумарины, многие из них продуцируются родом *Bacillus* (Mondol M. A. M., Shin H. J., Islam M. T., 2013).

Два новых изокумарина, бацилосарцины А (35) и В (36), и три известных изокумарина, амикумадины А (37), В (38) и С (39), были выделены из культуральной жидкости морской бактерии *B. subtilis* TP-B0611. Штамм B0611 был выделен из кишечника сардины (*S. melanosticta*), собранной в заливе Тояма в Японии. Уровни активности, продемонстрированные соединениями 35 и 37, выше, чем у гербимицина А, мощного гербицидного соединения из *Streptomyces*, что позволяет предположить, что они могут быть полезными молекулами для регуляторов роста растений (Omura S. et al., 1979).

1.2.1.8. Жирные кислоты

Известно, что бактерии синтезируют жирные кислоты по классическому пути синтеза жирных кислот (FAS) с длиной цепи от C12 до C19 (Fang J., Kato S., 2007). Ряд новых изо-антеизо жирных кислот с длиной цепи между C11 и C19 и ряд линейных алкилбензольных жирных кислот с длиной цепи между C10 и C14 были получены из галофильных *Bacillus* sp. (Carballeira N. M. et al., 2001).

Изоляция морской *Bacillus* sp. 09ID194, культивируемой в модифицированной среде бульона Беннетта, дала шесть новых ненасыщенных

гидроксигирных кислот, названных иодомицинами А–D и линиеодолидами А и В. Продуцирующий штамм был выделен из образца осадка, собранного в Иеодо, южном рифе Республики Корея. Соединения проявили антимикробную активность против *B. subtilis* и *E. coli* с МИК 32–64 мкг/мл, но показали слабое ингибирование роста дрожжей *S. cerevisiae* с МИК 128–256 мкг/мл. (Mondol M. A. M. et al., 2011).

1.2.1.9. Ферменты

Bacillus spp. являются доступным источником ферментов благодаря их широкому распространению, безопасности в работе, простоте культивирования и восприимчивости к генетическим трансформациям. Особый интерес исследователей вызывают протеолитические ферменты, которые составляют одну из самых разнообразных по свойствам групп микробных белков. Уникальные свойства бациллярных протеиназ, такие как стабильность в широком диапазоне температур и pH, высокая специфичность, биоразлагаемость широкого спектра субстратов и высокий потенциал секвенированных геномов *Bacillus*, являются мощной основой для разработки новых биотехнологий (Danilova I., Sharipova M., 2020). Щелочная сериновая протеаза (DNAP) из *Bacillus pumilus* BA06 является типичным мезофильным ферментом, который продемонстрировал большой потенциал в различных промышленных применениях (Zhao and Feng, 2018). Фибринолитические протеазы, полученные из представителей рода *Bacillus* нашли свое применение в медицине. Менее двух десятилетий назад в России на основе субтилазы *B. subtilis* был разработан ферментный препарат тромбовазим, который применяется для лечения острого инфаркта миокарда и нестабильной стенокардии (Plotnikov M. V. et al., 2009). Амилазы и протеазы из бацилл вводятся в мультиферментные комплексы на основе ферментов, которые улучшают пищеварительную функцию, дополняя действие аналогичных эндогенных желудочно-кишечных ферментов у птиц. Источниками этих ферментов обычно являются *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* и *B. subtilis* (Contesini et al., 2018).

Пенибациллы образуют разнообразные ферменты, разрушающие клеточную стенку. Так, штамм *P. peoriae* NRRL BD-62 не только эффективно фиксирует молекулярный азот, но и продуцирует хитиназы и протеазы (Von der Weid et al., 2003). Гидролитические ферменты *Paenibacillus* способны разрушать клеточные стенки грибов и оомицетов. У нитчатых грибов клеточная стенка содержит значительную долю β -1,3-глюкана и хитина, тогда как у оомицетов она построена преимущественно из β -1,3-глюкана, β -1,6-глюкана и целлюлозы; при этом в обоих случаях на белок приходится до 11 % её состава (Grady et al., 2016). Установлено, что различные почвенные виды *Paenibacillus* выделяют глюканазы, хитиназы, целлюлазы и протеазы, участвующие в деградации клеточных стенок эукариот. В частности, ферментный экстракт *P. ehimensis* KWN38 нарушает морфологию гиф и подавляет рост фитопатогенов *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* и *Phytophthora capsici* (Naing et al., 2014). Показано также, что глюканазы и хитиназы штаммов *P. ehimensis* IB-X, *P. ehimensis* MA2012 и *P. polymyxa* A21 повреждают структуры клеточной стенки и/или ингибируют *R. solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* и *Drechlera sorokiniana* (Grady et al., 2016; Seo et al., 2016).

1.2.1.10. Летучие органические соединения

Летучие органические соединения (ЛОС), продуцируемые микроорганизмами, обладают большим противогрибковым потенциалом против почвенных грибовых патогенов. Были идентифицированы ЛОС, продуцируемые штаммом *Paenibacillus polymyxa* WR-2 в присутствии корневых экссудатов и органических удобрений, которые подавляли рост *F. oxysporum* на 38%, 36% и 40% в агаризованной среде, стерилизованной почве и естественной почве соответственно (Raza et al., 2015). Также из *Paenibacillus elgii* НОА73 был выделен метил-2,3-дигидроксibenзоат (M2,3D, который обладает противогрибковой активностью против *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* и *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Lee et al., 2017). Бактериальные летучие вещества играют важную роль в

стимулировании роста растений, регулируя синтез или метаболизм фитогормонов. Так, наблюдалось значительное увеличение биомассы растений при применении ЛОС (альбутерола и 1,3-пропандиола), продуцируемых штаммом ризобактерии *Bacillus subtilis* SYST2 (Tahir H. A. S. et al., 2017). Пиразин (2,5-диметил), бензотиазол, фенол (4-хлор-3-метил) и фенол-2,4-бис (1,1-диметилэтил), выделяемые *B. velezensis* ZSY-1, значительно снижают *in vitro* рост *B. cinerea* и *A. solani*, возбудителей серой гнили и ранней гнили у томатов. Другое исследование показало, что ЛОС, продуцируемые штаммом *B. subtilis* CF-3, подавляли тяжесть заболевания бурой гнилью после сбора урожая, вызываемой *M. fructicola*, у персиков (Gao et al. 2017, Gao et al. 2018). Было показано, что ЛОС, продуцируемые *Bacillus* и *Paenibacillus* обладают свойствами биологического контроля и стимуляции роста растений, а их использование в сельском хозяйстве может потенциально привести к разработке новых стратегий борьбы с болезнями (Poulaki E. G., Tjamos S. E., 2023).

1.2.2 Нерибосомально синтезируемые метаболиты

1.2.2.1. Нерибосомальные пептиды

Нерибосомальные пептиды (НРП) представляют собой разнообразный класс вторичных метаболитов, продуцируемых преимущественно как бактериями и грибами, а также иногда встречающихся у высших организмов, часто синтезируемых бактериальными симбионтами внутри них. В отличие от типичных пептидов, синтезируемых рибосомами с использованием РНК в качестве матрицы, НРП синтезируются крупными модульными ферментными комплексами, называемыми нерибосомальными пептидсинтетазами (НРПС). Эти синтетазы работают независимо от рибосомы и мРНК, собирая пептиды путем последовательного добавления аминокислот через ферментативные модули, каждый из которых отвечает за включение определенного остатка (Harwood, 2018).

Структурно НРП часто имеют циклическую, разветвленную или полициклическую архитектуру и включают в себя широкий спектр

строительных блоков, помимо 20 стандартных протеиногенных аминокислот. Они могут содержать непротеиногенные аминокислоты, такие как D-аминокислоты, метилированные, гидроксильные, гликозилированные, ацилированные, галогенированные или иным образом модифицированные остатки. Это структурное и химическое разнообразие обуславливает широкий спектр биологических функций и фармакологической активности. К нерибосомным пептидам относятся многие биологически важные соединения, такие как антибиотики (например, пенициллин, ванкомицин, даптомицин), иммунодепрессанты (например, циклоспорин), цитостатики, сидерофоры, токсины и пигменты (Süssmuth R. D., Mainz A., 2017).

Молекулярная структура НРПС организована в отдельные модули, каждый из которых отвечает за включение одной аминокислоты в растущую пептидную цепь. Каждый модуль обычно состоит из нескольких каталитических доменов:

1. Домен аденилирования (А): Этот домен выбирает и активирует специфический аминокислотный субстрат, образуя промежуточный аминокислотаденилат. Он имеет двухдольчатую структуру, гомологичную таким ферментам, как ацил-КоА-синтетаза, и содержит гибкую фосфатсвязывающую петлю для взаимодействия с АТФ.

2. Домен пептидилпереносающего белка (РСР): РСР представляет собой небольшой белковый домен, состоящий из пучка четырёх альфа-спиралей. Простетическая группа 4'-фосфопантетеина ковалентно связана с консервативным остатком серина на РСР и образует гибкое плечо, которое, подобно маятнику, переносит связанный через тиоэфирную связь пептидный интермедиат между активными центрами каталитических доменов в процессе сборки пептида.

3. Конденсационный (С) домен: Этот домен катализирует образование пептидной связи между аминокислот- или пептидил-РСР интермедиатами. Он обычно имеет псевдодимерную структуру, напоминающую

хлорамфениколацетилтрансферазу, и содержит канал, опосредующий подход к субстрату и образование связи.

Дополнительные домены в модулях НРПС могут включать:

- Домен эпимеризации (Е) для стереохимических модификаций, превращающих L-аминокислоты в D-аминокислоты.
- Домен гетероциклизации (Су), образующий гетероциклические кольца, такие как тиазолины и оксазолины.
- Тиоэстеразный (ТЕ) домен, обычно расположенный в последнем модуле, который высвобождает и часто циклизует готовый пептид (Duban M., Cociancich S., Leclère V., 2022).

Модули НРПС обладают большой конформационной гибкостью, что позволяет им динамически перестраиваться в процессе сборки пептидов. Анализ их кристаллических структур показывает, что домены организованы таким образом, что домен РСР может переносить промежуточные продукты между каталитическими центрами внутри модуля и к следующему модулю в сборочной линии (Reimer J. M. et al., 2018).

1.2.1.1.1 Полимиксины

Полимиксины — это декапептиды, в составе которых присутствует от пяти до шести остатков Dab, что обуславливает их положительный заряд. Впервые кластер генов *ptx*, отвечающий за биосинтез полимиксина, был обнаружен у бактерии *P. polymyxa* E681. В состав кластера *ptx* входят пять генов:

- *ptxA*, *ptxB* и *ptxE* — кодируют полимиксин-синтетазу;
- *ptxD* и *ptxC* — участвуют в транспорте полимиксина (Aleti et al., 2015).

Описано более 15 разновидностей полимиксинов, различающихся аминокислотным составом, в том числе полимиксины А, В, VI, С, D, E1 (колистин А), E2 (колистин В), F, М (маттацин), S1 и T1. Полимиксин В, в свою очередь, является смесью нескольких компонентов — полимиксинов В1, В1-І,

B2, B3 и B6, которые имеют идентичную структуру и отличаются лишь вариабельной жирнокислотной группой (Cochrane, Vederas, 2016).

Большинство полимиксинов демонстрируют выраженную антимикробную активность в отношении практически всех грамотрицательных бактерий. Исключение составляют представители родов *Proteus* и *Neisseria*. Кроме патогенных для человека микроорганизмов, к действию полимиксинов чувствительны также фитопатогенные бактерии — *E. amylovora* и *P. carotovorum* (Niu et al., 2013).

Из всех полимиксинов только полимиксин В и колистин были введены в клиническую практику в 1950-х годах, поскольку они оказались наименее нефротоксичными. В конечном итоге эти антибиотики утратили свою популярность, и их системное применение сократилось из-за значительных побочных эффектов, особенно потенциальной нефротоксичности и нейротоксичности. Тем не менее, интерес к полимиксину В и колистину существенно возрос за последние два десятилетия в связи с появлением мультирезистентных грамотрицательных организмов, невосприимчивых к другим клинически доступным антибиотикам (Ayoub Moubareck C., 2020).

Полимиксины — это антибиотики последнего резерва, обладающие мощной активностью против мультирезистентных патогенов. Они взаимодействуют с липополисахаридом (ЛПС) в бактериальных мембранах. Обнаружено, что полимиксины образуют кристаллические структуры, что коррелирует с антибиотической активностью и отсутствует в штаммах, устойчивых к полимиксинам. Параметры кристаллической решетки изменяются при изменении молекул ЛПС и полимиксина. Количественные измерения показывают, что кристаллические структуры уменьшают толщину мембраны и увеличивают ее площадь, а также жесткость. В совокупности механизм действия полимиксинов заключается в образовании жестких кристаллов ЛПС-полимиксина и последующего разрушения мембраны (Manioglu S. et al., 2022).

1.2.1.1.2 Сурфактины

Сурфактины представляют собой циклические гептапептиды, характеризующиеся существенными вариациями в аминокислотном составе; их циклизация осуществляется за счёт сложноэфирной связи. Общей чертой всех сурфактинов выступает наличие хиральной последовательности LLDLLDL. Молекула сурфактина включает два структурных домена: полярную область небольшого размера, сформированную остатками глутаминовой и аспарагиновой кислот (позиции 1 и 5); гидрофобный домен, образованный остатком валина в позиции 4 (Празднова, 2018). Генетический контроль синтеза сурфактина обеспечивается опероном *srfA*, который содержит четыре гена: *srfAA*, *srfAB*, *srfAC* и *srfAD* (Nakano, 1991). Ген *srfA* состоит из четырех ORF (*srfAORF1*–*srfAORF4*) с промоторной последовательностью на 5'-конце *srfAORF1* и прилегающей последовательностью терминатора транскрипции в конце *srfAORF*. Сурфактинсинтетаза состоит из четырех ферментативных модулей (Rahman F. B. et al., 2021).

Подобно многим липопептидам, сурфактины проявляют противомикробную активность, реализуемую посредством нарушения целостности клеточных мембран. Механизм действия зависит от концентрации вещества: в высоких концентрациях сурфактин функционирует по типу детергента; в умеренных концентрациях он способствует формированию ионопроводящих пор в мембране клетки. Проникновение сурфактина через мембрану облегчается за счёт связывания с ионами Ca^{2+} . Кроме того, сурфактин способен обеспечивать транспорт иных одновалентных и двухвалентных катионов через клеточный барьер, что ведёт к подавлению активности циклической АМФ-фосфодиэстеразы. Благодаря широкому спектру биологической активности сурфактины обладают значительным потенциалом для применения в медицине (Cochrane, Vederas, 2016).

Сурфактин синтезируется представителями комплекса видов *Bacillus subtilis*, и её близкородственных видов, таких как *B. subtilis subsp. subtilis*, *B.*

subtilis subsp. spizizenii, *B. subtilis subsp. inaquosorum*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*. Кроме того, что функционирует как биосурфактант и сигнальная молекула, сурфактин также обладает антибактериальными, противовирусными, противоопухолевыми свойствами и способностью повышать устойчивость растений к болезням (Qiao J. et al., 2024).

Так, сурфактин продемонстрировал антибактериальное действие на *S. aureus*, минимальная ингибирующая концентрация (МИК) и минимальная бактерицидная концентрация (МБК) сурфактина составили 1,6 и 3,2 мг/мл соответственно (Dai C. et al., 2025).

В работе Rahman L. et al., 2023 впервые продемонстрировано применение покрытых сурфактином наночастиц серебра в качестве эффективного антибактериального и антибиопленочного средства против лекарственно-устойчивой бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Исследования *in vivo* не выявили значительного поверхностного раздражения кожи, отека и эритемы, а микроскопический анализ показал, что покрытые сурфактином наночастицы серебра не вызывали патологических изменений при применяемых концентрациях, что подтверждает потенциальное использование покрытых сурфактином наночастиц серебра для лечения бактериальных инфекций.

1.2.1.1.3 Итурины

Итурины представляют собой класс циклических некатионных липопептидов (LP), который преимущественно выделяют из представителей рода *Bacillus* (Aleti et al., 2015). Помимо этого, известен родственный тип итурина — пениларвин, который продуцируется патогеном медоносных пчёл *Raenibacillus larvae*. Генетический кластер, предположительно ответственный за биосинтез пениларвина, содержит четыре открытые рамки считывания (ORF): c18780, c18770, c18760 и c18750. Соединение проявляет фунгицидную активность в отношении патогенных мицелиальных грибов и дрожжей. Хотя молекулярный механизм действия пениларвина остаётся невыясненным,

существует гипотеза о его способности повышать проницаемость клеточных мембран грибов (Sood et al., 2014). Итурин демонстрирует структурные различия внутри своего семейства, сохраняя при этом общую циклическую пептидную структуру, состоящую из семи α -аминокислот и одной β -аминокислоты.

Итурин А, высокоэффективный липопептид из семейства итуринов, продемонстрировал значительные противогрибковые свойства и минимальную токсичность, поэтому он представляет собой перспективного кандидата для применения в разработке биопестицидов и лечении микозов (Yaraguppi D. A. et al., 2023). Итурин А оказывает значительное ингибирующее действие на *C. albicans*. Минимальная ингибирующая концентрация итурина А против *C. albicans* была определена как 25 мкг/мл как в среде YEPD, так и в среде RPMI-1640. Итурин А эффективно ингибировал образование гиф *C. albicans*, снижал жизнеспособность клеток в биопленках, повышал проницаемость клеточной мембраны и нарушал адгезию клеток *in vitro* (Han D. et al., 2024).

Также продуценты итурина А могут стать потенциальным решением для биологического контроля плесневого загрязнения. Создан эффективный штамм *B. amyloliquefaciens* BAX-bac3, продуцирующий итурин А, анализы на агаровых пластинах *in vitro* показали, что повышенный синтез итурина А значительно усиливает противогрибковую активность против *Penicillium chrysogenum* и *Penicillium expansum*, двух распространенных патогенных грибов (Zhang D. et al., 2025). Установлено, что итурин А из *Bacillus amyloliquefaciens* оказался эффективным антагонистом *A. niger* (Wang S. et al., 2024).

1.2.1.1.4 Фузарицидины

Фузарицидины — это группа циклических гексапептидов, продуцируемых микроорганизмом *Paenibacillus polymyxa*. Их структурная особенность заключается в наличии сложноэфирной связи, формирующейся между аминокислотным остатком L-Thr1 и С-концевым остатком D-Ala.

N-концевая часть молекулы ацилирована липидным фрагментом — 15-гуанидино-3-гидроксипентадекановой кислотой. Биосинтез фузарицидинов контролируются генным кластером *fus*, включающим восемь генов (от *fusA* до *fusH*). Согласно имеющимся данным, к настоящему времени выделено и подробно охарактеризовано более 20 структурных вариантов этих соединений (Vater et al., 2015).

Антимикробное действие фузарицидинов отличается выраженной избирательностью: представители групп А–D высокоэффективны против грамположительных бактерий и грибов, нарушая целостность клеточных мембран, тогда как в отношении грамотрицательных бактерий их активность заметно ниже. Практическая ценность фузарицидинов в защите сельскохозяйственных культур от ряда фитопатогенов подтверждена экспериментально: предотвращение фузариозного увядания арбузов (Raza et al., 2009); сдерживание развития чёрной ножки канолы, вызываемой *Leptosphaeria maculans* (Beatty, Jensen, 2002); подавление фитофтороза красного перца (Lee et al., 2013); антагонизм в отношении *Botrytis cinerea* — возбудителя серой гнили огурцов и томатов (Tsai et al., 2022); а также эффективность против антракноза плодов манго и клубники, вызываемого грибами рода *Colletotrichum* (Sun C. et al., 2026; Lee B. Y. et al., 2026). Кроме того, показано, что фузарицидин А ингибирует прорастание конидий *F. sacchari*, вызывая существенные сдвиги в клеточной физиологии и экспрессии генов: нарушение проницаемости плазматической мембраны и повышение частоты апоптоза спор, сопровождающееся избыточным накоплением активных форм кислорода (АФК) в митохондриях (Jiang A. et al., 2026).

1.2.1.1.5 Фенгицины

Биологически активный циклический липопептид фенгицин синтезируется под контролем оперона *fen*, состоящего из пяти генов (*fenC*, *fenD*, *fenE*, *fenA*, *fenB*). Согласно данным Sur (2018), структурно соединение представляет собой анионный циклический декапептид с присоединённой к N-концу β-гидроксигирной кислотой. Аминокислотный состав пептидной

части включает: две молекулы L-глутаминовой кислоты, D-орнитин, две молекулы D-тирозина, D-аланин, L-пролин, L-глутамин, L-тирозин и L-изолейцин. Формирование пептидного кольца осуществляется посредством лактоновой связи, образующейся между гидроксильной группой (ОН-группой) тирозина в третьем положении и карбоксильной группой (COOH-группой) изолейцина в десятом положении.

Фенгицин был первоначально обнаружен у *B. subtilis* F-29-3 в виде двух изоформ, которые получили названия фенгицин А и фенгицин В на основании различия в шестой аминокислотной позиции. Впоследствии фенгицин S и фенгицин С были обнаружены у *Bacillus amyloliquefaciens* LSC04 и *B. subtilis* EA-SB0015 соответственно. Кроме того, плипастатин А и плипастатин В, выделенные из ферментационной среды *Bacillus cereus* BMG302-fF67, также относятся к семейству фенгицинов (Yin Y. et al., 2024).

Фенгицин проявляет более выраженный антагонистический эффект в отношении нитевидных грибов по сравнению с сурфактином и итурином А, поэтому его можно использовать для лечения различных болезней растений вместо химических пестицидов (Ding L., Guo W., Chen X., 2019). Фенгицин действует на фосфолипидный бислой клеточной мембраны, вызывая структурные повреждения и изменяя ее проницаемость, что может привести к утечке клеточного содержимого и, в конечном итоге, к гибели клетки (Deleu M., Paquot M., Nylander T., 2008).

По сравнению с синтетическими антибиотиками, фенгицин обладает высокой противогрибковой эффективностью, низкой токсичностью и отличной биоразлагаемостью, что делает его перспективной альтернативой антибиотикам. Фенгицин оказывает ингибирующее действие на *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum*, *Venturia inaequalis*, *Aspergillus flavus* и др. (Chen M. et al., 2025). Доказано, что фенгицин оказывает значительное ингибирующее действие на *Rhizopus stolonifer* и *Alternaria alternata*, которые вызывают гниль (Ahmad T. et al., 2023). Поэтому его можно использовать для консервации фруктов, таких как вишня, яблоки и

персики. Обнаружено, что фенгицин В ингибирует рост *F. oxysporum* FJAT-31362, который вызывает фузариозное увядание-распространенное грибковое заболевание, которое наносит серьезный ущерб сельскохозяйственной продукции (Deng Y. et al., 2024).

Также была выявлена противораковая активность в отношении роста клеток рака легких человека, клеток рака толстой кишки человека и клеток лейкемии человека (Cheng W. et al., 2016; Bagewadi Z. K. et al., 2026).

1.2.3 Поликетиды

Поликетиды синтезируются из простых строительных единиц путем повторяющихся циклов декарбоксилирования и конденсации на ферментах поликетидсинтазах (ПКС). Аппарат ПКС включает три ключевых домена: ацилтрансферазу (АТ), ацил-переносящий белок (АСР) и кетосинтазу (KS). Домен АТ обеспечивает активацию и перенос простой строительной единицы — малонил-кофермента А — на домен АСР (Aleti G., Sessitsch A., Brader G., 2015). Домен KS катализирует декарбоксилирование и конденсацию двух связанных с АСР малонатов. К дополнительным доменам относятся кеторедуктазы (KR), формирующие гидроксигруппы; дегидратазы (DH), образующие двойные связи за счёт отщепления воды; еноилредуктазы (ER), восстанавливающие двойные связи; и метилтрансферазы (MT), вводящие метильные группы и разветвления в углеродный скелет. Для активации доменов АСР необходима фосфопантетеинилтрансфераза (PPT), кодируемая геном *sfp* (Chen X. H. et al., 2006).

Разнообразие синтезируемых поликетидов (РК) определяется взаимным расположением и последовательностью каталитических доменов в ПКС. По организации этих доменов ферменты ПКС принято разделять на три типа. У ПКС I типа модули объединены в несколько каталитических доменов в составе единого белка, осуществляющих декарбоксилирование и конденсацию для сборки РК из стартовой единицы — малонил-КоА. У ПКС II и III типов каталитические домены располагаются в отдельных белках (Shen B., 2003). Значительная часть бактериальных поликетидов синтезируется именно

модульными ферментами ПКС I типа, содержащими итеративные домены KS, ACP и модифицирующие домены. Как правило, такие ПКС лишены собственных АТ-доменов в составе кластеров, и перенос малонил-КоА обеспечивается ацилтрансферазами. Нередко ПКС встречаются совместно с НРПС, образуя гибридные ферменты типа ПКС-НРПС I типа (Hertweck C., 2009).

1.2.3.1 Бациллин

Бациллин — это полиеновый антибиотик, продуцируемый штаммами *B. subtilis* и *B. amyloliquefaciens*, который избирательно ингибирует биосинтез белка у прокариот. Бациллин представляет собой линейную молекулу, состоящую из высококонъюгированного гексаена, связанного с альфа-гидроксикарбоновой кислотой, и конъюгированного триена двумя амидными связями (Olshevska S., Nickzad A., Déziel E., 2019). Биосинтез бациллина описан у *B. amyloliquefaciens* FZB42 и кодируется гибридным кластером генов ПКС - НРПС *bae*. Кластер генов *bae* содержит пять длинных открытых рамок считывания (ОРС): *baeJ*, *baeL*, *baeM*, *baeN* и *baeR* (Aleti et al. 2015).

Известно, что бациллин обладает антимикробной активностью против широкого спектра бактерий. Так, зона ингибирования роста под воздействием бациллаена наблюдалась у таких штаммов, как *Klebsiella pneumoniae* SC 1 0440, *Proteus vulgaris* SC9416, *Serratia marcescens* SC9783, *Bacillus thuringiensis* SC2928, *Staphylococcus aureus* SC240 (Müller S. et al., 2014; Bogdanova et al., 2022). В исследованиях со штаммом *Bacillus subtilis* PS-216 было обнаружено, что этот поликетид предотвращает адгезию и образование биопленок *Campylobacter jejuni* на абиотических поверхностях. Аналогично, *B. subtilis* PS-216 ингибирует рост и образование биопленки *Salmonella enterica* Typhimurium SL1344. В дополнение к этим антимикробным свойствам, было также показано, что бациллаен обеспечивает устойчивость *B. subtilis* против *Mycobacterium xanthus* (Bayona D. E. et al., 2026).

1.2.3.2 Макролактины

Макролактинны были выделены из *B. amyloliquefaciens* FZB42, почвенной бактерии *Bacillus sp.* АН159-1, а также из морских *Bacillus* и *Actinomadura*. Большинство макролактиннов состоят из 24-членного лактонного кольца с тремя диеновыми фрагментами в углеродном остоле. Циклические макролактинны кодируются в *B. amyloliquefaciens* FZB42 геномным кластером *mln*, содержащим девять оперонов, включая *mlnA-I* (Aleti, 2015). Кластер содержит 11 доменов, строительными единицами которых являются малонат и ацетат. В отличие от геномного кластера бациллина, перед геном *mlnA* находится только один транс-АТ-домен. Подобно организации геномного кластера *dif*, *mln* демонстрирует необычное расщепление модулей. Модуль 2 разделен между *mlnB* и *mlnC*, и аналогичная организация наблюдается для модулей 5, 7, 8 и 10.

Как и другие поликетиды *Bacillus*, макролактинны проявляют антибактериальную активность и могут быть потенциально использованы в медицинских целях. Эпимеры макролактинна D и макролактинна B проявляют значительную противовирусную активность против вируса герпеса. На уровне матричной РНК соединения 1 и 2 обеспечили примерно 85% ингибирования при концентрации 5 мкг/мл, что почти эквивалентно положительному контролю ацикловира (Ma S. et al., 2025).

Обнаружено, что макролактин А (MLN A) является ингибитором синтеза белка в бактериях. Так, ингибирующая активность макролактинна А не зависит от вида бактерий. Однако концентрация макролактинна А, необходимая для ингибирования синтеза белка в модели *E. coli*, оказалась в 50 раз ниже, чем концентрация, необходимая в модели *S. aureus* (Vasilchenko A. S. et al., 2025).

Также макролактин А и его ацилированные аналоги 7-О-малонилмакролактин А (mal-MLN A) и 7-О-сукцинилмакролактин А (suc-MLN A) активны против грамположительных бактериальных патогенов, включая мультирезистентные штаммы. Среди них suc-MLN A является наиболее мощным антимикробным средством, обладающим высокой активностью (МИК = 0,1 мкг/мл) против распространенного человеческого

патогена метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA) (Guglya E. B. et al., 2025).

1.2.3.3 Диффицидин

Диффицидин, синтезируемый штаммами *B. amyloliquefaciens* ATCC 39320 и ATCC 39374, представляет собой высоконенасыщенный макроциклический полиен с 22-членным углеродным скелетом, несущим фосфатную группу. Его структурный аналог — оксидиффицидин — отличается наличием дополнительной гидроксильной группы в положении 5. Биосинтез диффицидина определяется генным кластером *dif*, включающим 14 открытых рамок считывания — от *difA* до *difN* и *difY*. Соединение проявляет антагонистическую активность в отношении широкого круга бактерий (Aleti, 2015). В частности, показано, что диффицидин подавляет фитопатоген *Erwinia amylovora* — возбудитель бактериального ожога, опасного заболевания плодовых деревьев (Chen X. H. et al., 2009).

Также диффицидин и его аналоги демонстрировали значительную антибактериальную активность против мультирезистентных (МДР) бактерий, включая метициллин-резистентный *S. aureus*, ванкомицин-резистентный *E. faecalis* и другие устойчивые штаммы, такие как *P. aeruginosa* и *Klebsiella pneumonia*, что демонстрирует его потенциал для фармацевтического применения против резистентных патогенов (Chakraborty K. et al., 2021; Xiao S. et al., 2022).

Оксидиффицидин — это природный поликетидный антибиотик, давно известный как агент, воздействующий на рибосомы и ингибирующий синтез белка. Кроме того, ключевым преимуществом оксидиффицидина является его селективное действие, поскольку он не оказывает ингибирующего эффекта на эукариотический трансляционный аппарат (Chernyshova A. P. et al., 2025).

1.2.3.5 Пенимакролидин

Пенимакролидин — это крайне нестабильный макроциклический лактон, выделенный из *Paenibacillus* sp. F6-B70, он состоит из 22-членного лактонного кольца с триеном в углеродном остове. Три из четырех генов

синтазы паенимакролидина показали высокое сходство с синтазой диффицидина *B. amyloliquefaciens*, а структура пенимакролидина имеет сходство с диффицидином, что подразумевает потенциальное сходство в биосинтезе и лежащих в основе генетических структурах (Aleti, 2015).

Пенимакролидин также проявляет антимикробную активность, в основном как бактериостатическое средство и ингибирует несколько мультирезистентных штаммов *Staphylococcus* sp. (Wu X. C. et al., 2011).

1.2.3.6 Пениламицин

Пениламицины представляют собой группу гибридных нерибосомных пептидно-поликетидных соединений, продуцируемых патогеном медоносных пчел *Paenibacillus larvae*, которые проявляют активность против грамположительных патогенов, таких как *Staphylococcus aureus* (Koller T. O. et al., 2024). На основе исследований активации генов биосинтез паениламицинов был отнесен к кластеру генов *ram* (сложный гибридный кластер генов НРПС/ПКС). Различные варианты паениламицинов обнаруживаются из-за вариаций в первой (лизин или аргинин) и четвертой (лизин или орнитин) аминокислоты, но синтез осуществляется тем же ферментным комплексом, кодируемым геном *ram* (Garcia-Gonzalez E. et al., 2014).

1.3. Структурно-функциональная организация геномов родов *Bacillus* и *Paenibacillus*

Размер генома и процент содержания G+C у бактерий рода *Bacillus* значительно варьируются между разными видами. В среднем, размеры геномов составляют примерно от 5 до 6 миллионов пар оснований (Mb), у *Bacillus subtilis* размер генома составляет около 4,2 Mb, а у *Bacillus anthracis* — возбудителя сибирской язвы — геном немного больше, порядка 5,2–5,5 Mb. Содержание GC-пар колеблется от 34–35% у таких видов, как *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis* и *B. mycoides*, до 44–46% у *B. subtilis* и связанных с ним видов, включая *B. vallismortis* и *B. mojavenensis*. В частности, средний

уровень G+C хромосомы у *B. subtilis* достигает 43,5%, что заметно выше, чем у патогенов рода *Bacillus*, таких как *B. anthracis* A2012 (35,1%) и *B. cereus* ATCC 14579 (35,3%) (Tosato, Bruschi, 2004).

Размеры генома пенибацилл также широко варьируются от 3,02 Mbp (*P. darwinianus*) до 8,82 Mbp (*P. mucilaginosus*). Геном типового вида *Paenibacillus polymyxa* состоит из одной кольцевой хромосомы из 5 394 884 п.н. (45,8% G+C). Он имеет до 12 оперонов рРНК, а также 13 внецитоплазматических функциональных сигма-факторов, что может быть связано с адаптацией к изменчивым условиям ризосферы (Kim J. F. et al., 2010). При изучении пангенома 14 репрезентативных штаммов *P. polymyxa*, выделенных по всему миру, было обнаружено, что ген кластера *nif*, связанный с фиксацией азота, существует только в некоторых штаммах. Это открытие свидетельствует о том, что способность фиксировать азот нестабильна у *P. polymyxa*. Анализ кластеров генов биосинтеза антибиотиков показал, что они встречаются как в основном (core) геноме, общем для всех проанализированных штаммов, так и во вспомогательном (accessory) геноме, представленном не у каждого штамма. По-видимому, разница в среде обитания привела к потере способности синтезировать антибиотики у некоторых штаммов (Zhou L. et al., 2020).

Анализ генома штаммов *Paenibacillus darwinianus*, выделенных из почв Антарктики, выявил от 3043 до 3091 белок-кодирующих последовательностей (CDS), в первую очередь связанных с двухкомпонентными системами, сигма-факторами, транспортерами, споруляцией и генами, индуцированными холодовым шоком, окислительным и осмотическим стрессами (Dsouza et al., 2014). У штамма *Paenibacillus mucilaginosus* K02, который участвует в выветривании минералов в геноме было идентифицировано в общей сложности 7299 предсказанных ORF со средней длиной 910 п.н., а также несколько генов, связанных с биосинтезом и секрецией экзополисахаридов (Xiao B. et al., 2016).

1.4. Гены с плейотропным эффектом

1.4.1 Ген устойчивости к антибиотику рифампицину (*rpoB*)

Ген *rpoB* кодирует β -субъединицу РНК-полимеразы, основного фермента, необходимого для транскрипции бактерий. У бацилл и пенибацилл *rpoB* используется в качестве надежного генетического маркера для идентификации видов благодаря своей изменчивости по сравнению с геном 16S рРНК. Важно отметить, что мутации в гене *rpoB*, особенно те, которые обуславливают устойчивость к рифампицину, могут оказывать значительное плеiotропное действие на физиологию бактерий, включая продукцию вторичных метаболитов (Leehan J. D., Nicholson W. L., 2022).

У видов *Bacillus*, таких как *Bacillus velezensis*, было показано, что мутации *rpoB* влияют на выход вторичных метаболитов, таких как антибиотики (например, итурин А). Некоторые специфические замены в *rpoB* увеличивают продукцию определенных вторичных метаболитов, в то время как другие снижают ее. Эти мутации также влияют на такие признаки, как споруляция, образование биопленки и подвижность. Более того, мутации *rpoB* могут активировать «молчащие» или скрытые кластеры генов биосинтеза вторичных метаболитов, что приводит к значительному увеличению продукции биоактивных соединений, которые обычно не экспрессируются в стандартных условиях (Cai X. C. et al., 2017).

Исследования, проведенные на *Paenibacillus*, показывают, что введение мутаций устойчивости к рифампицину в *rpoB* может увеличить продукцию фермента, что потенциально связано с усилением синтеза вторичных метаболитов. Таким образом, мутации *rpoB* имеют практическое применение для увеличения выхода ценных вторичных метаболитов у этих бактерий (Tanaka Y. et al., 2013).

Кроме того, мутации *rpoB* и условия окружающей среды влияют на частоту мутаций и конкурентоспособность бактерий, влияя на то, как эти мутации влияют на физиологию и метаболизм. Некоторые мутации приводят к усилению антиоксидантной, ДНК-протекторной и SOS-ингибиторной активности, связывая плеiotропию *rpoB* со стрессовыми реакциями, которые

могут косвенно влиять на выход вторичных метаболитов (Statsenko V. N., Prazdnova E. V., Kulikov M. P., 2025). Аналогичные механизмы формирования множественной устойчивости бактерий к антибиотикам за счёт мутаций в гене *groB*, затрагивающих участок связывания рифамицинов, но не нарушающих каталитическую активность РНК-полимеразы, описаны и на примере клинически значимых патогенов (Землянко, Рогоза, Журавлева, 2018).

1.4.2 Гены, участвующие в метаболизме углерода (*ccpA*, *amyE*, *sfp*)

1.4.2.1. Ген *ccpA*

Ген *ccpA* у бактерий рода *Bacillus* кодирует катаболический контрольный белок А – ключевой глобальный регулятор транскрипции, опосредующий репрессию катаболитов углерода (CCR) и активацию для оптимизации использования энергии в условиях изменяющегося питания (Henkin T. M., 1996).

CcpA относится к семейству регуляторов транскрипции LacI/GalR и осуществляет свою функцию, связываясь со специфическими последовательностями ДНК *cis*-сайтами в промоторных областях целевых генов (Galinier A. et al., 1997). Основная роль этого белка заключается в контроле использования источников углерода: при наличии предпочтительного источника, такого как глюкоза, CcpA подавляет гены, отвечающие за вторичный метаболизм альтернативных источников углерода, обеспечивая тем самым более эффективное использование энергии клеткой (Tobisch S. et al., 1999). Одновременно с репрессорной функцией *ccpA* способен выступать и в роли активатора — в частности, он усиливает экспрессию генов, вовлечённых в пути выведения углерода, таких как образование ацетата и ацетоина при росте на глюкозе (Turinsky A. J. et al., 2000).

Активность *ccpA* не является постоянной и регулируется кофакторами — прежде всего фосфорилированными формами белков HPr и Crh. Эти белки взаимодействуют с CcpA в ответ на сигналы метаболитов, таких как глюкоза или малат, модулируя его связывание с ДНК и, соответственно, регуляторные

функции. Мутации в гене *сспА* способны изменять способность белка репрессировать либо активировать определённые сигнальные пути, что свидетельствует о сложной и многоуровневой регуляторной роли СспА, затрагивающей широкий круг метаболических процессов.

Одним из примеров СспА-опосредованной репрессии служит ген *rocG* *Bacillus subtilis*, кодирующий катаболическую глутаматдегидрогеназу: было показано, что этот ген подвержен прямой СспА-зависимой глюкозной репрессии, а сама репрессия транскрипции *rocG* замедляет рост клеток *B. subtilis* в глюкозо-глутаматной среде (Belitsky B. R., Kim H. J., Sonenshein A. L., 2004). Помимо репрессорной функции, СспА способен действовать и как активатор транскрипции — например, усиливая экспрессию оперона *alsSD*, участвующего в биосинтезе ацетоина. В совокупности регуляторная сеть, включающая *сспА*, *hPr* и *сrh*, интегрирует сигналы от фосфотрансферазной системы (PTS) и других метаболических путей, обеспечивая строгий контроль углеродного метаболизма у бактерий рода *Bacillus* (Detert Oude Weme R., Seidel G., Kuipers O. P., 2015).

Отдельного упоминания заслуживает ген *sfp*, кодирующий фосфопантетеинил-трансферазы (PPTases) — ферменты, играющие ключевую роль в регуляции активности трёх классов биосинтетических комплексов: поликетидсинтаз, нерибосомных пептидных синтаз и сидерофорсинтаз. Продукт этого гена является необходимым компонентом биосинтеза пептидного антибиотика сурфактина: *sfp* обеспечивает формирование сайтов связывания в молекуле сурфактинсинтазы, которые, в свою очередь, необходимы для загрузки специфических аминокислот, что критически важно для сборки пептидной цепи сурфактина (Rahman F. B. et al., 2021).

Регуляция гена *сспА* у *Bacillus* включает сложный многоуровневый контроль, в первую очередь зависящий от доступности источника углерода, в частности глюкозы.

Во-первых, регуляция СспА тесно связана с фосфотрансферазной системой (PTS) и степенью фосфорилирования белков HPr и Crh. При

метаболизме предпочтительного источника углерода, например, глюкозы, уровни фруктозо-1,6-бисфосфата (FBP) и глюкозо-6-фосфата (G6P) повышаются, активируя HPr-киназу/фосфорилазу (HPrK/P) (Lorca G. L. et al., 2005).

Во-вторых, HPrK/P фосфорилирует HPr и Crh по серину 46, образуя кофакторы (HPr-Ser46-P, Crh-Ser46-P), которые связываются с CsrA, запуская аллостерическое переключение, позволяющее CsrA связываться с участками ДНК, содержащими элементы катаболического ответа (*cre*). Связывание CsrA с *cre*-сайтами приводит как к репрессии, так и к активации целевых генов, участвующих в углеродном метаболизме, обеспечивая эффективное использование предпочтительных источников углерода за счёт ингибирования вторичных путей и стимулирования избыточного метаболизма.

Анализ всего генома показывает, что CsrA контролирует сотни генов либо напрямую, связываясь с *cre*-сайтами, либо косвенно, модулируя поглощение глюкозы и уровни внутриклеточных метаболитов. Сам ген *csrA* регулируется, включая механизмы обратной связи от углеродного метаболизма и других глобальных регуляторных сетей. Мутации в ключевых аминокислотах CsrA влияют на его связывание с ДНК и взаимодействие с кофакторами, влияя на его регуляторную активность даже в отсутствие глюкозы (Sprehe M. et al., 2007).

Известно, что регуляция CsrA интегрирует сигналы от нескольких метаболических путей для координации репрессии катаболитов углерода (CCR) и активации, способствуя росту и метаболической гибкости *Bacillus*.

Можно сказать, что механизм регуляции гена *csrA* включает опосредованный кофактором аллостерический контроль белка CsrA, что позволяет ему связывать ДНК и контролировать регулон генов, входящих в глобальную сеть метаболизма углерода в зависимости от доступности питательных веществ.

Замена глюкозы на вторичные углеводы влияет на функцию гена *csrA*, регулируя механизм углеродной катаболитной репрессии (CCR),

опосредованный *ссрА*. *СсрА* в первую очередь реагирует на предпочтительные источники углерода, такие как глюкоза. При замене глюкозы сложными углеводами, такими как крахмал или пектин, для утилизации включаются иные метаболические пути, поскольку активность *СсрА* зависит от метаболических промежуточных продуктов, образующихся при катаболизме глюкозы, таких как фруктозо-1,6-бисфосфат и глюкозо-6-фосфат. Установлено, что замена глюкозы на крахмал стимулировала выработку колистина и скорость биосинтеза у *Raenibacillus polymyxa*, а также степень стимуляции зависела от концентрации крахмала. Добавление крахмала индуцировало экспрессию *amyE*, кодирующего амилазу, и увеличивало активность амилазы в ферментационном растворе. На молекулярном уровне было обнаружено, что замена глюкозы на крахмал повысила относительный уровень экспрессии *ссрА*. Кроме того, использование крахмала стимулировало экспрессию регуляторного гена *spo0A*, но подавляло экспрессию другого регуляторного гена *abrB* (Yu Z. et al., 2018).

1.4.3 Гены, участвующие в образовании биопленок (*abrB*, *spo0A*)

1.4.3.1 Ген *abrB*

Ген *abrB*, продукт которого выступает одновременно репрессором и активатором транскрипции, экспрессируется в переходный период между вегетативным ростом и вступлением клетки в стационарную фазу и споруляцию. Установлено, что под контролем продукта гена, белка *AbrB* находятся 39 оперонов: он регулирует продукцию внеклеточных деградирующих ферментов, метаболизм аминокислот, мембранную биоэнергетику, функции клеточной стенки и формирование биоплёнок. Помимо биоплёнкообразования, *AbrB* управляет дифференцировкой части клеток в генетически компетентные, способные поглощать экзогенную ДНК, образованием устойчивых к внешним воздействиям спор, а также освоением новых источников питания за счёт синтеза ферментов и антибиотиков (Hamon et al., 2004). Показано также, что белок *AbrB* связывается с промоторной

областью *ptxA*, что свидетельствует о прямом подавлении им транскрипции генов биосинтеза полимиксина.

Также наблюдается полное ингибирование синтеза полимиксина при отключении гена *spo0A* у *Bacillus subtilis*, что говорит о необходимости данного гена для продукции полимиксина. Интересно, что мутант с двойным нокаутом *abrB-spo0A*, BSK4-0A-rB, и мутант с одним *abrB*, BSK4-rB, показали 1,7- и 2,3-кратное увеличение продукции полимиксина по сравнению с BSK4 соответственно (Park et al., 2012).

Также установлено, что *abrB* играет отрицательную роль в синтезе фузарицидина путем прямого связывания с промоторной областью кластера генов *fus*. Мутантный штамм *P. polymyxa* с нарушением *abrB* показал значительно более высокую противогрибковую активность по сравнению с диким типом (Li et al., 2013).

У *P. polymyxa* оперон биосинтеза фузарицидина (*fusGFEDCBA*) напрямую репрессируется AbrB посредством связывания с промоторной областью гена *fus*, тем самым подавляя продукцию фузарицидина. Эта репрессия является частью сложной регуляторной сети, включающей KinB, Spo0A и AbrB, где Spo0A может подавлять транскрипцию *abrB*, ослабляя AbrB-опосредованную репрессию и обеспечивая синтез фузарицидина. Эта регуляторная связь также связывает продукцию фузарицидина с процессом споруляции (Li Y. et al., 2021).

Ген *abrB* является регулятором синтеза сурфактина совместно с *spo0A*; так, делеция *spo0A* у *B. subtilis* KM1016 привела к увеличению скорости роста с пониженными титрами сурфактина, тогда как удаление или удлинение *abrB* привело к снижению скорости роста и высокому выходу сурфактина по сравнению с контрольным штаммом (Klausmann P. et al, 2021).

1.4.3.2 *spo0A*

Ген *spo0A* у *Bacillus* и *Paenibacillus* кодирует важнейший регуляторный белок Spo0A, который функционирует как главный регулятор инициации споруляции. Spo0A — это регулятор ответа, который активируется

посредством фосфорилирования посредством многоступенчатого фосфорилирования с участием киназ и белков переноса фосфора. После фосфорилирования Spo0A связывается со специфическими последовательностями ДНК, действуя как фактор транскрипции, контролирующей экспрессию сотен генов, участвующих в переходе от активной фазы роста к стационарной и начале споруляции (Fujita M., González-Pastor J. E., Losick R., 2005; Brown D. P. et al., 1994)

Spo0A~P (фосфорилированная форма) активирует и репрессирует гены, необходимые для ранних стадий споруляции, включая те, которые участвуют в морфологической дифференцировке, реакциях на стресс и метаболической адаптации (Cui Y. et al., 2024). Ген имеет более 100 прямых мишеней, участвующих не только в споруляции, но и в образовании биопленки, каннибализме и продукции вторичных метаболитов.

Известно, что Spo0A подавляет транскрипцию *abrB*, косвенно активируя продукцию фузарицина в *P. polymyxa*, связывая регуляторный контроль споруляции и вторичного метаболизма. Spo0A помогает координировать остановку репликации ДНК в начале споруляции, обеспечивая правильное разделение хромосом на спору и материнскую клетку. Этот ген сохраняется у эндоспорообразующих *Bacillus* и родственных им видов, включая *Paenibacillus*, что указывает на схожую ключевую роль в их развитии.

Эти данные подчёркивают, что Spo0A является главным регулятором, координирующим споруляцию с продукцией вторичных метаболитов, что делает его перспективным объектом для биотехнологических приложений, направленных на повышение выхода антимикробных соединений (Li Y. et al., 2021).

1.4.3.3 Взаимодействия Spo0A, CspA, AbrB:

Spo0A подавляет экспрессию *AbrB*, что приводит к дерепрессии генов, контролируемых *AbrB* и необходимых для споруляции и вторичного метаболизма (Strauch M. et al., 1990; Zhang Q. et al., 2024).

CspA регулирует метаболизм углерода независимо, но пересекается с этой регуляторной сетью. Мутанты *CspA* демонстрируют дефекты роста, которые нивелируются мутациями, затрагивающими *AbrB/Spo0A*, что указывает на функциональную связь между контролем метаболизма углерода и инициацией споруляции. Например, у *Bacillus subtilis* сверхэкспрессия *AbrB*, вызванная мутацией *spo0A*, может восстанавливать дефекты роста у мутантов *cspA*, демонстрируя переплетение регуляторных ролей (Henkin T. M., 1996; Faires N. et al., 1999).

У *P. polymyxa* *Spo0A* положительно регулирует продукцию вторичных метаболитов, подобно *Bacillus*, а *AbrB* действует как отрицательный регулятор биосинтеза. Экспрессия *abrB* отрицательно регулируется *Spo0A*, что приводит к усилению экспрессии генов вторичных метаболитов при снижении уровня *AbrB* (Yu Z. et al., 2018).

При высоком уровне белка *AbrB* (обычно во время экспоненциального роста) он подавляет транскрипцию этих генных кластеров, тем самым снижая синтез сурфактина. При переходе клеток в стационарную фазу или споруляцию регулятор *Spo0A* ингибирует экспрессию *abrB*, что приводит к снижению уровня *AbrB*. Такое подавление *AbrB* дерепрессорирует гены биосинтеза сурфактина, что позволяет увеличить его продукцию. Таким образом, синтез сурфактина активируется опосредованно *Spo0A* посредством репрессии *AbrB*, главного регулятора переходного состояния. *AbrB* также репрессорирует другие гены, участвующие в процессах, индуцированных голоданием, таких как споруляция и синтез антибиотиков у *Bacillus* (Lilge L., Kuipers O. P., 2024).

1.5 Практическое применение бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus* в сельском хозяйстве

Болезни растений являются основными угрозами для устойчивого сельского хозяйства, приводя к ежегодным потерям урожая. Альтернативой химических средств защиты является применение биологических агентов, которые могут включать различные биоактивные соединения из микробов.

Поэтому продуценты НРП привлекли значительное внимание из-за их потенциального использования в стратегиях биоконтроля для борьбы с различными сельскохозяйственными и экологическими проблемами (Patil P. S., Gore N. S., 2024).

Бактерии родов *Bacillus* и *Paenibacillus* находят широкое практическое применение в сельском хозяйстве, что обусловлено главным образом их способностью стимулировать рост растений и осуществлять биологический контроль фитопатогенов.

Представители рода *Bacillus* используются в нескольких взаимосвязанных направлениях (Khan A. R. et al., 2022). Как компонент биоудобрений они фиксируют атмосферный азот и растворяют фосфаты, повышая тем самым плодородие почвы и доступность питательных веществ для растений. Одновременно бактерии этого рода выступают в роли стимуляторов роста: они синтезируют фитогормоны и улучшают усвоение растением питательных веществ, что положительно сказывается на развитии корневой системы и урожайности. Важное значение имеет и их использование в качестве средств биологического контроля — отдельные штаммы *Bacillus* подавляют развитие фитопатогенов (грибов, бактерий, нематод) за счёт продукции антимикробных соединений и индукции системной устойчивости у растений. Некоторые виды, в частности *Bacillus thuringiensis*, применяются и для биологической борьбы с вредителями благодаря продукции инсектицидных белков, специфично действующих на определённых насекомых. Так, показано, что штаммы *B. amyloliquefaciens* IMB В-7404 и БИМ В439Д, обладающие выраженной противогрибковой активностью в отношении ряда фитопатогенных грибов, характеризуются также широким спектром ферментативной активности, включающим β -глюканазную, хитиназную, ксиланазную, амилолитическую и протеазную активности (Авдеева и др., 2014).

Помимо этого, бактерии рода *Bacillus* способствуют улучшению структуры почвы и разложению органических загрязнителей, а также

используются для предотвращения порчи продукции и продления срока её хранения после сбора урожая. В совокупности эти свойства делают их применение важным элементом устойчивого сельского хозяйства, снижающим зависимость от синтетических химикатов.

Бактерии рода *Paenibacillus* применяются в сходных, но не идентичных направлениях (Mohammad M., Badaluddin N. A., Asri E. A., 2024). Как ризобактерии, стимулирующие рост растений (PGPR), они улучшают доступность питательных веществ и продуктивность почвы, тем самым способствуя развитию растений. В качестве средств биологической борьбы виды *Paenibacillus* продуцируют метаболиты, подавляющие фитопатогены и снижающие заболеваемость сельскохозяйственных культур. Колонизируя ризосферу, эти бактерии также выступают в роли биоудобрений, обеспечивающих питание растения-хозяина, а их применение в целом соответствует принципам устойчивого органического земледелия.

Практическое значение этих родов бактерий во многом определяется спектром продуцируемых ими нерибосомальных пептидов (NRP) с антимикробной активностью. Так, бациломицин и итурин, синтезируемые различными видами *Bacillus*, включая *Bacillus subtilis*, подавляют рост патогенных грибов в почве и на поверхности растений, что делает их ценными агентами борьбы с грибковыми заболеваниями (Moynes et al., 2004). Сурфактин, продуцируемый видами *Bacillus*, обладает противогрибковой и антибактериальной активностью и применяется в составах для биоконтроля против широкого спектра патогенов, включая грибы родов *Botrytis* и *Phytophthora* (Ongena M., 2014). Фенгицин известен выраженной противогрибковой активностью в отношении фитопатогенов и рассматривается как перспективное средство борьбы с болезнями растений (Torralba et al., 2018). Бактериоцины — ещё одна группа NRP — продуцируются бактериями для подавления роста близкородственных видов; хотя они не применяются для прямого контроля заболеваний растений, их продукция способна косвенно влиять на структуру микробных сообществ почвы и

ризосферы, опосредованно воздействуя на здоровье растений (Mojgani, 2017). Наконец, полимиксины, вырабатываемые отдельными штаммами *Paenibacillus polymyxa*, обладают широким спектром антибактериальной активности, включая противогрибковое действие (Niu et al., 2013).

Так, нашими коллегами был разработан биологический препарат в виде порошка, на основе десяти штаммов бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus* с наибольшей антагонистической активностью, предназначенный для предпосевной обработки семян озимой пшеницы (патент №2724464). Помимо этого, был также разработан биологический препарат в жидком виде, который применяется для обработки озимой пшеницы на различных стадиях её роста и развития (патент №27514870).

Перспективным направлением практического применения метаболитов споровых бактерий является также создание постбиотических (бесклеточных) препаратов, действующим началом которых служат не живые клетки, а секретируемые метаболиты и компоненты клеточной стенки. Подобный формат позволяет снизить риски, сопряжённые с использованием живых культур (мутационная изменчивость, горизонтальный перенос генов антибиотикорезистентности, развитие атипичного иммунного ответа), и характеризуется более высокой стабильностью при хранении (Чистяков В. А. и др., 2023).

В данном контексте получение штаммов-продуцентов, устойчивых к антибиотикам, является даже технологическим плюсом, а не минусом. Помимо технологических преимуществ, интерес к постбиотическим препаратам обусловлен и более предсказуемым профилем безопасности при их применении в составе кормовых добавок и средств для животноводства. В отличие от пробиотиков на основе живых культур, постбиотические препараты не требуют поддержания жизнеспособности штамма-продуцента на всех этапах производства, транспортировки и хранения, что упрощает контроль качества готового продукта и снижает вариабельность его биологической активности между партиями. Данные обстоятельства делают постбиотический

формат особенно востребованным в условиях промышленного производства, предъявляющего высокие требования к воспроизводимости технологического процесса (Żółkiewicz J. et al. 2020).

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

В качестве объекта исследования были выбраны аэробные спорообразующие почвенные бактерии с разнообразным спектром биологических эффектов.

2.1.1. Штаммы микроорганизмов

В работе были использованы следующие функциональные группы штаммов:

1. Пробиотики для животных - *Bacillus amyloliquefaciens* B1895, *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933;
2. Фитостимулятор - *Bacillus atrophaeus* AG-8;
3. Пробиотик для рыб - *Bacillus amyloliquefaciens* /velezensis R5.
4. Противогрибковые штаммы с активностью против *Candida albicans* - *Bacillus subtilis* C65A, C65B, *Bacillus halotolerans* C 76.2; *Bacillus spp.*- C15, C 49.1A;
5. Противогрибковые штаммы с активностью против *Fusarium spp.*- *Paenibacillus polymyxa* V 3.14, O1.27, *Paenibacillus peoriae* R5.31;
6. Биодеградаторы микотоксинов - *Bacillus licheniformis* CL 33, CL 35, *Bacillus safensis* CL 56.

Делеционные мутанты *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 (12 штаммов) были созданы и любезно предоставлены сотрудником ГосНИИГенетики, г.Москва Гнучих Евгением Юрьевичем в ходе совместного инициативного проекта.

Штаммы, использованные в работе, были секвенированы с использованием Oxford Nanopore MiniIon.

Геномная ДНК изолятов CL33, CL35 и CL56 была выделена из свежей биомассы культуры с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия). Библиотеки были созданы с использованием набора для создания библиотек ДНК NEBNext Ultra II (New England Biolabs, Массачусетс, США). Качество полученных библиотек проверялось с помощью анализатора Agilent

Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) с использованием набора Agilent DNA High Sensitivity kit (Agilent Technologies, США). Количество ДНК оценивалось с помощью Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Секвенирование проводилось на системе Genolab-M (Шэньчжэнь, Китай). Качество прочтений оценивали с использованием программ HTQC и FastQC v.0.11.9. Для удаления адаптерных последовательностей и низкокачественных прочтений ($Q < 15$, длина < 100 п.н.) применяли Trimmomatic 0.39 с параметрами LEADING:20 TRAILING:20 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:100. De novo сборку геномов осуществляли в программе SPAdes v.3.15.4, при этом оптимальное значение k-mer (77) было предварительно определено с помощью Kmergenie; контиги длиной менее 500 п.н. исключали из дальнейшего анализа. Референс-опосредованную сборку проводили с использованием Ragout 2, для чего наиболее близкородственные геномы отбирали посредством BLAST+ 2.17.0; оценку качества полученных сборок осуществляли в программе QUAST.

Видовую принадлежность штаммов устанавливали на основании показателей средней нуклеотидной идентичности (ANI) и цифровой ДНК–ДНК-гибридизации (dDDH) путём сравнения с геномами типовых штаммов *B. licheniformis* NCTC10341 и *B. safensis* FO-36b^T (критерии видовой принадлежности: ANI ≥ 95 –96 %, dDDH ≥ 70 %). Аннотирование геномов выполняли в программе Prokka, поиск кластеров генов вторичных метаболитов — в AntiSMASH v.6.0.0. Идентификацию целевых генов (*cotA*, *aiiA*, гена марганцевой пероксидазы, *bsaPUE*, *dypB*) осуществляли путём сравнения аминокислотных последовательностей с референсной базой данных с использованием программы DIAMOND v.2.0.15 (Prazdnova E. et al., 2026).

2.1.2. Биосенсорные штаммы

Были использованы рекомбинантные штаммы *E. coli* MG1655 (pRecAlux) и MG1655 (pKatG-lux). Штаммы несут рекомбинантную плазмиду с LUX-опероном люминесцентной бактерии *Photorhabdus luminescens*. Этот оперон транскрипционно слит с промоторами генов белков RecA и KatG

соответственно. Биосенсор *E. coli* MG1655 (pRecA–Lux) излучает свет за счет активации промотора RecA в ответ на повреждение ДНК. Этот биосенсор обнаруживает как неспецифическое повреждение ДНК (в модели с диоксидином), так и индукцию SOS-ответа активацией RecA (в модели с ципрофлоксацином) (Chistyakov V. A. et al., 2018). Биосенсор *E. coli* MG1655 (pKatG-lux) люминисцирует благодаря активации промотора pKatG в ответ на окислительный стресс (Zavilgelsky G. B., Kotova V. Y., Manukhov I. V., 2007).

2.1.3 Состав питательных сред

Для культивирования бактериальных и грибных культур - как в условиях монокультуры на чашках Петри, так и при совместном культивировании - применяли следующие питательные среды (Nasiri V., Dalimi A., Ghaffarifar F., 2027; Шепелин А. П., 2013), представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Питательные среды, использованные в ходе работы

Название	Состав на 1 л	Применение
Стандартная LB	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, 20 г. агар микробиологический, 1 л dH ₂ O.	Культивирование контрольных штаммов
LB с добавлением глюкозы	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, глюкоза 20 г., 20 г. агар микробиологический, 1 л dH ₂ O.	Культивирование штаммов для расчета экспрессии
LB с добавлением пектина	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, пектин 20 г., 20 г. агар микробиологический, 1 л dH ₂ O.	Культивирование штаммов для расчета экспрессии
LB с добавлением крахмала	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, крахмал 20 г., 20 г. агар микробиологический, 1 л dH ₂ O.	Культивирование штаммов для расчета экспрессии

Название	Состав на 1 л	Применение
LB с добавлением рифампицина	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, рифампицин 0,01 г., 20 г. агар микробиологический, 1 л dH ₂ O.	Получение мутантов, устойчивых к рифампицину
LB с добавлением глюкозы и рифампицина	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, глюкоза 20 г., рифампицин 0,01 г., 20 г. агар микробиологический, 1 л dH ₂ O.	Культивирование штаммов для расчета экспрессии
LB с добавлением пектина и рифампицина	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, пектин 20 г., рифампицин 0,01 г., 20 г. агар микробиологический, 1 л dH ₂ O.	Культивирование штаммов для расчета экспрессии
LB с добавлением крахмала и рифампицина	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, крахмал 20 г., рифампицин 0,01 г., 20 г. агар микробиологический, 1 л dH ₂ O.	Культивирование штаммов для расчета экспрессии
Агар Сабуро	10 г. пептон, 40 г D-глюкоза, 15 г агар микробиологический, 1 л dH ₂ O.	Культивирование грибов
Жидкая среда LB с добавлением ампициллина	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, 20 г., ампициллин 0,1г., 1 л dH ₂ O.	Культивирование биосенсорных штаммов
Жидкая среда LB с добавлением зеараленона	10 г. пептон, 10 г. хлорид натрия, 5 г. дрожжевой экстракт, 20 г., зеараленон 0,578 мкг, 1 л dH ₂ O.	Культивирование штаммов для ИФА

2.2 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.2.1 Микробиологические методы

Для опыта с экспрессией культивирование осуществлялось при температуре 37 °С в термостате в течение 3 суток на различных питательных средах:

- 1) Стандартная LB
- 2) LB + глюкоза 20 г/л;
- 3) LB + пектин 20 г/л;
- 4) LB+ крахмал 20 г/л

2.2.1.1. Получение Rif-мутантов методом спонтанного мутагенеза

Методология получения спонтанных мутантов путём селективного отбора на средах с антибиотиком опирается на классические представления о спонтанном мутагенезе как источнике наследственной изменчивости в популяции бактерий (Абилев С., Глазер В., 2016). В серии предшествующих опытов была выбрана действующая концентрация антибиотика рифампицина (0,01 мг/мл). Далее на чашки со средой Сабуро с 0,01 мг/мл рифампицина высевались штаммы. Культивирование бактерий осуществляли в термостате при комнатной температуре в течение 5–7 дней. Далее отдельные колонии мутантов отбирали и культивировали на чашках.

2.2.1.3. Определение антагонистической активности

Антагонистическую активность бацилл по отношению *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium spp.* определяли методом совместного культивирования. Бактерии высевали на твердую среду Сабуро и одновременно с этим уколом в центр чашки проводили посев штамма фузариума. Культивирование осуществлялось в термостате при комнатной температуре. Через 7 дней учитывали зоны подавления роста грибов; измеряли ширину зоны подавления колоний.

2.2.1.4. Проверка стабильности мутантов

С целью оценки генетической стабильности мутантные штаммы подвергли серийному пассированию с интервалом 1-3 дня в жидкой среде LB (1 мл, с рифампицином). По завершении серии 10 пассажей снова выполняли тестирование антагонистической активности штаммов против целевых грибных патогенов.

2.2.2. Постановка биосенсорного теста

Ранее было показано, что биосенсорный подход, основанный на использовании рекомбинантных штаммов *E. coli*, несущих люминесцентный репортёр luxCDABE под транскрипционным контролем промоторов стресс-индуцируемых генов (*recA*, *katG*), является чувствительным методом оценки антиоксидантной, ДНК-протекторной и SOS-ингибирующей активности бактериальных метаболитов. С применением данного подхода установлено, что протекторная и прооксидантная активность может быть неравномерно распределена между отдельными фракциями культуральной жидкости и варьировать даже среди близкородственных штаммов одного вида (Kulikov M. P. et al., 2022). Указанный методический принцип был положен в основу оценки протекторной активности метаболитов в настоящем исследовании.

2.2.2.1. Индукторы ДНК повреждений и SOS-ответа

С использованием штамма *E. coli* MG 1655 (pRecA-lux) была изучена возможность подавления SOS-ответа и общей ДНК-защитной активности. В качестве индукторов SOS-ответа и повреждения ДНК использовались ципрофлоксацин (10^{-4} мг/мл) и $2 \cdot 10^{-5}$ мг/мл 1,4-диоксида 2,3-хиноксалиндиметанола (диоксидина) в деионизированной воде, соответственно (Campoli-Richards D. M. et al., 1988; Cenci G. et al., 2008). Для оценки антиоксидантной активности использовался штамм *E. coli* MG 1655 (KatG-lux) с индуктором - раствор 10^{-3} мг/мл перекиси водорода в деионизированной воде.

Ципрофлоксацин - фторированный хинолон с сильной антибактериальной активностью. Это антибактериальный препарат с широким спектром действия, к которому большинство грамотрицательных бактерий

очень чувствительны *in vitro*, а многие грамположительные бактерии чувствительны или умеренно чувствительны. Основным механизмом действия ципрофлоксацина и других хинолонов заключается в ингибировании бактериальной ДНК-гиразы, которая играет жизненно важную роль в процессе синтеза матрикса (Campoli-Richards D. M. et al., 1988).

Диоксидин — это антибактериальный препарат с широким спектром действия. Он относится к классу хиноксалинди-N-оксидов. Активность диоксида *in vitro* варьируется в зависимости от типа бактерий, и эта вариация может быть очень большой. Предполагается, что действие диоксида основано на подавлении активности бактериальной дезоксирибонуклеазы, которая является необходимым ферментом репарационной системы бактерий (Fadeeva N. I. et al., 1980).

Культивирование тестируемых штаммов проводилось как на твердой, так и на жидкой среде Лурия-Бертани (LB) при 37 °С. Препарат, используемый для тестирования, получали центрифугированием культуры (Minispin-plus; Eppendorf) в течение 7 минут при 6000 об/мин и фильтрацией.

Рекомбинантные штаммы *E. coli* выращивали как на жидкой, так и на твердой среде LB с добавлением 100 мкг/мл ампициллина при 37 °С.

2.2.2.2. Этапы биосенсорного теста

1. Культивирование ночной культуры штамма *E. coli*, используемого в качестве биосенсора;
2. Измерение плотности ночной культуры с помощью денситометра Biosan DEN-1B (Латвия) и стандартизация путем добавления жидкости LB до концентрации 0,01 по МакФарланду;
3. Культивирование клеток в течение 2 часов при 37°С до ранней логарифмической фазы роста;
4. Перенос аликвот по 80 мкл в 96-луночный планшет, затем к контрольным клеткам добавляли 10 мкл деионизированной воды и 10 мкл культуры пробиотического бесклеточного препарата; в экспериментальные

клетки вместо воды добавляли 10 мкл индуктора (перекиси водорода, диоксида или ципрофлоксацина);

5. Измерение биolumинесценции проводилось каждые 10 минут в течение 120 минут с помощью планшетного ридера (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Германия).

Индукция оценивалась по формуле:

$$I_s = (I_e / I_k) - 1, (1)$$

где (I_s) — коэффициент индукции; I_k и I_e — интенсивности люминесценции контрольного и экспериментального образцов соответственно. Статистически значимое превышение I_e над I_k , оцененное с помощью t-критерия, считалось признаком значительного влияния на индукционный эффект.

Протекторный эффект (P , %) рассчитывался с учетом индукции в присутствии соответствующих концентраций протектора по формуле:

$$P = (1 - (I_p / I_a)) \times 100 \%, (2)$$

где I_p и I_a — факторы, вызывающие SOS-ответ под воздействием исследуемого фактора в присутствии защитного вещества и контрольного образца соответственно. Все эксперименты проводились в трех повторениях. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия Стьюдента при $P = 0,05$.

2.2.3 Молекулярно-генетические методы

2.2.3.1. Выделение тотальной РНК из бактерий

Выделение РНК из клеток бактерий проводили с использованием коммерческого набора для выделения «Extract RNA» (Евроген, Россия). Выделение производили из культур бактерий, выращенных на различных средах в течение трех суток.

Процедура включала в себя следующие этапы:

1. Гомогенизация бактериальной массы и добавление к гомогенизированному материалу 1 мл «ExtractRNA».

2. Лизис биоматериала. Для полной диссоциации нуклеопротеидных комплексов инкубировали лизат при комнатной температуре в течение 10 минут. По завершении инкубации перемешали образец путём многократного пипетирования с последующим кратковременным перемешиванием на вортексе. Центрифугировали лизат в течение 10 минут при заданных параметрах. После центрифугирования перенесли супернатант в новую стерильную пробирку, избегая контакта с осадком.

3. Разделение фаз. К полученному супернатанту добавили 0,2 мл хлороформа. Интенсивно перемешали содержимое путём ручного встряхивания в течение 15 секунд. Центрифугировали образец в течение 10 минут при установленных условиях. В результате центрифугирования происходит разделение смеси на три отчётливо различимые фазы. Отобрали водную фазу под углом 45°С, избегая контакта с интерфазой. Перенесите отобранную фазу в новую стерильную пробирку.

4. Выделение РНК. К водной фазе добавили 0,5 мл хлороформа, интенсивно перемешали содержимое путём встряхивания в течение 15 секунд (без использования вортекса). Центрифугировали пробирку в течение 5 минут при заданных условиях. Отбирали верхнюю водную фазу и перенесли её в чистую стерильную пробирку. К водной фазе добавили 0,5 мл 100% изопропанола, перемешали смесь на вортексе до гомогенного состояния. Центрифугировали пробирку в течение 10 минут для осаждения РНК, удалили супернатант, используя пипетку, оставив осадок РНК на дне пробирки. По стенке пробирки добавили 1 мл 80% этанола, стараясь не затронуть осадок. Центрифугировали пробирку в течение 5 минут при установленных параметрах. Удалили супернатант, избегая потери осадка РНК. Повторили этапы промывки этанолом для удаления остаточных примесей. Высушили осадок РНК: при комнатной температуре в течение 5-7 минут. К высушенному осадку РНК добавили необходимый объём воды, свободной от нуклеаз для ресуспендирования препарата. Перемешали на вортексе до полного растворения осадка.

Далее была проверена концентрация продукта с помощью планшетного ридера (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Германия) и произведено разделение на аликвоты для заморозки в низкотемпературной морозильной камере при -80°C и дальнейшей работе.

2.2.3.2. Нарботка одноцепочечной комплементарной ДНК на основе РНК матрицы

Нарботка комплементарной одноцепочечной ДНК на РНК матрице осуществлялась на остове ранее выделенной РНК с использованием набора «MMLV RT kit» (Евроген, Россия).

Процедура включала в себя следующие этапы:

1. В стерильную пробирку для ПЦР внесли следующие компоненты: тотальную РНК, праймеры, Oligo(dT)-праймер, деионизированную воду, в объемах рекомендованных производителем.

2. Инкубировали реакционную смесь при температуре 70°C для денатурации вторичной структуры РНК. Сразу после завершения инкубации перенесли пробирки на лёд для быстрого охлаждения и стабилизации одноцепочечной конформации молекулы.

3. К охлаждённой смеси добавили предварительно подготовленную реакционную смеси следующего состава: буфер для синтеза первой цепи (5X First strand buffer), смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP Mix), дитиотреитола (DTT), обратной транскриптазы MMLV.

4. Перемешали полученную реакционную смесь путём многократного пипетирования, провели кратковременное центрифугирование на миницентрифуге.

5. Провели инкубацию реакционной смеси в термоциклере по следующей программе: 37°C — 60 минут; 70°C — 10 минут, после чего охладили во льду.

Использованная в настоящей работе схема биосенсорного тестирования, а также формулы расчёта индукции и протекторного эффекта, соответствуют методическим подходам, ранее апробированным и

отработанным в исследованиях нашего научного коллектива (Kulikov M. P. et al., 2022; Statsenko V. N., Prazdnova E. V., Kulikov M. P. I, 2025).

2.2.3.3. Подбор праймеров

Последовательности праймеров были взяты из литературы (*fenC* (Zihalirwa Kulimushi P. et al., 2017), *fusA* (Raza W, Wu H, Shen Q, 2010) *ccpA* (Yu Z. et al., 2018), а также разработаны с помощью программы Oligo 7.

Таблица 2 - Праймеры на исследуемые гены

Ключевой ген	Длина ампликона	Последовательность праймеров	Температура отжига
<i>SrfAA</i> (сурфактин)	363	F: GGAGGACAGTCGTTCTTGG R: CGCATCTTCAATCAGCGTG	56 °C
<i>FenC</i> (фенгицин)	214	F: CTGAATCTCTTGCGCCATGT R: TGATCTGCTGTGCTCCTTCA	61 °C
<i>FusA</i> (фузарицидин)	110	F: GCAGAGGATGATAGTGTTGGTC R: CAGCACATCATGCGTTCC	54 °C
<i>PtxE</i> (полимиксин)	775	F: GAATCGGCTCGTCTCTCCAG R: GATGTGGACATTACGCGCAC	60/61 °C
<i>ItuD</i> (итурин)	300	F: GAAAGTCTTCCGTCGACAC R: TGACAAAGACAATGAATGCG	57 °C
<i>BaeA</i> (бациллин)	234	F: TGCTTGAAATGGTCCCAACG R: GTAAAGCCAAGCCGTCAACA	59 °C
<i>MnlA</i> (Макролактин A)	212	F: AAGGACAATTCGGAAAGCGG R: CCAAAGAACCCCAGCATTCC	59 °C

Ключевой ген	Длина ампликона	Последовательность праймеров	Температура отжига
<i>DnfA</i> (диффицидин)	167	F: TGCTTACGTTTGTGTTCCCG R: AAATTGCGTTTTCCCCAGCT	59 °C
<i>CspA</i>	102	F: ATCAATTCCGGCTGCTTCCA R: CACCGCCAAATCGCAATGAT	60 °C
<i>AbrB</i>	291	F: ATGAAATCTACTGGTATTGTAC GT R: TTATTTAAGGTTTTGAAGCTGG TT	55 °C
<i>I6sBam</i>	100-200	F: CCTACGGGAGGCAGCAG R: ATTACCGCGGCTGCTGG	64 °C

Оптимальную температуру отжига праймеров рассчитывали с использованием онлайн-калькуляторов: Tm Calculator (NEB) и Oligo Calc. Конечные температуры отжига выбраны с учётом согласованности результатов, полученных разными методами. Относительная экспрессия генов рассчитывалась методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001), при котором эффективность амплификации праймеров принимается равной 100% для всех исследуемых генов.

2.2.3.4. ПЦР и режим амплификации

Для постановки ПЦР в реальном времени использовался амплификатор Quant Studio 5 Real-Time ПЦР (Thermo Scientific, США) и реагенты qPCRmix-NS SYBR (Евроген, Россия).

Условия ПЦР-реакции описаны в таблицах 3-4.

Таблица 3 - Постановка ПЦР

Компонент	Количество на 25 мкл реакции	Конечная концентрация
	До 25 мкл	-
ScreenMix-HS	5 мкл	1X
ПЦР праймер 1	Переменное	0,2-0,4 мкМ
ПЦР праймер 2	Переменное	0,2-0,4 мкМ
ДНК-матрица	Переменное	1-100 нг на реакцию

Таблица 4 - Режим амплификации

Стадия	Кол-во циклов	Температура	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95°C	5 мин
Денатурация	До 50	94-95°C	10-30сек
Отжиг	До 50	50-68°C	10-30сек
Элонгация	До 50	68-72°C	10-30сек

2.2.4 Определение зеараленона методом ИФА

Иммуноферментный анализ проводился с использованием коммерческого набора ИП1708.1 (Иммунотэкс, Россия).

Этапы:

1. Подготовка. Приготовление растворов для экстракции образцов, промывающего буфера, гомогенизация и доведение образцов до фактора разведения - 160.

2. Добавление реагентов. Внесение по 50 мкл стандартов и образцов в лунки планшета, добавление по 50 мкл конъюгата во все лунки, а затем - по 50 мкл рабочего раствора антител в каждую лунку. Заклеивание планшета плёнкой, шейкирование в течение 5 секунд, затем инкубирование в течение 30 минут при 25 ± 1 °C в темноте. Удаление жидкости из лунок планшета путём стряхивания.

3. Промывка. Добавление во все лунки планшета по 300 мкл рабочего раствора промывающего буфера и инкубирование в течение 30 секунд, после чего удаление жидкости путём стряхивания (всего 5 раз), удаление влаги из планшета.

4. Ферментативная реакция. Добавление по 50 мкл субстрата А, а затем по 50 мкл субстрата В в каждую лунку. Шейкирование планшета в течение 5 секунд, затем инкубирование в течение 15 минут при 25 ± 1 °С в темноте.

5. Остановка реакции. Добавление по 50 мкл стоп-реагента в каждую лунку, шейкирование планшета.

6. Измерение оптической плотности (ОП) относительно длины волны сравнения - 630 нм. 10. Оптическую плотность каждой лунки сравнивали с нулевым стандартом (значение которого принимается за 100%), определив процент поглощения по формуле: $A = B_i / B_0 * 100$, где А - значение относительной оптической плотности, выраженное в процентах, от оптической плотности нулевого стандарта, % поглощения; B_i - среднее значение оптической плотности каждого из стандартных растворов зеараленона или исследуемого образца; B_0 - среднее значение оптической плотности нулевого стандарта.

7. Построение калибровочной кривой. Концентрацию зеараленона (х) в мкг/кг считали по калибровочной кривой (рис.1), после чего умножали значение на фактор разведения.

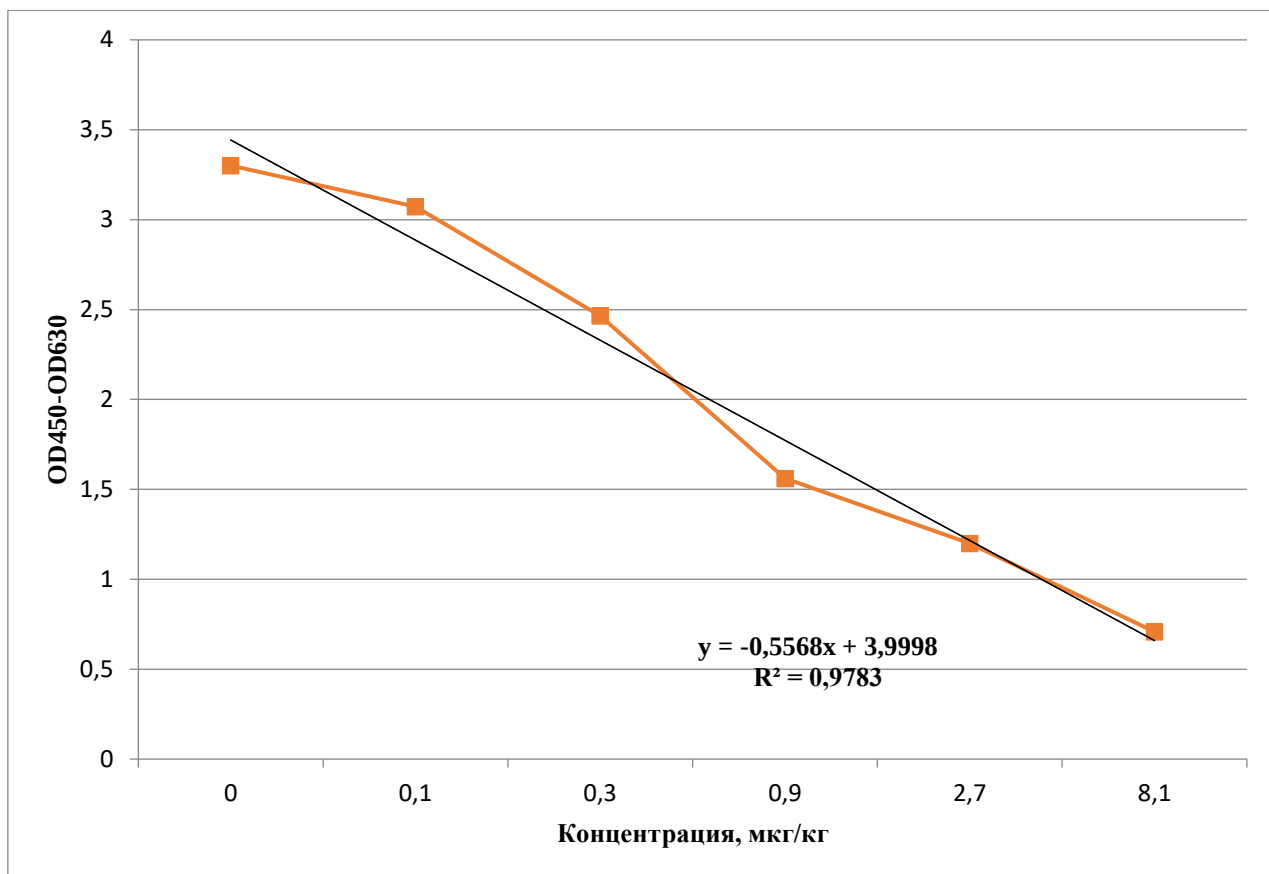


Рисунок 1. Калибровочная кривая с учетом оптической плотности культуры (OD 450-OD630)

2.2.5 Биоинформатическая обработка данных

Выделение геномной ДНК проводили в соответствии с методом, описанным в работе Gautam A. (2022). Полученные образцы использовали для секвенирования на платформе MinION с применением набора Rapid Barcoding Kit V14 (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). После секвенирования сырые риды (прочтения) подвергали первичной оценке качества с использованием программы NanoPlot v1.42.0, после чего выполняли фильтрацию и отбор последовательностей с помощью Filtlong v0.2.1.

Сборка геномов выполнялась с использованием программы Flye v2.9.5 (Kolmogorov M. et al., 2019). Оценка качества полученных сборок проводилась с применением программ CheckM v1.2.3 и CheckM2 v1.0.2, где CheckM использовали для анализа полноты и контаминации на основе наличия/отсутствия однокопийных маркерных генов, а CheckM2 — для независимой оценки качества сборок с использованием подходов машинного

обучения (Chklovski A. et al., 2023). Визуальная проверка общей структуры собранных хромосом осуществлялась в программе Bandage v0.9.0 с целью подтверждения формирования кольцевых хромосом. Таксономическая идентификация изолятов проводилась на основании расчета средней нуклеотидной идентичности (ANI) с использованием базы данных GTDB и протокола classify_wf пакета GTDB-Tk v4.2.0 (Parks D. H. et al., 2022). Филогенетическое положение штаммов определяли по результатам анализа, выполненного с использованием протокола de_novo_wf, основанного на конкатенированном выравнивании 120 филогенетически информативных маркеров. Для визуализации мутаций в конкретных генах (*abrB*, *rpoB*) использовали Unipro UGENE 53.1 (Golosova O. et al., 2014).

2.2.6 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Все эксперименты выполняли в трёх независимых биологических повторностях ($n = 3$).

Для каждой экспериментальной группы вычисляли среднее арифметическое значение (M) и 95% доверительный интервал (ДИ), рассчитанный по формуле:

$$\text{ДИ} = t(\alpha, df) \times \text{SEM} (3)$$

где $t(\alpha, df)$ — критическое значение распределения Стьюдента при уровне значимости $\alpha = 0,05$ и числе степеней свободы $df = n - 1$, SEM — стандартная ошибка среднего. Результаты представлены в виде $M \pm 95\% \text{ ДИ}$.

Для оценки статистической значимости различий между двумя независимыми группами применяли двухвыборочный t-критерий Стьюдента. При сравнении нескольких групп с одной контрольной проводили серию попарных t-тестов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. На графиках уровни значимости обозначали следующим образом: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$. Планки погрешностей на графиках соответствуют 95% доверительному интервалу.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Отбор штаммов *Bacillus* и *Paenibacillus* для исследования. Определение спектра генов НРПС.

Для отбора целевых объектов и дальнейшего воздействия на экспрессию генов НРПС и генов-регуляторов был проведен скрининг хитов серии С – штаммов с активностью против *Candida albicans*. Результаты отображены в Таблице 5.

Таблица 5 – Противогрибковая активность хитов серии С

Название штамма	Зона подавления без добавления <i>Candida</i> в среду, мм	Зона подавления с добавлением <i>Candida</i> в среду, мм	Тип антагонизма	Индукция, мм
С 49.1А	14	27	И	13
С 76.2	0	25	И	25
С 65А	25	22	К	-
С 65В	25	27	И	2
С 15	23	28	И	5

Для определения спектра вторичных метаболитов было проведено полногеномное секвенирование изолятов. Результаты объединены в «Базу данных геномов бактерий-продуцентов биологически активных соединений» (RU 2026620600; 10.02.2026). База данных содержит систематизированную информацию о 35 штаммах микроорганизмов родов *Bacillus* и *Paenibacillus* с указанием их таксономической принадлежности, геномных координат регионов биосинтеза 36 биологически активных соединений и типов биологической активности. База включает данные о размещении в NCBI, научные публикации и область практического применения штаммов (представлена в Приложении 1).

Были отобраны следующие функциональные группы штаммов для дальнейшей работы:

- 1) Пробиотики для животных - *Bacillus amyloliquefaciens* B1895, *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933;
- 2) Фитостимулятор - *Bacillus atrophaeus* AG-8;
- 3) Пробиотик для рыб - *Bacillus amyloliquefaciens* /*velezensis* R5;
- 4) Противогрибковые штаммы с активностью против *Candida albicans* - *Bacillus subtilis* C65A, C65B, *Bacillus halotolerans*- C15, C 49.1A, C 76.2;
- 5) Противогрибковые штаммы с активностью против *Fusarium spp.*- *Paenibacillus polymyxa* V 3.14, O1.27, *Paenibacillus peoriae* R5.31;
- 6) Целлюлозолитики, биодegradаторы микотоксинов - *Bacillus licheniformis* CL 33, CL 35, *Bacillus safensis* CL 56.

3.2 Влияние мутаций в гене устойчивости к рифампицину (*rpoB*) на противогрибковую активность

В предыдущих исследованиях нашего научного коллектива было установлено, что штаммы *B. subtilis* KATMIRA1933 и *B. amyloliquefaciens* B-1895 обладают ДНК-протекторной и SOS-ингибирующей активностью (Prazdnova E. V. et al., 2015). А также выяснено, что ДНК-протекторная и SOS-ингибирующая активность у мутантов *B. subtilis* KATMIRA1933 и *B. amyloliquefaciens* B-1895, устойчивых к рифампицину значительно выше, чем у контрольных штаммов (Statsenko V. N., Prazdnova E. V., Kulikov M. P. I, 2025).

Основная гипотеза заключалась в том, что данный эффект могут обеспечивать пептиды рибосомальной и нерибосомальной природы. Поскольку, судя по представленным данным, мутации в гене *rpoB* приводят к увеличению выработки данных метаболитов, можно заключить, что они с высокой вероятностью относятся именно к этой группе.

Была проведена оценка влияния мутаций в гене *rpoB* на пробиотические свойства, особенно на те пробиотические свойства, для которых активные метаболиты не установлены.

Мы рассматриваем антиоксидантную и антимуtagenную активность, проявляемую культуральной жидкостью в биосенсорном анализе, как селективный критерий для отбора пробиотиков, поскольку ряд исследований (Prazdnova E. V. et al., 2015; Prazdnova E. V. et al., 2019; Kulikov M. P. et al., 2022; Prazdnova E. V. et al., 2025; Statsenko V. N., Prazdnova E. V., Kulikov M. P. I, 2025) показал практическую ценность этого подхода.

Были изучены антиоксидантная, ДНК-защитная и SOS-ингибирующая активность двух штаммов *B. subtilis* KATMIRA1933 и *B. amyloliquefaciens* B-1895, а также мутантов Rif^R этих штаммов. Антиоксидантная активность оценивалась с помощью биосенсора с конструкцией pKatG-lux. ДНК-защитная и SOS-ингибирующая активность оценивалась с помощью биосенсора с конструкцией pRecA-Lux.

На рисунке 2 представлены результаты сравнительного анализа протекторной активности исходного штамма *B. subtilis* KATMIRA1933 и его рифампицин-резистентного мутанта Rif⁺ с пероксидом водорода, диоксидином и ципрофлоксацином в качестве индуктора стресса. Оценка проводилась по трём параметрам: антиоксидантной (АО), ДНК-защитной (АМ) и анти-SOS-активности (АС).

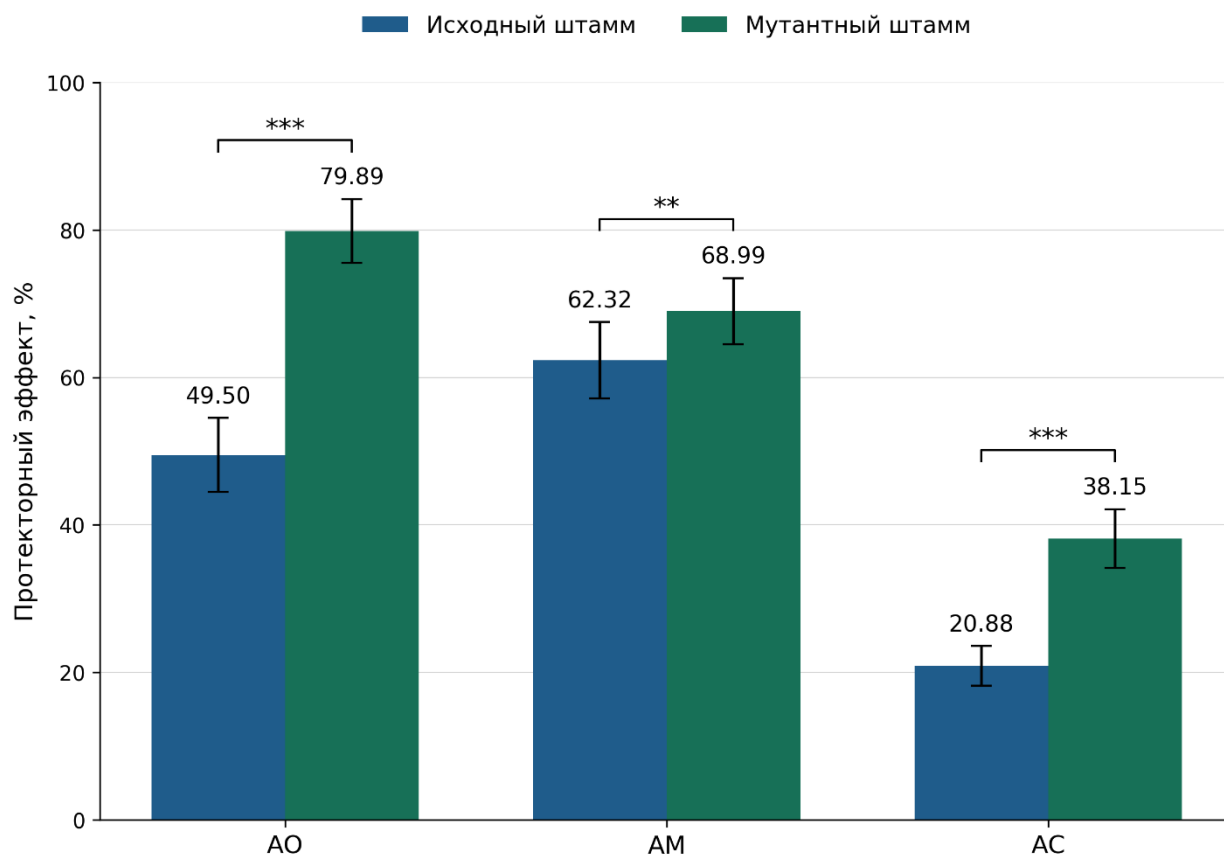


Рисунок 2. Протекторная активность исходного штамма *B. subtilis* KATMIRA1933 (1) и мутанта Rif^R (2). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента). АО — антиоксидант, АМ — антимутагенное (ДНК-защитное), АС — анти-SOS-свойства.

По всем трём показателям Rif^R-мутант достоверно превосходил исходный штамм, что свидетельствует о системном усилении стрессозащитного потенциала в результате мутаций в гене *rpoB*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы. Наиболее выраженное увеличение активности зафиксировано по антиоксидантному показателю: протекторный эффект мутанта составил 79,89% против 49,50% у контрольного штамма, что соответствует увеличению на 30,39% процентных пункта ($p < 0,001$).

ДНК-защитная активность мутанта (68,99%) превышала у исходного штамма (62,32%) на 6,67% ($p < 0,01$). Несмотря на меньшее абсолютное увеличение по сравнению с АО-показателем, данное различие является статистически достоверным и свидетельствует об усилении систем репарации

или детоксикации повреждающих агентов у Rif^+ -мутанта. Анти-SOS-активность возрастала с 20,88% у контрольного штамма до 38,15% у мутанта — увеличение на 17,27% ($p < 0,001$). Следует отметить, что абсолютные значения анти-SOS-активности у обоих вариантов штамма существенно ниже, чем показатели АО и АМ, что отражает относительно ограниченную способность данного штамма подавлять SOS-ответ в условиях стресса. Вместе с тем достоверное усиление данного свойства у мутанта указывает на модификацию регуляции SOS-каскада в результате изменений транскрипционного аппарата.

Полученные данные согласуются с концепцией «рифампицинового эффекта» — феномена, при котором мутации в *rpoB*, помимо резистентности к антибиотику, обуславливают перестройку глобальной транскрипционной программы клетки, приводя к усиленной экспрессии генов стрессового ответа ещё до воздействия стрессового фактора. Таким образом, отбор Rif^+ -мутантов может рассматриваться как эффективный инструмент получения штаммов с повышенным стрессозащитным потенциалом, что представляет практический интерес для биотехнологических применений, требующих устойчивости продуцента к окислительным условиям среды.

Для *B. amyloliquefaciens* В-1895 были получены схожие данные (Рисунок 3). На рисунке 3 представлены результаты сравнительного анализа протекторной активности исходного штамма *B. amyloliquefaciens* В-1895 и его рифампицин-резистентного мутанта Rif^+ с пероксидом водорода, диоксидином и ципрофлоксацином в качестве индуктора стресса. Как и в случае *B. subtilis* KATMIRA1933, Rif^+ -мутант достоверно превосходил исходный штамм по всем трём исследованным параметрам, однако абсолютные значения активности и характер распределения приростов между показателями существенно отличались от таковых у KATMIRA1933.

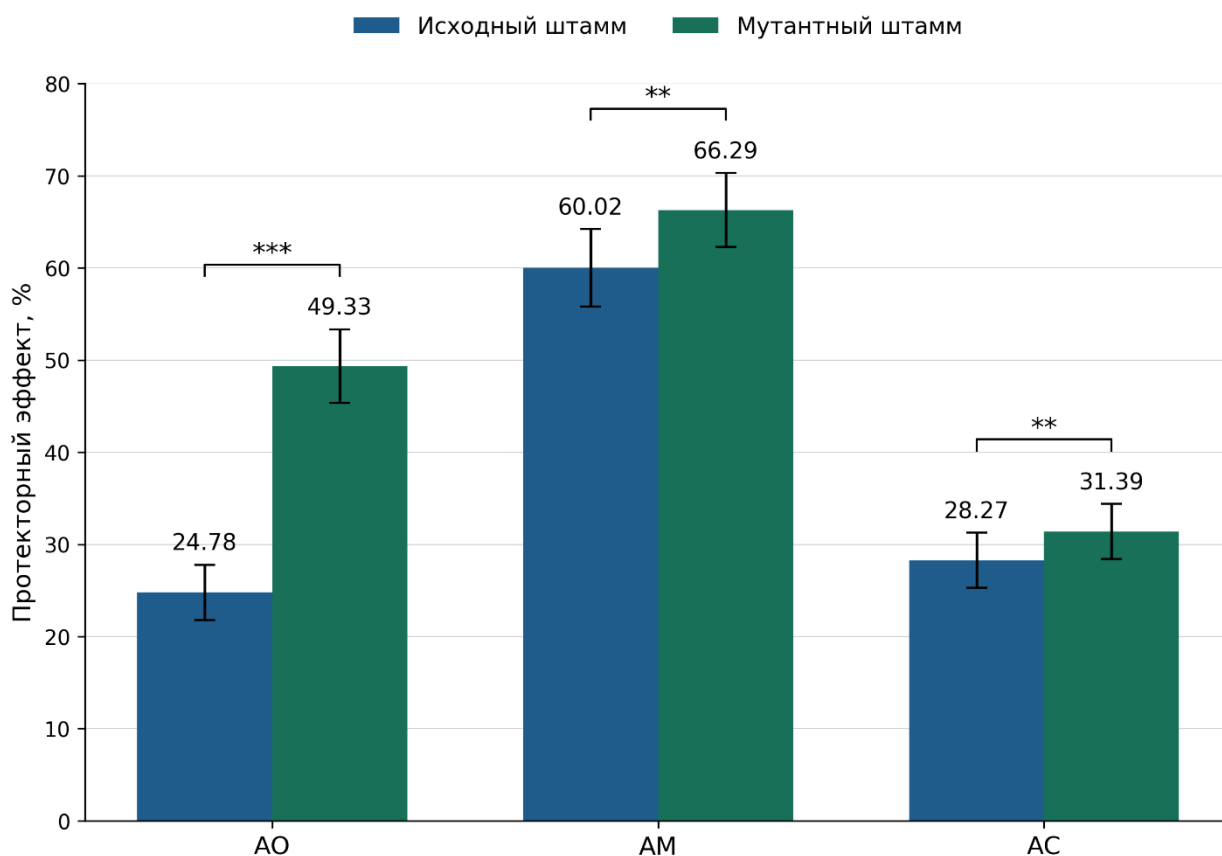


Рисунок 3. Протекторная активность исходного штамма *B. amyloliquefaciens* B-1895 (1) и мутанта Rif^R (2). АО — антиоксидант, АМ — антимутагенное (ДНК-защитное), АС — анти-SOS-свойства. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента)

Наиболее выраженное усиление наблюдалось по антиоксидантному показателю: протекторный эффект Rif^R-мутанта составил 49,33% против 24,78% у исходного штамма ($p < 0,001$), что соответствует приросту на 25,52% и практически двукратному увеличению активности. Следует подчеркнуть, что базовый уровень АО-активности контрольного штамма B-1895 (24,78%) существенно ниже, чем у KATMIRA1933 (49,50%), что свидетельствует о значительно меньшем исходном антиоксидантном потенциале данного штамма. Вместе с тем относительное увеличение в результате Rif^R-мутации у B-1895 сопоставим с таковым у KATMIRA1933, что указывает на универсальность механизма усиления антиоксидантной защиты, обусловленного изменениями в структуре РНК-полимеразы, вне зависимости от видовой принадлежности и исходного уровня активности штамма.

ДНК-защитная активность мутанта (66,29%) превышала показатель у контрольного штамма (60,02%) на 6,27% ($p < 0,01$). В отличие от АО-показателя, базовые значения АМ-активности у B-1895 и KATMIRA1933 сопоставимы, что свидетельствует о близком уровне систем защиты ДНК у исходных штаммов обоих видов. Анти-SOS-активность возрастала с 28,27% у контрольного штамма до 31,39% у мутанта (увеличение на 3,12%; $p < 0,01$).

Как видно из приведенных выше данных, все виды протекторной активности сильнее у Rif^R-мутантов *B. amyloliquefaciens* B-1895. Антиоксидантная активность метаболитов Rif^R-штамма на 24,55% выше, чем у исходного штамма. ДНК-защитная активность мутантных метаболитов на 6,27% выше, а SOS-ингибирующая активность выше на 3,12% у рифампицин-резистентных мутантов.

Антимутагенная и SOS-ингибирующая активность этих двух штаммов близки по диапазону. Следует отметить, что усиление SOS-ингибирующей активности у мутантов значительно выше у штамма *B. subtilis* KATMIRA1933.

Сопоставление результатов для двух видов бацилл позволяет заключить, что Rif^R-мутации воспроизводимо усиливают все три аспекта протекторной активности вне зависимости от видовой принадлежности штамма, что подтверждает универсальность плеiotропных эффектов изменений РНК-полимеразы на транскрипцию генов. Установленные в настоящей работе закономерности согласуются с массивом данных о плеiotропном влиянии *groB*-мутаций на вторичный метаболизм у различных представителей бактерий. Так, у *Bacillus velezensis* рифампицин-резистентные мутанты характеризовались повышенной продукцией нерибосомальных пептидов антифунгальной природы, в частности итурина (Cai et al., 2017). У *Pseudomonas protegens* мутации в β -субъединице РНК-полимеразы обуславливали усиление противогрибковой активности за счёт активации биосинтеза 2,4-диацетилфлороглюцинола и пиолитеорина (Xie et al., 2016), тогда как у представителей рода *Streptomyces* *groB*-замены индуцировали

биосинтез антибиотиков, в норме не продуцируемых либо продуцируемых на низком уровне (Zhong et al., 2014).

При этом штаммоспецифичность проявляется прежде всего в различии базовых уровней активности, тогда как направленность и относительная выраженность эффекта мутации остаются сходными у обоих видов. Полученные данные подтверждают перспективность использования Rif⁺-селекции как инструмента направленного улучшения стрессозащитных свойств штаммов-продуцентов в биотехнологических целях.

Далее было рассмотрено влияние мутаций в гене *groV* на выработку метаболитов с противогрибковыми свойствами. Были отобраны топ-5 штаммов с активностью против грибов рода *Candida*. Противогрибковая активность измерялась как в обычных условиях, так и при культивировании на среде с добавлением лизата грибов рода *Candida* (весь список исследованных штаммов представлен в Приложении 1).

Таблица 6. Противогрибковая активность штаммов, отобранных для анализа.

Название штамма	Зона подавления без добавления <i>Candida</i> в среду, мм	Зона подавления с добавлением <i>Candida</i> в среду, мм
С 15	23	28
С 49.1А	14	27
С 65А	25	22
С 65 В	25	27
С 76.2	0	25

Как можно видеть из представленных данных, штаммы С 49.1А, С 76.2 показали наибольший уровень индукции при культивировании на лизате *S. albicans*. Штамм С 65А проявляет наибольший антагонистический эффект в индуцированном и не индуцированном состоянии, штамм С15 проявляет

наибольший антагонистический эффект после индукции, а штамм C65B проявляет сильный антагонистический эффект, но слабо индуцируется.

Далее было протестировано 5 контрольных штаммов и 15 мутантных штаммов на возможность подавления роста гриба рода *Fusarium*. Анализ антагонистической активности штаммов и рифампицин-устойчивых мутантов в отношении фитопатогенного гриба *Fusarium* I проводился методом совместного культивирования на агаризованной питательной среде. Оценка зон подавления роста патогена осуществлялась на 5-е и 7-е сутки культивирования. Данные по их антагонистической активности сведены в Таблицу 7, а также представлены на Рисунках 4-7.

Таблица 7. Антагонистическая активность исследованных штаммов по отношению к *Fusarium* H.

Название штамма	Наличие антагонистической активности; Зона подавления, ширина, мм
C15 K	8
C 15 Rif ^r 1	6
C 15 Rif ^r 2	10
C 15 Rif ^r 3	8
C 15 Rif ^r 4	11
C 49.1A K	5
C 49.1A Rif ^r 1	5
C 49.1A Rif ^r 2	5
C 49.1A Rif ^r 3	5
C 65A K	6
C 65A Rif ^r 1	7
C 65A Rif ^r 2	5
C 65A Rif ^r 3	5
C 65B K	4

Название штамма	Наличие антагонистической активности; Зона подавления, ширина, мм
C 65B Rif ^r 1	7
C 65B Rif ^r 2	5
C 65B Rif ^r 3	4
C 76.2 K	-
C 76.2 Rif ^r 1	6
C 76.2 Rif ^r 2	8

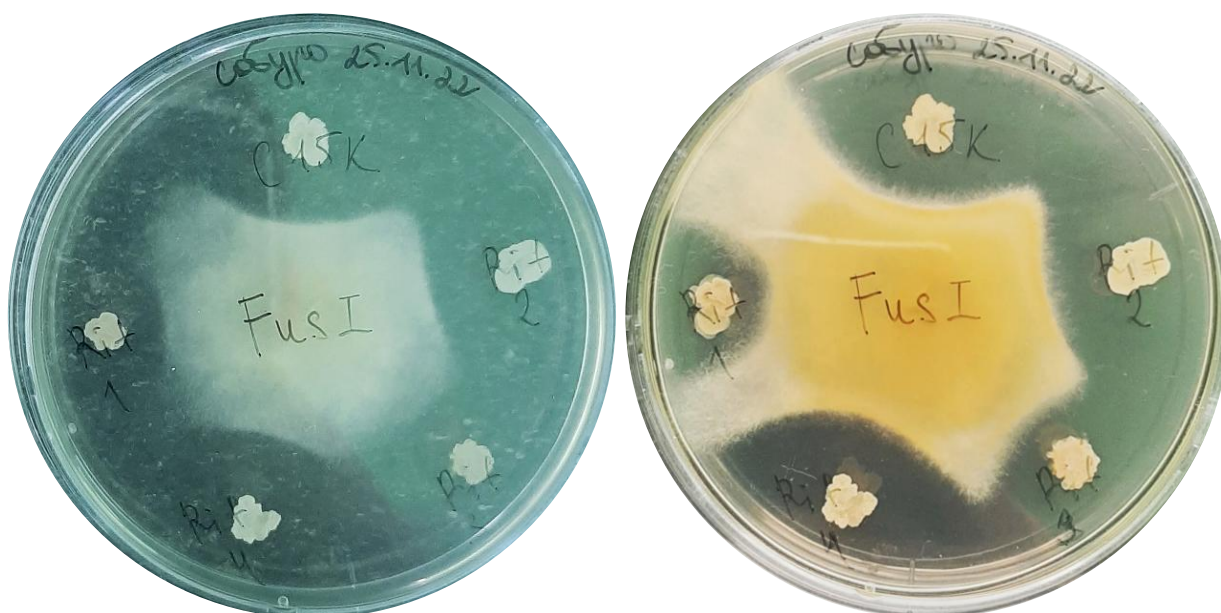


Рисунок 4. Зоны подавления *Fusarium* I штаммом С 15 (слева – на 5 сутки культивации, справа - на 7 сутки культивации)

У штамма С 15 самыми перспективными мутантами являются Rif^r 2 (зона подавления 10 мм) и Rif^r 4 (зона подавления 11 мм) по сравнению с контрольным штаммом (зона подавления 8 мм).

Установлено, что исходный штамм С 15 проявляет выраженную антагонистическую активность: зона подавления роста *Fusarium* I составила 8 мм, что свидетельствует о способности данного штамма продуцировать биологически активные вещества с фунгистатическим действием. Визуальное сравнение чашек на 5-е и 7-е сутки (Рисунок 4, слева и справа соответственно)

демонстрирует стабильность ингибирующего эффекта в динамике культивирования, что указывает на устойчивую продукцию противогрибковых соединений в процессе роста штамма.

Увеличение антагонистической активности у рифампицин-устойчивых мутантов может быть обусловлено мутациями в гене *rpoB*, кодирующем β -субъединицу РНК-полимеразы, что способно приводить к перестройке регуляторных каскадов, контролирующих биосинтез вторичных метаболитов — в частности, липопептидов типа итурина, фенгицина и сурфактина.

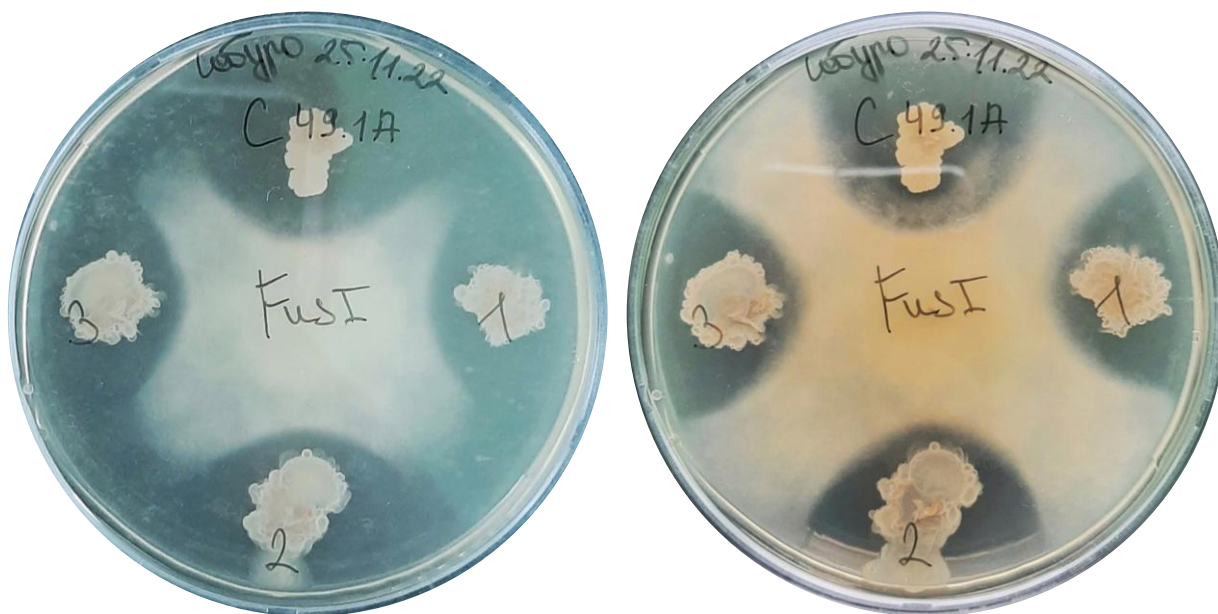


Рисунок 5. Зоны подавления *Fusarium* I штаммом С 49.1А (слева – на 5 сутки культивации, справа - на 7 сутки культивации)

В отличие от штамма С 15, у штамма С 49.1А не было выявлено каких-либо изменений антагонистической активности у рифампицин-устойчивых мутантов. Зоны подавления роста *Fusarium* I у всех исследованных вариантов — как у родительского штамма, так и у мутантов — составили 5 мм. Данный результат свидетельствует о том, что приобретение устойчивости к рифампицину в случае штамма С 49.1А не повлекло за собой перестройки регуляторных механизмов, ответственных за биосинтез противогрибковых соединений.

Отсутствие позитивного плеiotропного эффекта, характерного для ряда Rif^r-мутантов, может объясняться специфическими особенностями генетической

организации данного штамма, а также возможным иным типом мутации в гене *proB*, не затрагивающим регуляцию вторичного метаболизма.

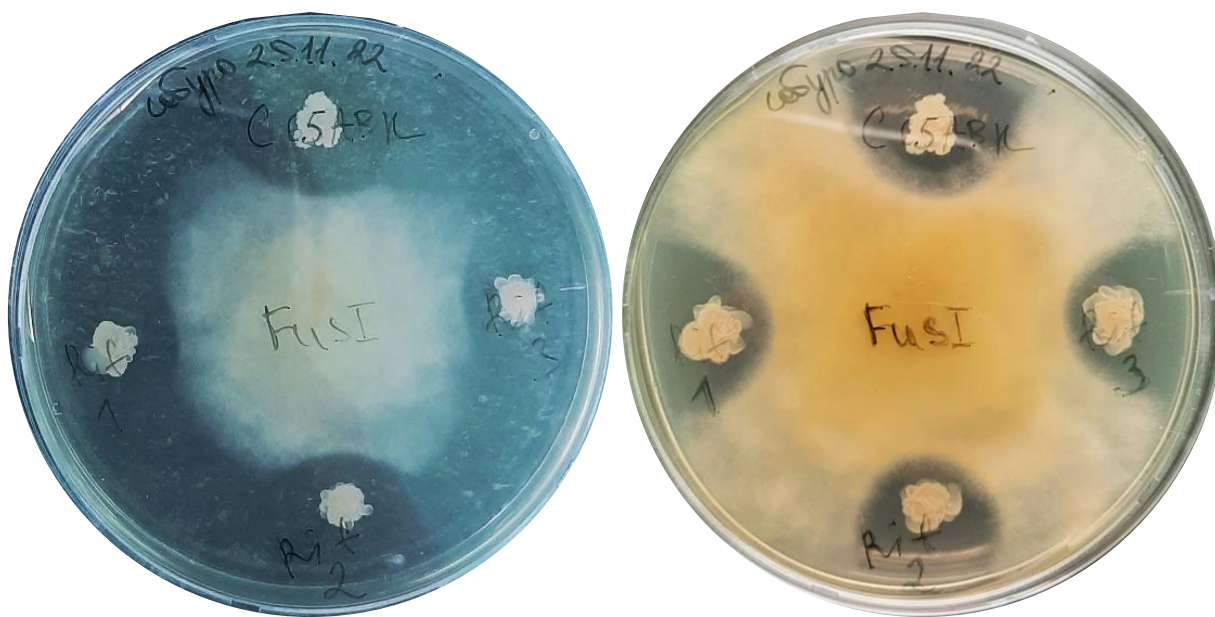


Рисунок 6. Зоны подавления *Fusarium* I штаммом С 65А (слева – на 5 сутки культивации, справа - на 7 сутки культивации)

У штамма С 65А мутанты устойчивые к рифампицину, наоборот, показали меньшие зоны подавления (5 мм), чем контрольный штамм (7 мм).

Результаты эксперимента выявили нетипичную тенденцию: рифампицин-устойчивые мутанты штамма С 65А продемонстрировали достоверное снижение антагонистической активности по сравнению с родительским штаммом. Если контрольный штамм С 65А формировал зону подавления роста *Fusarium* I диаметром 7 мм, то у всех его Rif^r-мутантов данный показатель снизился до 5 мм.

Подобная картина может свидетельствовать о том, что мутации в гене *proB*, обусловившие приобретение устойчивости к рифампицину, оказали негативное плеiotропное воздействие на биосинтез противогрибковых метаболитов у данного штамма. Не исключено, что изменения в структуре РНК-полимеразы нарушили транскрипцию генных кластеров, ответственных за синтез липопептидов или других биологически активных соединений с фунгистатическим действием.

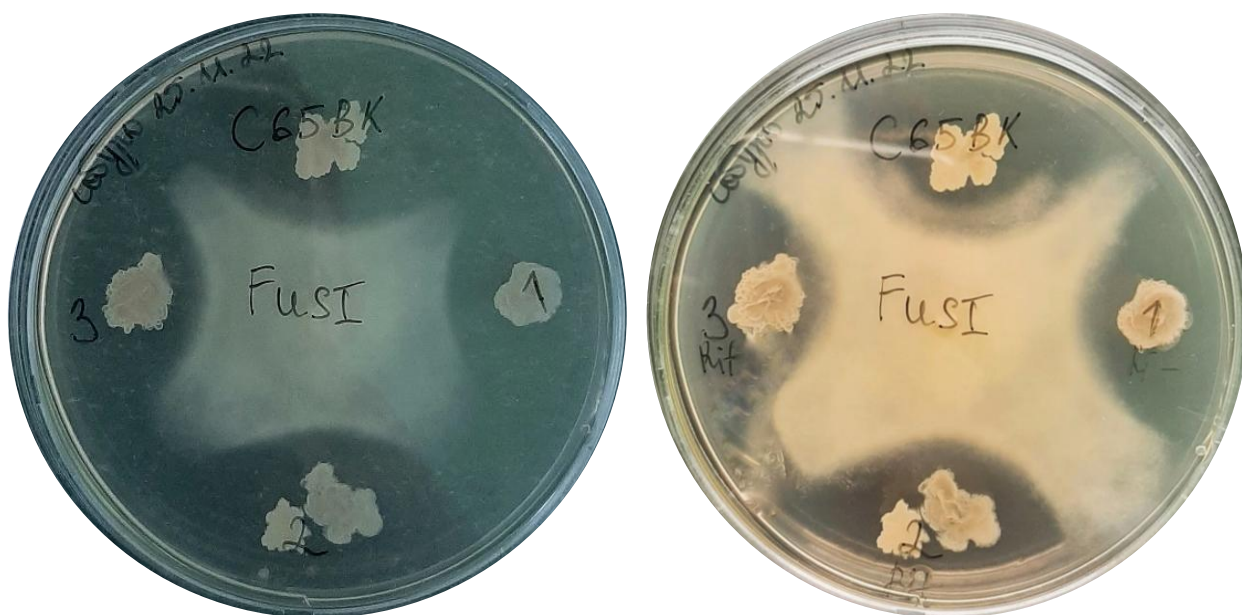


Рисунок 7. Зоны подавления *Fusarium* I штаммом С 65В (слева – на 5 сутки культивации, справа - на 7 сутки культивации)

У штамма С 65В самым перспективным мутантом является Rif^r1, у которого зона подавления составила 7 мм против 4 мм у контрольного штамма.

Исходный штамм С 65В проявлял умеренную антагонистическую активность: зона подавления роста *Fusarium* I составила 4 мм. Среди полученных Rif^r-мутантов данного штамма наибольший интерес представляет мутант Rif^r 1, у которого зона подавления возросла до 7 мм.

Увеличение зоны подавления у мутанта Rif^r1 свидетельствует о выраженном позитивном плеiotропном эффекте, связанном с приобретённой мутацией в гене *proB*. Вероятно, данная мутация активирует регуляторные пути, стимулирующие синтез противогрибковых соединений, что в совокупности обеспечивает усиленное подавление роста *Fusarium* I.



Рисунок 8. Зоны подавления *Fusarium* Н штаммом С 76.2 (слева – на 5 сутки культивации, справа - на 7 сутки культивации)

У штамма С 76.2 наблюдается появление антагонистической активности у обоих мутантов (6 и 8 мм соответственно), в то время как у контрольного штамма активности не было обнаружено.

Наиболее примечательным результатом, полученным для данного штамма, является появление антагонистической активности *de novo* у обоих рифампицин-устойчивых мутантов. Родительский штамм С 76.2 не проявлял какой-либо активности в отношении *Fusarium*, тогда как у его мутантов были зафиксированы зоны подавления 6 и 8 мм соответственно. Данный феномен представляет особый научный интерес, поскольку свидетельствует о принципиальной возможности активации скрытого противогрибкового потенциала бактериальных штаммов посредством направленного мутагенеза.

Возникновение антагонистической активности у Rif^r-мутантов штамма С 76.2 может быть объяснено активацией «молчащих» биосинтетических генных кластеров, транскрипция которых в норме подавлена или не достигает функционально значимого уровня. Мутации в гене *rpoB* способны изменять сродство РНК-полимеразы к промоторам, что влечёт за собой перепрограммирование транскриптома и, как следствие, включение ранее неактивных метаболических путей. Мутант с зоной подавления 8 мм

демонстрирует особенно высокий прикладной потенциал и для изучения в контексте разработки биологических средств защиты растений от фузариоза.

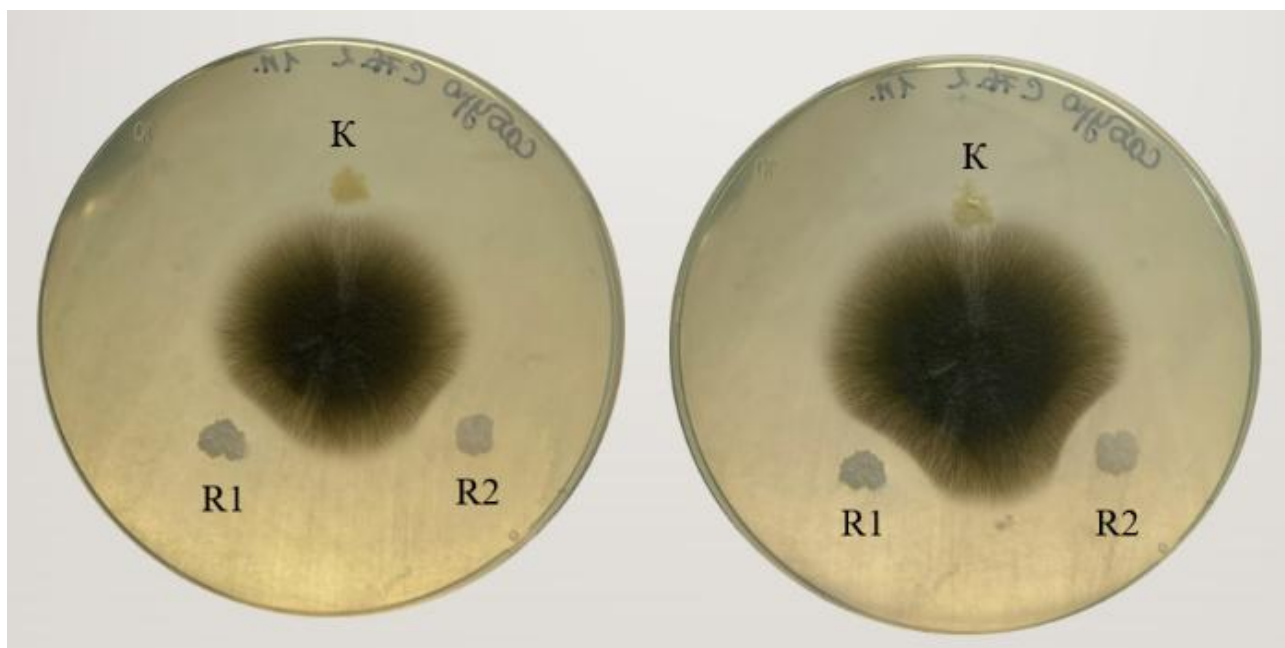
Для подтверждения генетической стабильности приобретённых свойств рифампицин-устойчивые мутанты штамма С 76.2, проявившие антагонистическую активность в отношении *Fusarium* Н, были подвергнуты серийному пассированию. Пассирование осуществлялось на жидкой питательной в течение 10 последовательных пассажей (10 суток). Данный подход является общепринятым методом оценки стабильности мутантных фенотипов: нестабильные мутации, связанные лишь с адаптивным ответом клетки, как правило, реверсируют уже в первых пассажах, тогда как истинные геномные мутации сохраняются на протяжении многих поколений.

По завершении серийного пассирования была проведена оценка антагонистической активности полученных культур в отношении двух фитопатогенных грибов — *Alternaria* sp. и *Cladosporium* sp (табл.8 рис. 9, 10). Выбор данных объектов обусловлен их широкой распространённостью в агроценозах и значительным экономическим ущербом, который они наносят сельскохозяйственным культурам: *Alternaria* является возбудителем альтернариоза, вызывающего некроз листьев, плодов и семян, тогда как *Cladosporium* провоцирует оливковую плесень и кладоспориоз, поражающие широкий спектр культурных растений.

Таблица 8. Антагонистическая активность штамма С 76.2

Название штамма	Название гриба	
	<i>Alternaria</i>	<i>Cladosporium</i>
	Зона подавления, ширина, мм	
С 76.2	-	-
С 76.2 Rif 1	5	4
С 76.2 Rif2	5	7

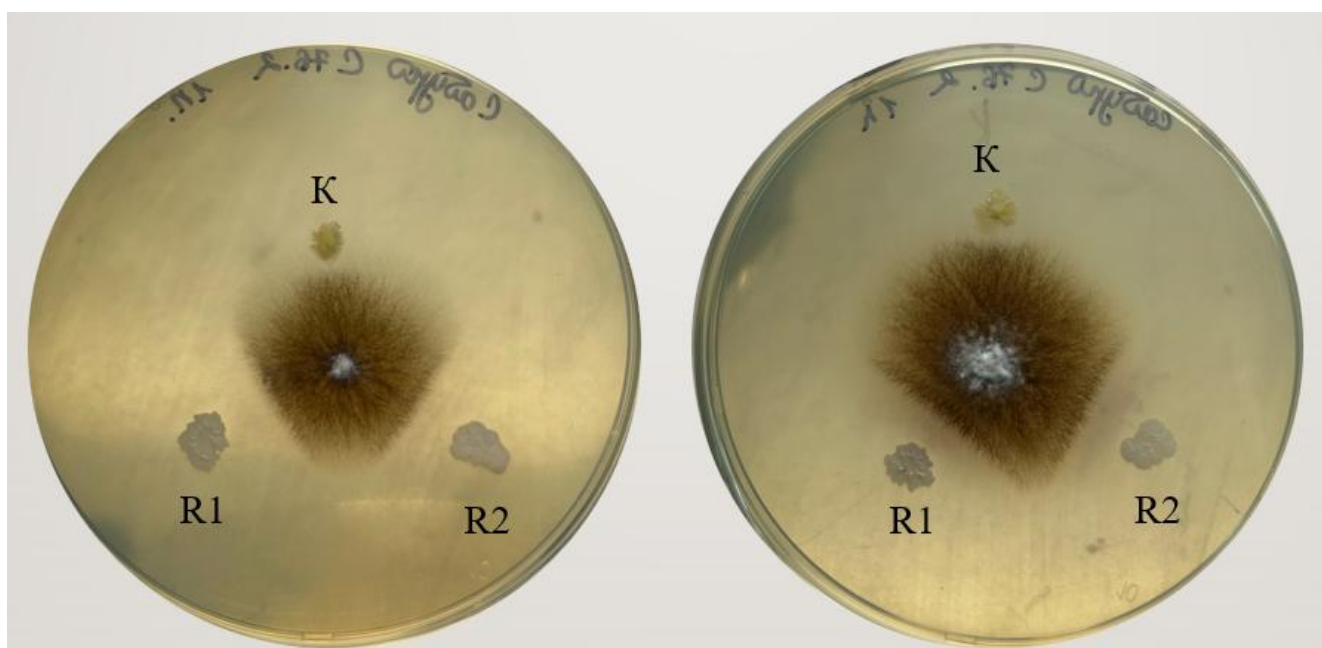
Исходный штамм С 76.2 не проявлял антагонистической активности в отношении ни одного из тестируемых грибов — зоны подавления роста отсутствовали.



А

Б

Рисунок 9. Зоны подавления *Cladosporium* штаммом С 76.2. А – 1 пассаж, Б – 10 пассаж



А

Б

Рисунок 10. Зоны подавления *Alternaria* штаммом С 76.2. А – 1 пассаж, Б – 10 пассаж.

Получение рифампицин-резистентных мутантов С 76.2 Rif1 и С 76.2 Rif2 привело к появлению выраженной противогрибковой активности. Оба мутанта подавляли рост *Alternaria* с одинаковой эффективностью (зона

подавления 5 мм). В отношении *Cladosporium* мутанты различались между собой: С 76.2 Rif1 показал умеренную активность (4 мм), тогда как С 76.2 Rif2 — более выраженную (7 мм).

Проведённый десятикратный пассаж мутантов штамма С 76.2 не привёл к снижению антагонистической активности в отношении грибов *Alternaria* и *Cladosporium*, что свидетельствует о стабильности данного свойства в ходе многократного культивирования. Полученные данные позволяют заключить, что антагонистический эффект у исследованных мутантов является устойчивым и сохраняется после проведения серийного пассирования, что подтверждает перспективность штамма для дальнейшего использования в качестве стабильного продуцента.

Стоит отметить, что отрицательный результат, полученный для штамма С65А, представляет самостоятельный научный интерес. Из пяти изученных штаммов серии С *rpoB*-мутации привели к усилению антагонистической активности у С15, С65В и С76.2, не оказали значимого влияния на данный показатель у С49.1А и обусловили его снижение у С65А. Подобная гетерогенность ответа представляется закономерной, поскольку каждая аминокислотная замена в β -субъединице РНК-полимеразы формирует индивидуальный спектр воздействия на физиологию клетки, включая процессы споруляции, формирования компетентности и вторичного метаболизма (Maughan et al., 2004).

Направленность эффекта определяется тем, какие именно промоторные участки затрагиваются конкретной заменой: активация «молчащих» биосинтетических кластеров сопровождается приростом активности (как в случае С76.2), тогда как снижение сродства РНК-полимеразы к промоторам конститутивно экспрессируемых биосинтетических генов обуславливает противоположный эффект. Отсутствие статистически значимых изменений у штамма С49.1А, по-видимому, объясняется локализацией соответствующей мутации в участке гена *rpoB*, не затрагивающем регуляцию вторичного метаболизма.

Полученные данные подчёркивают, что groV-опосредованная селекция является инструментом ненаправленного действия и требует проведения индивидуального фенотипического скрининга мутантов для каждого штамма в отдельности, тогда как экстраполяция эффекта, установленного для одного штамма, на другие представляется научно необоснованной.

Также были получены мутанты, устойчивые к рифампицину для другой функциональной группы штаммов - CL 33, 35, 56, которые представляют собой пробиотик для крупного рогатого скота.

Исследованные штаммы были оценены на предмет их способности подавлять биолюминесценцию у *A. logei*. Результаты отображены на рисунке 12, где представлены зоны ингибирования биолюминесценции, проявляемые изолятами.

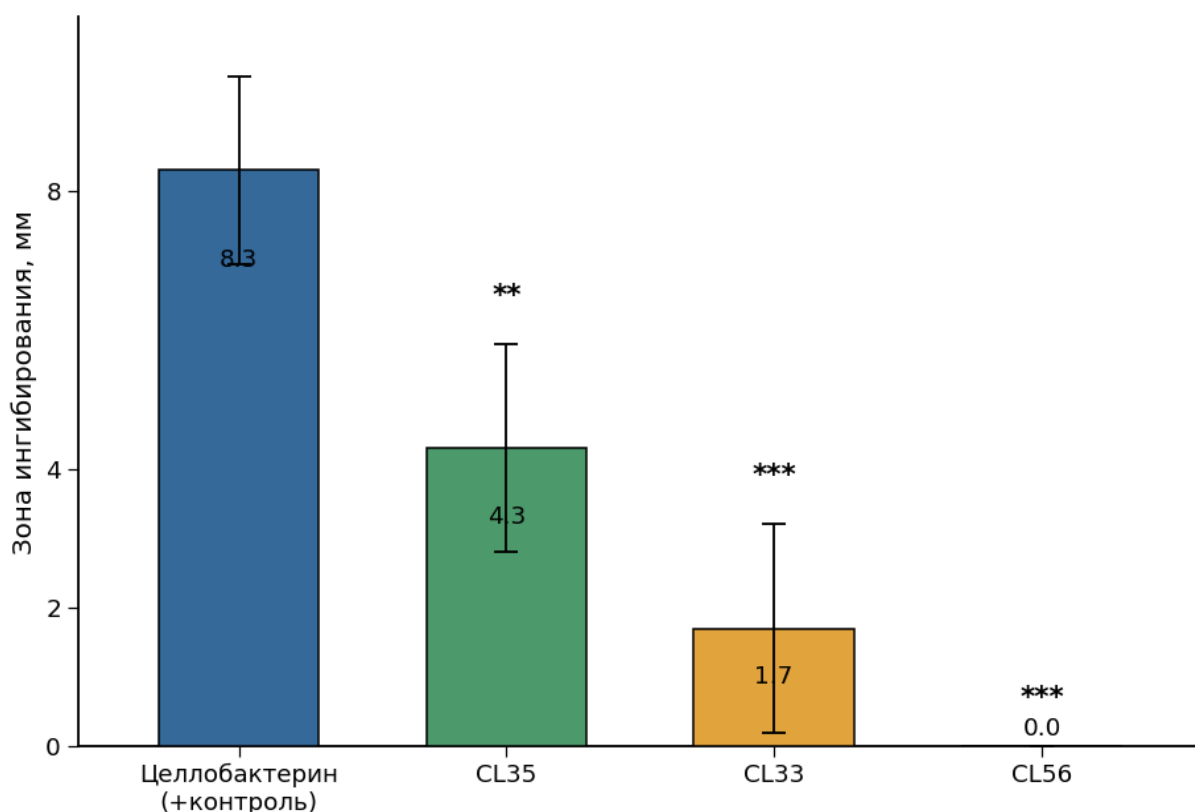


Рисунок 11. Зоны ингибирования биолюминесценции *A. logei* 12146

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs Целлобактерин) Среди протестированных новых изолятов наибольшую ингибирующую активность показал CL35.

Все три штамма достоверно уступали по активности контрольному препарату, причём степень снижения нарастала от CL35 к CL56, у которого подавляющий эффект полностью отсутствовал. Выявленные различия указывают на штамм-специфический характер активности и позволяют рассматривать CL35 как наиболее перспективный изолят данной группы для дальнейшего изучения.

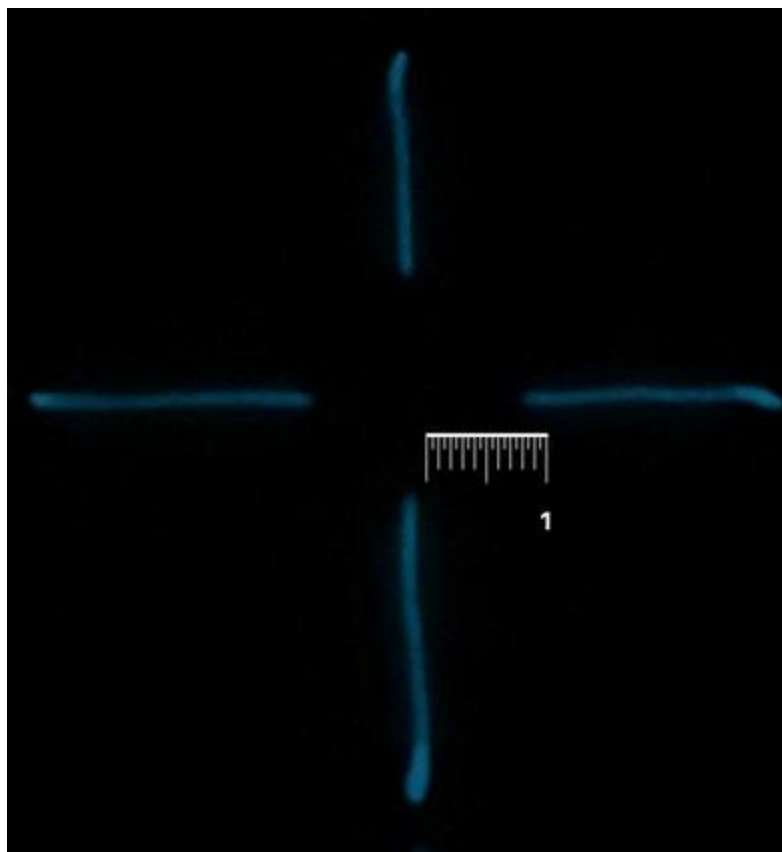


Рисунок 12. Зона подавления активности *Alivibrio logei* при взаимодействии со штаммом CL35.

Для изучения связи потенциальной активности со специфическими генетическими маркерами мы дополнительно проанализировали три штамма с высокой (CL35), средней (CL33) и отсутствующей (CL56) активностью QQ, причем последний штамм оказался единственным сильным целлюлолитиком из трех (Prazdnova E. V. et al., 2026).

Было проведено полногеномное секвенирование изолятов, отобранных на предыдущем этапе (CL33, CL35, CL56). Принадлежность штаммов CL33 и CL56 к виду *B. licheniformis*, а штамма CL35 — к виду *B. safensis*,

подтверждена результатами расчёта средней нуклеотидной идентичности и цифровой ДНК–ДНК-гибридизации. При сравнении с типовым штаммом *B. licheniformis* NCTC10341 значения ANI для CL33 и CL56 составили 99,68 % и 99,82 %, а значения dDDH — 95,90 % и 96,10 % соответственно. Для штамма CL35 при сравнении с типовым штаммом *B. safensis* FO-36b^T значение ANI составило 96,50 %, dDDH — 93,20 %

Таким образом, CL33 и CL56 были идентифицированы как *B. licheniformis*, а CL35 — как *B. safensis*.

Был проведен поиск генов *cotA*, *aiiA*, марганцевой пероксидазы, *bsaPUE* и *dypB* в геномах. На основании результатов гены *aiiA* и *bsDyP* не были обнаружены в геномах CL33, CL35 и CL56, в то время как ген *cotA* присутствовал во всех трех штаммах. Совпадения для *cotA* показали 100% идентичность с известными белками лакказы из различных видов *Bacillus*. Ген *cotA* был обнаружен в штамме CL33, и было найдено 100% совпадение с геном лакказы *cotA* из *Bacillus* sp. LS04 (название записи UniProt H8WGE4_9BACI), а также с медьсодержащей лакказой *cotA* внешней оболочки споры из *B. licheniformis* (BHE48658.1). Штамм CL35 также содержит ген *cotA*, и в базе данных имеются совпадения с лакказой *cotA* из *B. safensis* (A0A5C0WF34_BACIA) и *cotA*-лакказой из *B. altitudinis* (WNY32712.1). Штамм CL56 также имеет ген *cotA*, который оказался похожим на лакказу *cotA* из *Bacillus* sp. LS04 (H8WGE4_9BACI) и медьсодержащую лакказу *cotA* внешней оболочки споры из *B. licheniformis* (BHE48658.1). Ген *bsaPUE* в штамме CL33 умеренно похож на фосфоенолпируват-протеинфосфотрансферазы из видов *Bacillus*, как и в штаммах CL35 и CL56. Для штамма CL33 ген *bsaPUE* совпал с геном фосфоенолпируват-протеинфосфотрансферазы из *B. oleivorans* (A0A285D2C9) (сходство 71,7%) и геном фосфоенолпируват-протеинфосфотрансферазы из *Bacillus mycoides* (A0A109FTY2) (сходство 76,3%). Штаммы CL35 и CL56 показали сходные совпадения с теми же позициями в базе данных, что и штамм CL33. Ген марганцевой пероксидазы в штамме CL33 совпал с предполагаемыми

марганцевыми каталазами видов *Bacillus*: он совпал с предполагаемой марганцевой каталазой из *B. licheniformis* (ARW56011.1), предполагаемой марганцевой каталазой из *B. licheniformis* (AOP17108.1) и предполагаемой марганцевой каталазой из *B. sonorensis* (ASB87063.1). Для штаммов CL35 и CL56 были обнаружены только совпадения с каталазами (Prazdnova E. et al., 2026). Последнее наблюдение представляется важным для понимания потенциальной взаимозаменяемости функций разложения микотоксинов внутри этих штаммов.

Полученные ранее результаты полногеномного анализа штаммов *Bacillus licheniformis* CL33, CL56 и *Bacillus safensis* CL35, а также данные об их способности к деградации микотоксинов частично изложены в работе (Prazdnova, E., 2026).

Проведен иммуноферментный анализ для проверки возможности разложения микотоксинов контрольными CL-штаммами и Rif^R-мутантами. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – результаты ИФА

Штамм	Концентрация зеараленона, мкг/мл
Чистый микотоксин	0,544±0,073
CL33	0,073±0,023
CL35	0
CL56	0,306±0,028
CL33 Rif	0,289±0,033
CL35 Rif	0,108±0,040
CL56 Rif	0,307±0,064

Спектры поглощения в УФ-диапазоне демонстрируют снижение интенсивности характерного пика зеараленона в образцах, инкубированных со штаммами CL33 и CL35, причём для CL35 поглощение в данной области снижалось наиболее значительно. Для штамма CL56 изменение спектрального сигнала было минимальным, что согласуется с низкой деградирующей активностью, выявленной методом ИФА. У рифампицин-резистентных штаммов снижение поглощения было менее выраженным по сравнению с

исходными штаммами, что подтверждает снижение их способности к деградации зеараленона.

Результаты, полученные методом ИФА, свидетельствуют о способности исследуемых штаммов снижать концентрацию зеараленона, однако выраженность данного эффекта существенно различалась между отдельными изолятами. В контрольной пробе, содержащей только микотоксин, его концентрация составила $0,544 \pm 0,073$ мкг/мл. Внесение штамма CL33 приводило к снижению содержания зеараленона до $0,073 \pm 0,023$ мкг/мл, что соответствует приблизительно семикратному уменьшению относительно контроля. Наиболее выраженный эффект наблюдался для штамма CL35: определяемая концентрация зеараленона опускалась ниже предела обнаружения метода, что может свидетельствовать как о полной биodeградации микотоксина, так и о его эффективном связывании, препятствующем детекции. Штамм CL56 проявлял значительно меньшую активность: концентрация зеараленона составила $0,306 \pm 0,028$ мкг/мл. Среди исследованных штаммов наибольшей способностью к деградации зеараленона обладали CL35 и CL33.

Значения для исходных штаммов CL33, CL35 и CL56 согласуются с нашими ранее опубликованными данными (Prazdnova E. et al., 2026); данные по рифампицин-резистентным мутантам (CL33 Rif, CL35 Rif, CL56 Rif) получены в настоящей работе впервые.

У мутантов, устойчивых к рифампицину, эффективность деградации зеараленона была ниже по сравнению с исходными штаммами. Для CL33 Rif определяемая концентрация микотоксина составила $0,289 \pm 0,033$ мкг/мл, для CL35 Rif — $0,108 \pm 0,040$ мкг/мл, для CL56 Rif — $0,307 \pm 0,064$ мкг/мл. Снижение деградирующей активности у мутантов может быть обусловлено изменением транскрипционного профиля вследствие мутации в гене *rpoB*.

В настоящем исследовании указанные мутации приводили к усилению протекторной (антиоксидантной, ДНК-протекторной, анти-SOS) активности у пробиотических штаммов, однако сопровождалась снижением эффективности

деградации зеараленона у всех трёх исследованных CL-штаммов. Можно предположить, что перестройка транскрипционного профиля под действием мутаций в *proV* приводит к перераспределению ресурсов, вследствие чего усиление экспрессии одних биосинтетических кластеров может сопровождаться репрессией других (Patel et al., 2023).

За формирование протекторной активности и за деградацию микотоксинов у изученных штаммов, по всей видимости, отвечают различные по природе ферментные системы. Если протекторный эффект связан с продукцией вторичных метаболитов пептидной и непептидной природы, то деградация зеараленона у бактерий рода *Bacillus* опосредуется преимущественно медьзависимой лакказой CotA (Sun et al., 2023; Guo et al., 2020), а также, возможно, оксидоредуктазами со сходной субстратной специфичностью (Koschorreck et al., 2008).

Также полученные результаты позволяют предположить взаимосвязь между способностью штаммов к деградации зеараленона и их активностью в отношении подавления кворум-сенсинга. Штамм CL35, демонстрировавший наиболее высокую QQ-активность в тестах с *A. logei*, одновременно проявил наибольшую эффективность деградации зеараленона — его концентрация опускалась ниже предела обнаружения метода ИФА. Штамм CL33 занимал промежуточное положение по обоим показателям, тогда как CL56, не проявлявший QQ-активности, характеризовался и наименьшей способностью к снижению уровня микотоксина.

Показательно, что у рифампицин-резистентных мутантов одновременно наблюдалось снижение как деградирующей активности в отношении зеараленона, так и изменение регуляции вторичного метаболизма, что может косвенно затрагивать и QQ-активность. Мутация в гене *proV* способна перестраивать глобальный транскрипционный профиль, затрагивая регуляцию нескольких метаболических путей одновременно, что объясняет согласованное снижение обеих активностей у мутантов.

Совокупность этих наблюдений указывает на возможную функциональную сопряжённость путей деградации микотоксинов и подавления QS у исследованных штаммов. Вероятным молекулярным основанием данной связи может служить ген *cotA* кодирующий лакказу с широкой субстратной специфичностью: этот фермент способен окислять как фенольные компоненты сигнальных молекул системы QS, так и микотоксины с хиноидной структурой, к которым относится зеараленон (Koschorreck K. et al., 2008).

3.3 Полногеномное секвенирование и изучение спектра мутаций штамма C76.2 Rif⁺ в сравнении с исходным штаммом

В сборке генома обнаружены два контига, содержащих последовательности, аннотированные как ген *rpoB*.

Результаты для первой последовательности представлены на Рисунках 13-23.

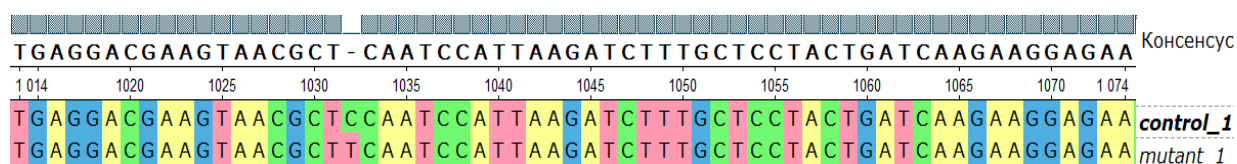
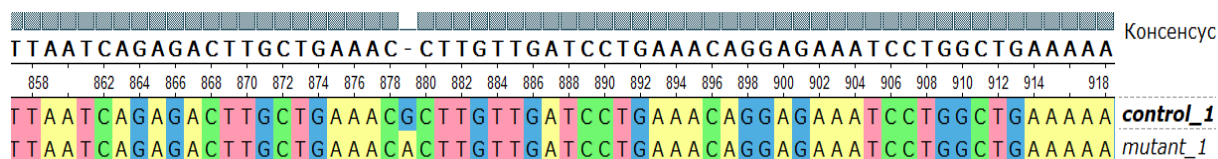


Рисунок 14. Замена C→T в 1032 положении

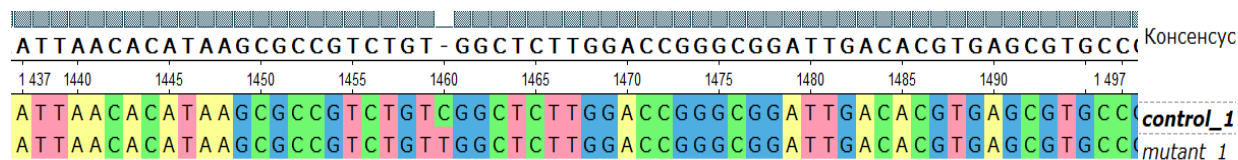


Рисунок 15. Замена C→T в 1460 положении

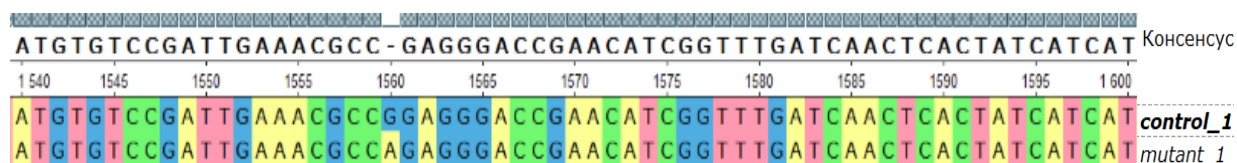


Рисунок 16. Замена G→A в 1560 положении

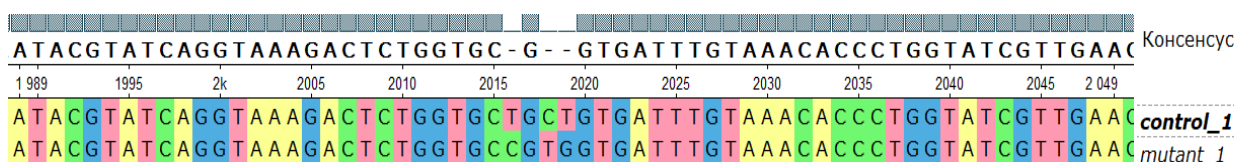


Рисунок 17. Замена Т→С в 2016 положении, С→Т в 2018 положении, Т→Г в 2019 положении

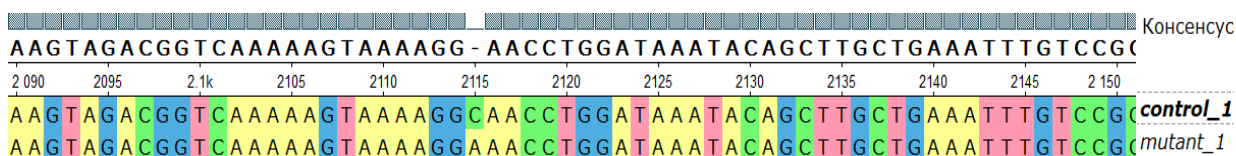


Рисунок 18. Замена С→А в 2115 положении

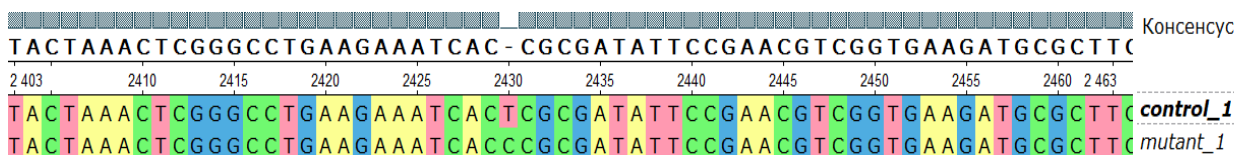


Рисунок 19. Замена Т→С в 2430 положении

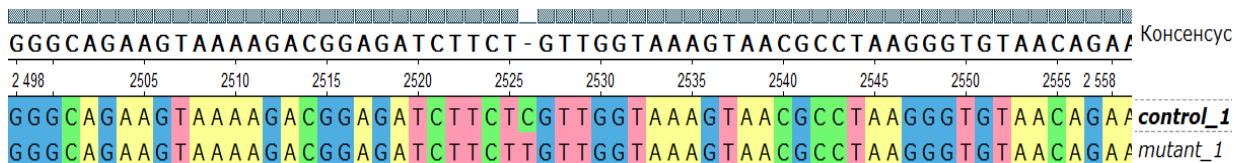


Рисунок 20. Замена С→Т в 2526 положении

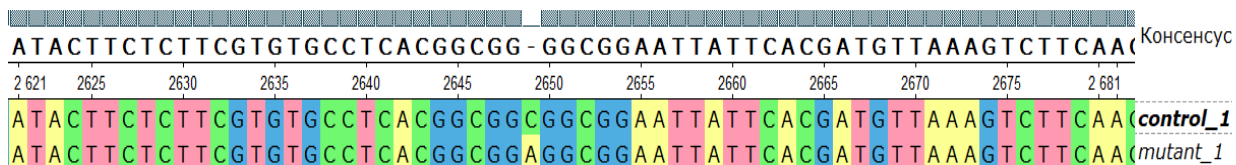


Рисунок 21. Замена С→А в 2649 положении

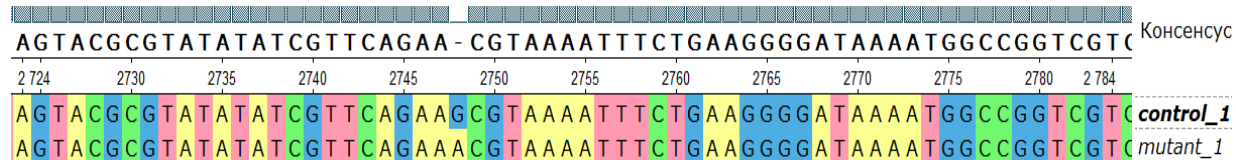


Рисунок 22. Замена G→A в 2748 положении

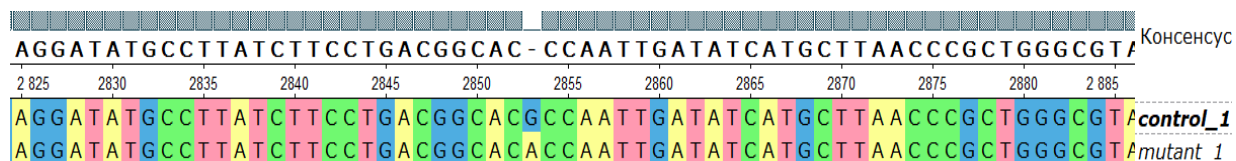


Рисунок 23. Замена G→A в 2853 положении

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей исходного штамма и рифампицин-резистентного мутанта, выполненный в программе Unipro UGENE 53.1, выявил 13 точечных замен, распределённых по всей длине анализируемого фрагмента (таблица 10).

Большинство замен представляют собой транзиции — замены пуринового основания на пуриновое или пиримидинового на пиримидиновое: G→A (позиции 879, 1560, 2748, 2853), C→T (позиции 1032, 1460, 2018, 2526) и T→C (позиции 2016, 2430). Три замены относятся к трансверсиям — замене пурина на пиримидин или наоборот: C→A (позиции 2115, 2649) и T→G (позиция 2019). Кластеризация замен в области позиций 2016–2019 (три замены в пределах четырёх нуклеотидов) представляет особый интерес, поскольку может свидетельствовать о локальной нестабильности данного участка.

Характер выявленных замен согласуется с известным механизмом устойчивости к рифампицину, обусловленным мутациями в гене β -субъединицы *rpoB*: замены в кластерных районах этого гена нарушают контакт РНК-полимеразы с рифампицином, не затрагивая при этом каталитическую активность фермента.

Таблица 10 – Точечные замены нуклеотидов в геноме C76.2 Rif⁺ относительно исходного штамма

№	Позиция	Замена	Тип
1 копия			
1	879	G→A	Транзиция
2	1032	C→T	Транзиция
3	1460	C→T	Транзиция
4	1560	G→A	Транзиция
5	2016	T→C	Транзиция
6	2018	C→T	Транзиция
7	2019	T→G	Трансверсия

№	Позиция	Замена	Тип
8	2115	C→A	Трансверсия
9	2430	T→C	Транзиция
10	2526	C→T	Транзиция
11	2649	C→A	Трансверсия
12	2748	G→A	Транзиция
13	2853	G→A	Транзиция
2 копия			
1	495	A→G	Транзиция
2	1048	T→C	Транзиция
3	1203	G→A	Транзиция
4	1308	T→C	Транзиция
5	1317	T→C	Транзиция
6	1461	G→A	Транзиция
7	1491	T→G	Трансверсия
8	1530	C→T	Транзиция
9	1533	C→T	Транзиция
10	1656	G→A	Транзиция
11	1693	C→T	Транзиция
12	1728	A→T	Трансверсия
13	1773	T→A	Трансверсия
14	2031	A→G	Транзиция
15	2466	A→T	Трансверсия
16	2562	T→C	Транзиция
17	3096	A→G	Транзиция
18	3148	G→A	Транзиция

Результаты для второй последовательности представлены на Рисунках 24-35.

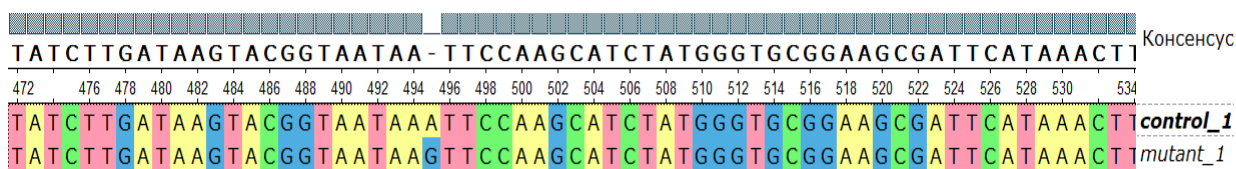


Рисунок 24. Замена А→G в 495 положении

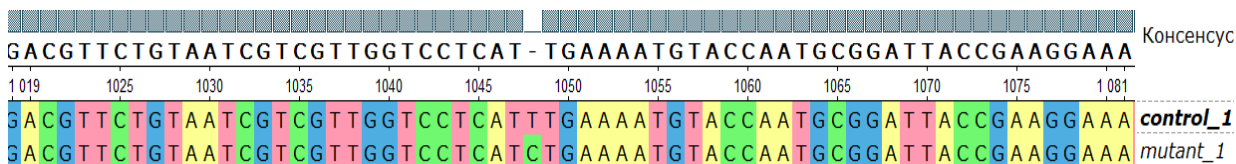


Рисунок 25. Замена Т→C в 1048 положении

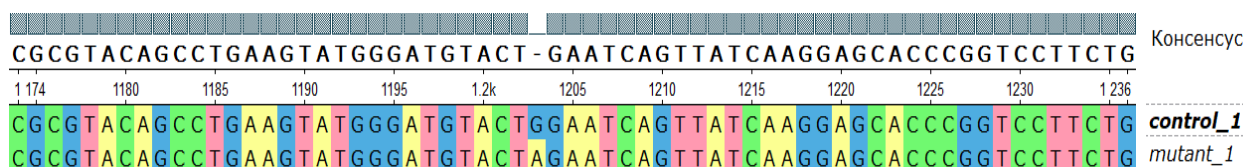


Рисунок 26. Замена G→A в 1203 положении

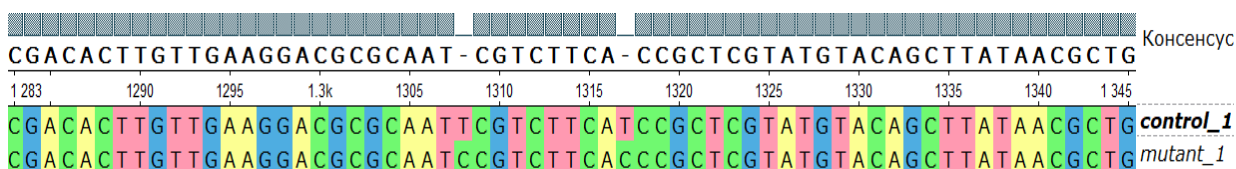


Рисунок 27. Замена Т→C в 1308 положении; Т→C в 1308 положении 1317

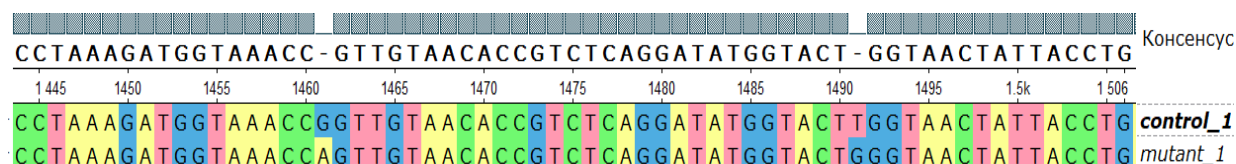


Рисунок 28. Замена G→A в 1461 положении; Т→G в 1308 положении 1491

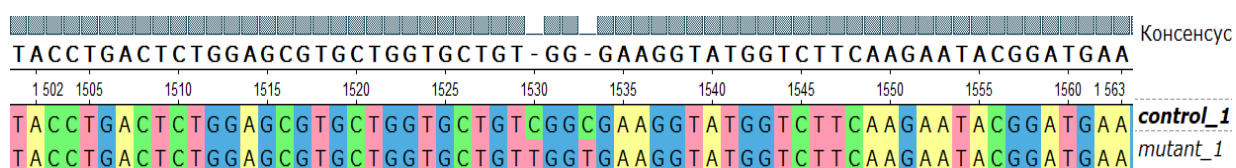


Рисунок 29. Замена C→T в 1530 положении; C→T в положении 1533

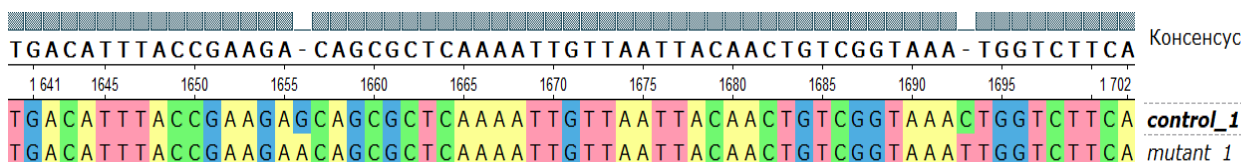
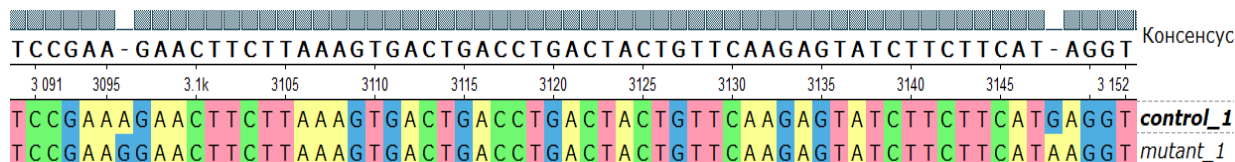
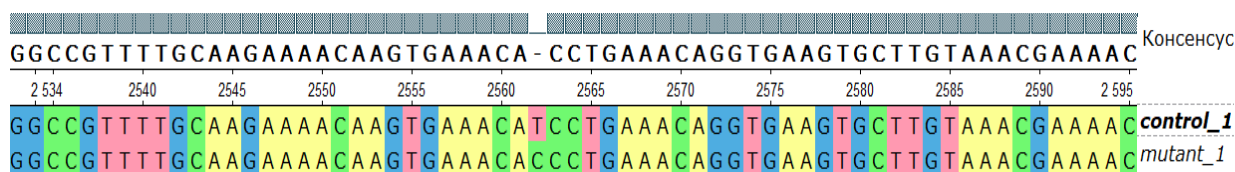
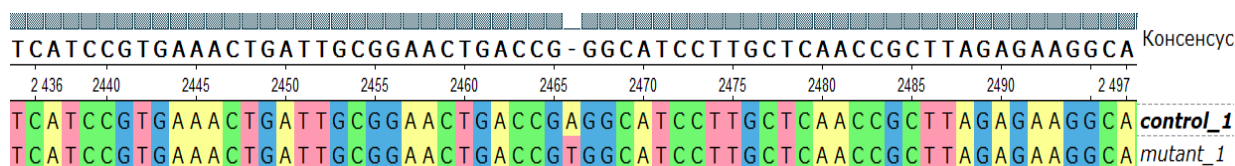
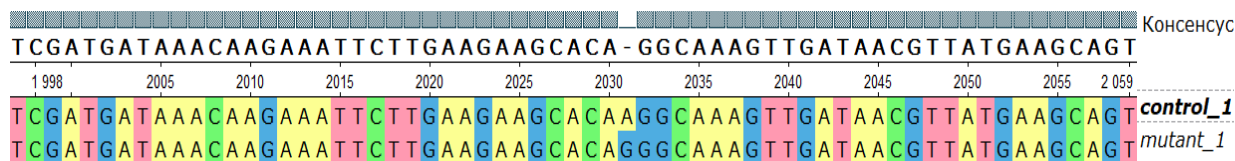
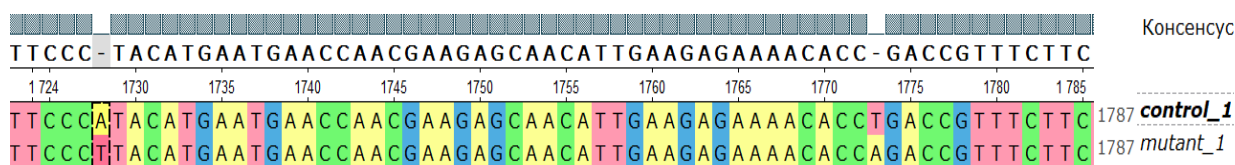


Рисунок 30. Замена G→A в 1656 положении; C→T в положении 1693



Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей выявил 18 точечных замен во второй обнаруженной последовательности гена, распределённых по всей длине анализируемого фрагмента (таблица 10).

Особого внимания заслуживает кластеризация замен в области позиций 1461–1773, где сосредоточено 8 из 18 выявленных замен. Подобная локальная

концентрация мутаций может свидетельствовать о нестабильности данного участка. Примечательно, что именно в этой области локализованы кластерные районы I и II гена *groV*, мутации в которых наиболее часто ассоциированы с устойчивостью к рифампицину у представителей рода *Bacillus*.

3.4. Полногеномное секвенирование и сравнение *B. amyloliquefaciens* B-1895 и делеционного мутанта K15

Визуализация результатов секвенирования в программе Unipro UGENE 53.1 подтвердила делецию в гене *abrB* штамма K15 (рис.37).

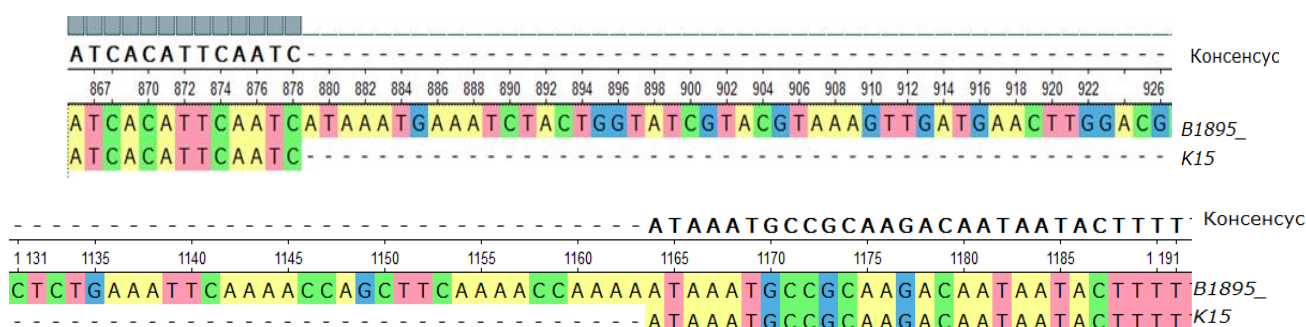


Рисунок 36. Выравнивание нуклеотидных последовательностей исходного штамма B1895 и мутанта K15. Консенсусная последовательность представлена в верхней строке. Делеция в последовательности B1895 относительно K15 обозначена пропусками.

При выравнивании последовательностей K15 и референсного штамма B1895 установлено отсутствие участка длиной 285 п.н. (позиции 879–1163), что составляет значительную часть кодирующей последовательности гена. Данная делеция нарушает синтез функционального белка AbrV — глобального регулятора транскрипции, контролирующего экспрессию генов споруляции, биосинтеза антибиотиков и биоплёнокообразования, и таким образом влияет на регуляцию соответствующих фенотипических признаков у штамма K15.

3.5 Дифференциальная экспрессия генов, участвующих в метаболизме углерода (*csrA*) и генов, участвующих в образовании биопленок (*abrB*), на разных питательных средах

По результатам ранее выполненной магистерской работы установлено, что у исследованных штаммов бактерий рода *Paenibacillus* с высокой противогрибковой активностью широко представлены гены нерибосомальных пептид-синтаз и поликетидсинтаз. Также доказано, что замена глюкозы крахмалом стимулирует относительную экспрессию *PmxE* за счет работы генов-регуляторов. Причем, чем больше концентрация крахмала, тем выше относительная экспрессия *PmxE*. Так, показатели экспрессии генов *PmxE*, *CsrA* у штаммов, выращенных на среде с 30г/л крахмала выше, чем на среде с глюкозой, а для гена *AbrB* показана обратная зависимость.

В данной работе проведена оценка экспрессии генов метаболизма углевода, выращенных на средах с различными источниками углеводов (глюкоза, крахмал, пектин). Результаты представлены на рисунках (37-46).

3.5.1. Фитостимулятор - *Bacillus atrophaeus* AG-8

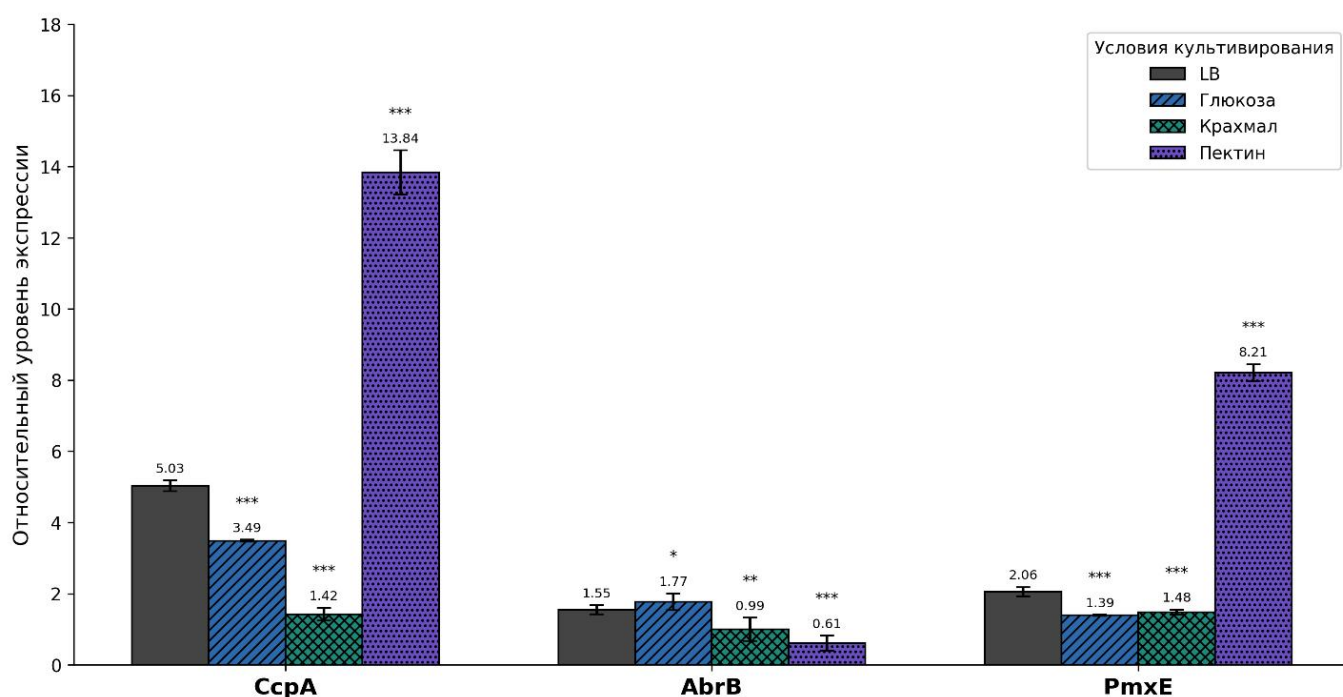


Рисунок 37. Динамика экспрессии генов *pmxE*, *csrA*, *abrB* у штамма AG8 относительно 16sBam * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs LB)

На рисунке 37 представлены результаты анализа относительного уровня экспрессии генов *csrA*, *abrB* и *pmxE* у штамма AG8 в зависимости от

источника углерода. В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

Ген *ssrA* демонстрировал последовательное снижение транскрипции при культивировании на глюкозе (3,49; $p < 0,001$) и крахмале (1,42; $p < 0,001$) относительно базового уровня в LB (5,03), тогда как пектин вызывал резкую индукцию до 13,84 ($p < 0,001$) — почти в 10 раз выше, чем на крахмале. Подобная избирательность в отношении пектина может свидетельствовать о наличии у штамма AG8 специфических механизмов распознавания продуктов деградации данного субстрата. Ген *abrB* демонстрировал незначительное повышение на глюкозе (1,77; $p < 0,05$) и последовательное снижение на крахмале (0,99; $p < 0,01$) и пектине (0,61; $p < 0,001$), что согласуется с взаимосвязью между *ssrA* и *abrB*, описанной у *Bacillus* spp.

У штамма AG8 уровни экспрессии *ptxE* на крахмале (1,48) и глюкозе (1,39) были сопоставимы и достоверно ниже базового значения ($p < 0,001$). Единственным эффективным индуктором *ptxE* у AG8 являлся пектин, обеспечивавший четырёхкратное увеличение транскрипции относительно LB (8,21; $p < 0,001$).

Таким образом, у штамма AG8 пектин формирует оптимальные условия для биосинтеза полимиксина, одновременно активируя *ssrA*, подавляя *abrB* и максимально индуцируя *ptxE*. Выявленная штаммоспецифичность реакции на источник углерода подчёркивает необходимость индивидуального подбора состава питательной среды для каждого продуцента.

3.5.2. Пробиотик для рыб - *Bacillus amyloliquefaciens* /*velezensis* R5

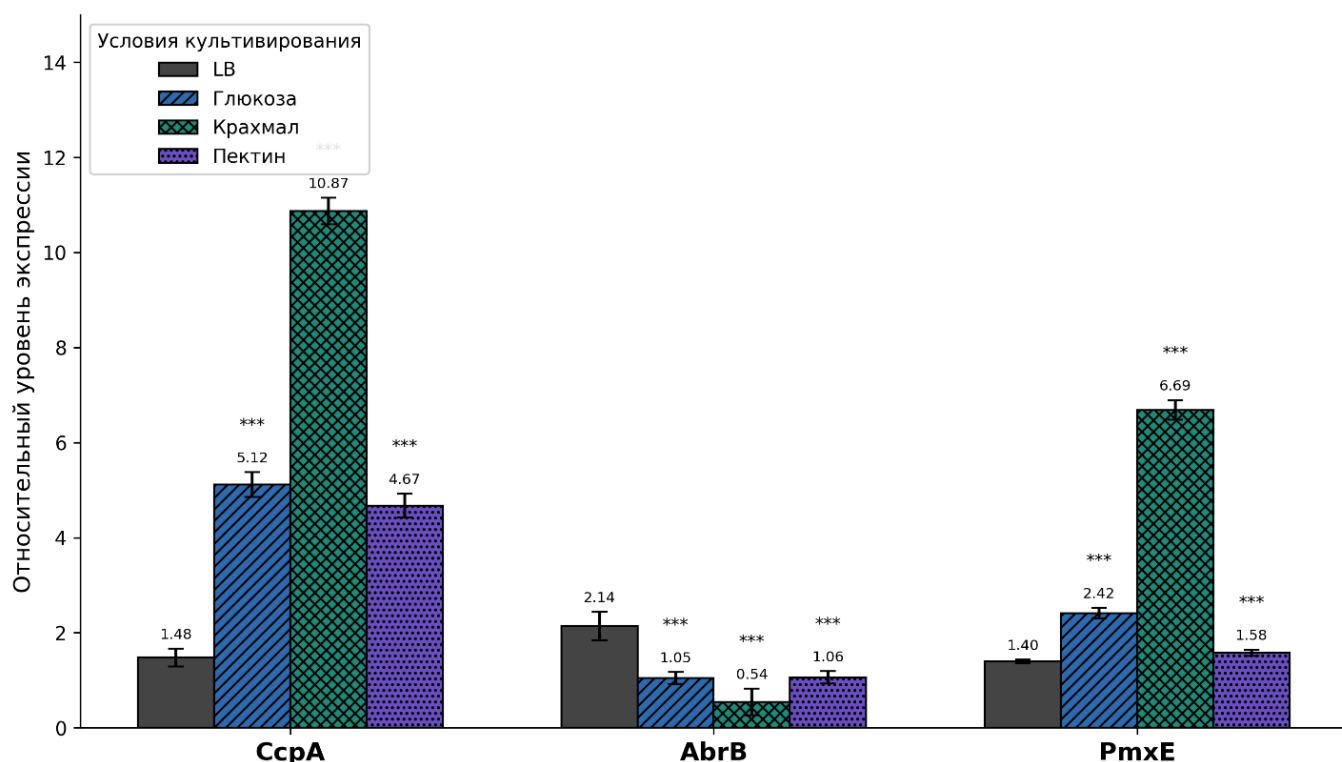


Рисунок 38. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма R5 относительно 16sBam * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs LB)

Экспрессия изученных генов штамма R5 демонстрирует принципиальное сходство с общими закономерностями, выявленными для штамма AG8, однако характеризуется отчётливой штаммоспецифичностью в части субстратной избирательности. Ген *cspA* при базовом уровне экспрессии в LB 1,48 резко активировался на глюкозе (5,12; $p < 0,001$) и достигал максимальных значений на крахмале (10,87; $p < 0,001$), превышая базовый уровень в 7,3 раза. На пектине наблюдалась умеренная индукция (4,67; $p < 0,001$), сопоставимая с уровнем на глюкозе. Данный паттерн принципиально отличается от профиля штамма AG8, у которого именно пектин обеспечивал максимальную активацию *cspA*.

Ген *abrB* демонстрировал последовательное подавление на всех исследованных субстратах относительно LB (2,14): до 1,05 на глюкозе, 0,54 на крахмале ($p < 0,001$) и 1,06 на пектине ($p < 0,001$). Наиболее выраженное снижение на крахмале коррелирует с одновременной максимальной

активацией *сспА* и *pmxE* в тех же условиях, подтверждая характер регуляции данных генов и согласуясь с закономерностями, установленными для штамма AG8.

Наиболее значимые результаты получены для гена *pmxE*. В отличие от штамма AG8, у которого пектин являлся единственным эффективным индуктором, у штамма R5 максимальная активация *pmxE* наблюдалась на крахмале (6,69; $p < 0,001$) — в 4,8 раза выше базового уровня. Глюкоза обеспечивала умеренную индукцию (2,42; $p < 0,001$), тогда как пектин практически не влиял на транскрипцию данного гена (1,58; $p < 0,001$), лишь незначительно превышая базовый уровень. Таким образом, у штамма R5 крахмал выступает ключевым индуктором биосинтеза полимиксина.

3.5.3. Противогрибковые штаммы с активностью против *Fusarium* spp.- *Paenibacillus polymyxa* V 3.14, O1.27, *Paenibacillus peoriae* R5.31

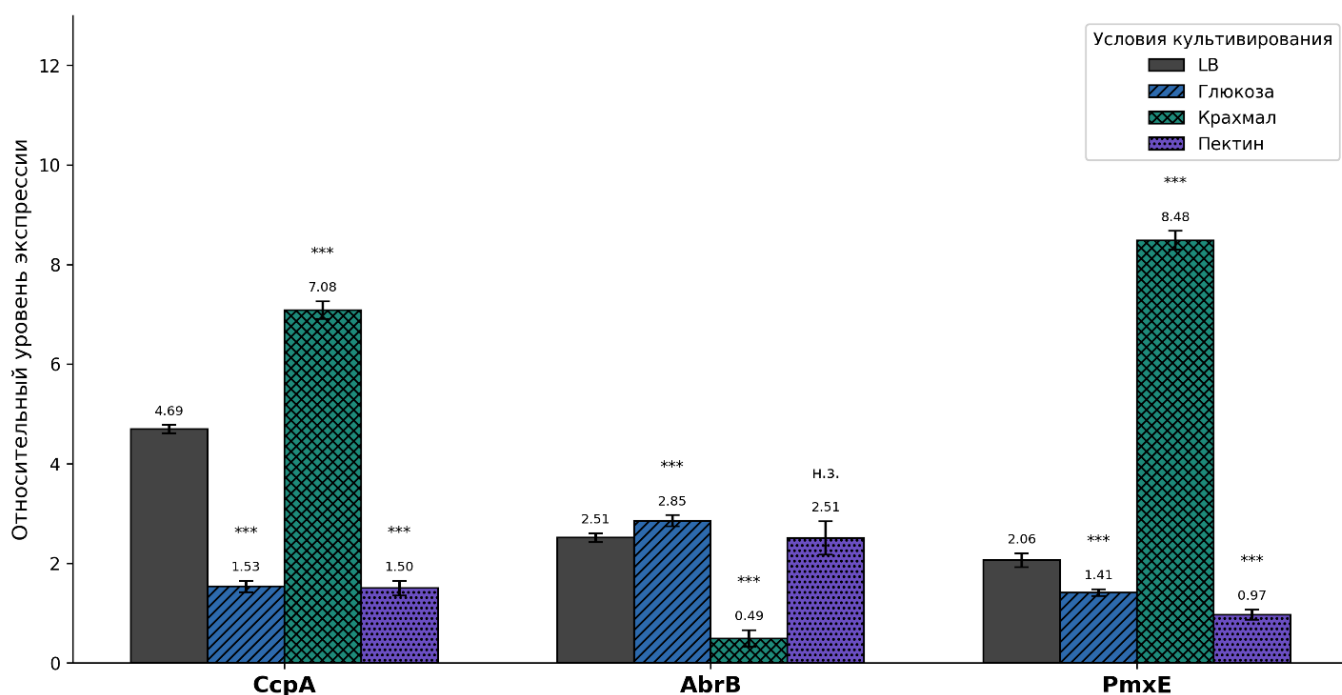


Рисунок 39. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма V 3.14 относительно 16sBam * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs LB)

На рисунке 39 представлены результаты анализа относительного уровня экспрессии генов *сспА*, *abrB* и *pmxE* у штамма V 3.14 в зависимости от

источника углерода. В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

Штамм V 3.14 демонстрирует наиболее выраженную субстратную специфичность среди исследованных штаммов: крахмал является единственным источником углерода, обеспечивающим индукцию генов *ssrA* и *ptxE*, тогда как глюкоза и пектин подавляют транскрипцию обоих генов относительно базового уровня в LB.

Ген *ssrA* при базовом уровне 4,69 в LB резко снижал экспрессию на глюкозе (1,53; $p < 0,001$) и пектине (1,50; $p < 0,001$), тогда как крахмал обеспечивал значительную активацию до 7,08 ($p < 0,001$), превышающую базовый уровень в 1,5 раза. Столь выраженный контраст между действием крахмала и остальных субстратов указывает на высокую специфичность катаболитного сигнального пути у данного штамма.

Экспрессия гена *abrB* на глюкозе незначительно превышала базовый уровень (2,85; $p < 0,001$), на крахмале подавлялась до минимальных значений (0,49; $p < 0,001$), а на пектине оставалась статистически неотличимой от таковой на LB (2,51; $p > 0,05$). Отсутствие значимого эффекта пектина на *abrB* при одновременном подавлении им *ssrA* и *ptxE* представляет характерную особенность штамма V 3.14, свидетельствующую о разобщённости регуляторных путей, контролирующих данные гены, в условиях культивирования на пектине.

Наиболее выраженная субстратная специфичность зафиксирована для гена *ptxE*. На крахмале уровень транскрипции достигал 8,48 ($p < 0,001$) — максимального значения среди всех условий и всех исследованных штаммов для данного гена, что соответствует увеличению в 4,1 раза относительно LB. Напротив, глюкоза и пектин достоверно подавляли экспрессию *ptxE* (1,41 и 0,97 соответственно; $p < 0,001$), причём на пектине уровень транскрипции опускался ниже базового значения.

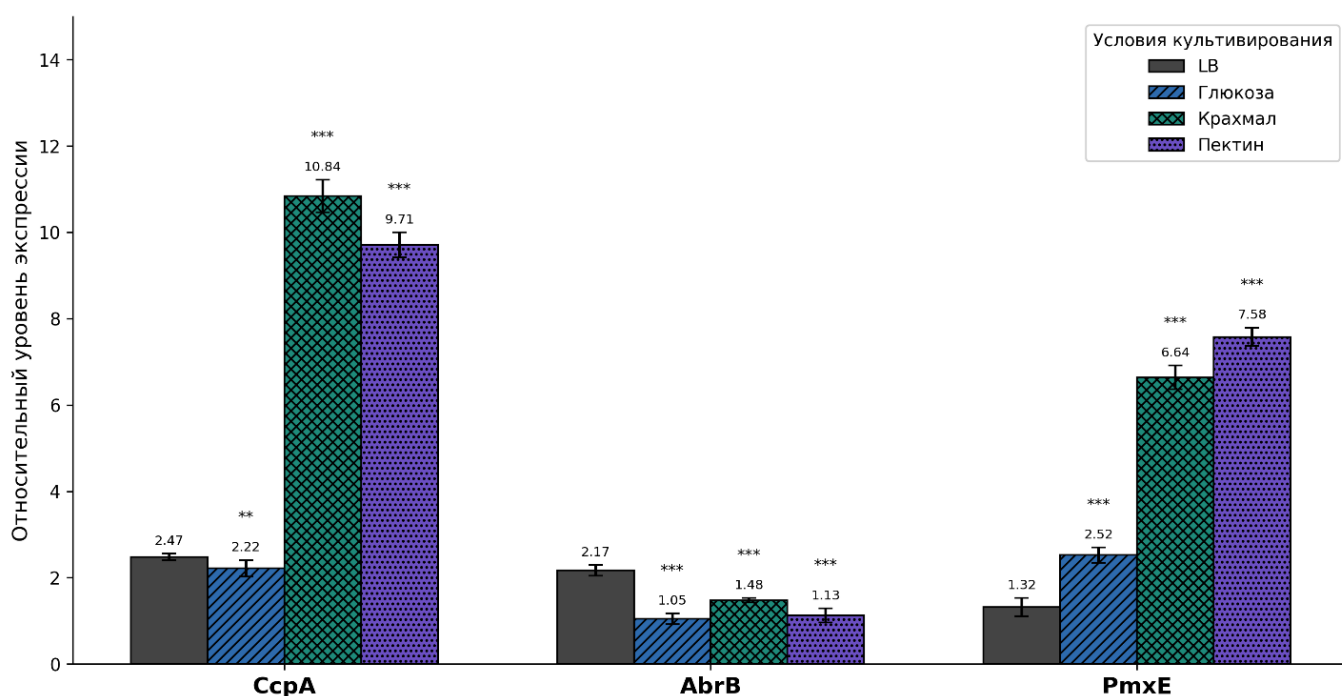


Рисунок 40. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма O1.27 относительно *16sBam* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs LB)

На рисунке 4 представлены результаты анализа относительного уровня экспрессии генов *sspA*, *abrB* и *pmxE* у штамма O1.27 в зависимости от источника углерода. В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

Штамм O1.27 ген *sspA* при низком базовом уровне в LB (2,47) практически не изменял экспрессию на глюкозе (2,22; $p < 0,01$), тогда как оба полисахаридных субстрата вызывали сопоставимую и высокую индукцию — до 10,84 на крахмале и 9,71 на пектине ($p < 0,001$), превышая базовый уровень в 4,4 и 3,9 раза соответственно. Отсутствие значимого различия между эффектами крахмала и пектина на *sspA* отличает его от V 3.14 и AG8, у которых чёткая субстратная избирательность выражена значительно сильнее.

Ген *abrB* демонстрировал подавление относительно базового уровня (2,17) при культивировании на всех альтернативных источниках углерода: до 1,05 на глюкозе, 1,48 на крахмале и 1,13 на пектине ($p < 0,001$ для всех

вариантов). Примечательно, что в отличие от большинства ранее рассмотренных штаммов, у O1.27 даже глюкоза достоверно подавляла *abrB*.

Наиболее характерной особенностью штамма O1.27 является профиль экспрессии гена *pmxE*. В отличие от всех ранее рассмотренных штаммов, у которых глюкоза либо не влияла, либо подавляла транскрипцию данного гена, у O1.27 уже глюкоза обеспечивала достоверную индукцию *pmxE* до 2,52 ($p < 0,001$) — почти двукратное увеличение относительно LB (1,32). На полисахаридных субстратах эффект усиливался: крахмал и пектин индуцировали *pmxE* до 6,64 и 7,58 соответственно ($p < 0,001$), причём пектин незначительно, но превосходил крахмал по индукции.

В целом штамм O1.27 характеризуется наиболее широким спектром субстратов, эффективно индуцирующих биосинтез полимиксина: индукция *pmxE* наблюдается как на глюкозе, так и на обоих полисахаридах, тогда как *abrB* подавляется при всех исследованных условиях.

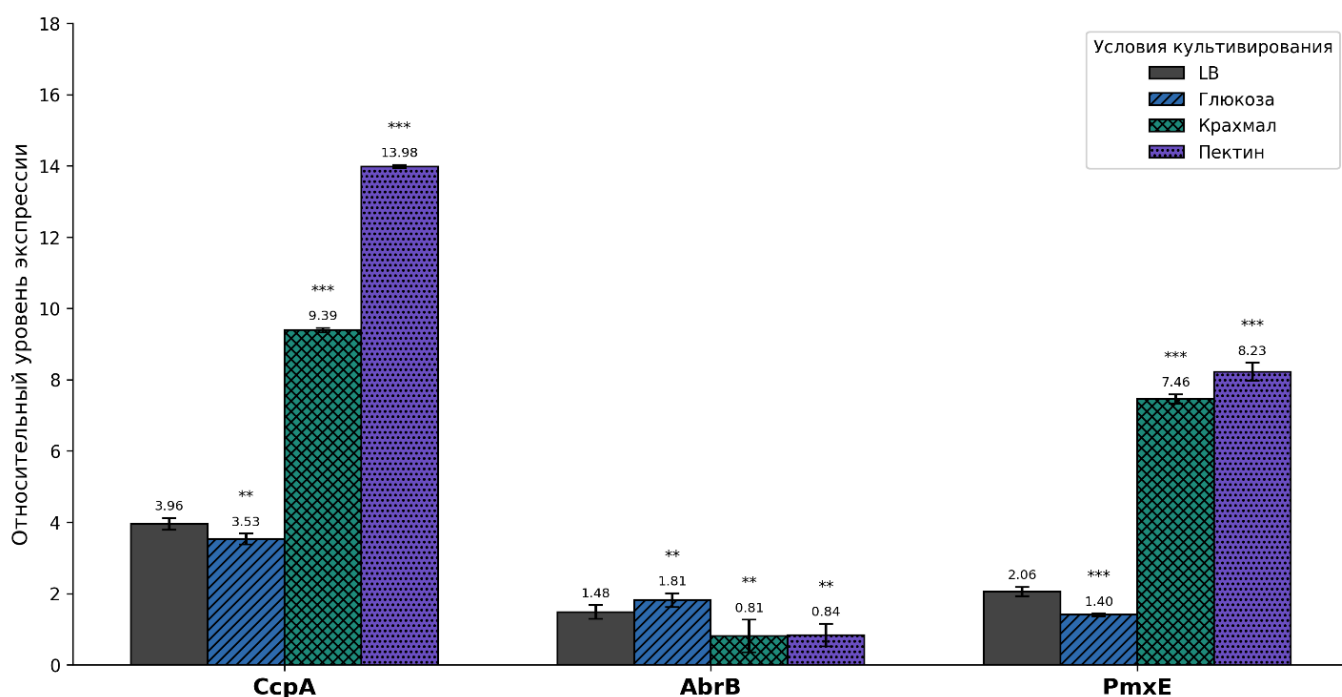


Рисунок 41. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CsrA*, *AbrB* у штамма R5.31 относительно 16sBam * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs LB)

На рисунке 41 представлены результаты анализа относительного уровня экспрессии генов *ssrA*, *abrB* и *pmxE* у штамма R5.31 в зависимости от источника углерода. В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

Ген *ssrA* при базовом уровне 3,96 незначительно снижал экспрессию на глюкозе (3,53; $p < 0,01$), тогда как оба полисахаридных субстрата обеспечивали выраженную индукцию: до 9,39 на крахмале и 13,98 на пектине ($p < 0,001$), превышая базовый уровень в 2,4 и 3,5 раза соответственно.

Ген *abrB* демонстрировал умеренное повышение на глюкозе (1,81; $p < 0,01$) и симметричное подавление на обоих полисахаридах — до 0,81 и 0,84 ($p < 0,01$) на крахмале и пектине соответственно.

Ген *pmxE* на глюкозе подавлялся относительно LB (1,40; $p < 0,001$), что согласуется с явлением катаболитной репрессии биосинтеза вторичных метаболитов в присутствии легкодоступного субстрата. На полисахаридных субстратах наблюдалась выраженная индукция: до 7,46 на крахмале и 8,23 на пектине ($p < 0,001$), что соответствует увеличению в 3,6 и 4,0 раза относительно LB. Сопоставимые уровни индукции *pmxE* на обоих полисахаридах при заметном превосходстве пектина над крахмалом по активации *ssrA* указывают на то, что у штамма R5.31 транскрипция *pmxE* может достигать самого высокого показателя при уровнях регуляторного сигнала, обеспечиваемых крахмалом.

Противогрибковые штаммы с активностью против *Candida albicans* - *Bacillus subtilis* C65A, C65B, *Bacillus* spp.- C15, C 49.1A, C 76.2.

На рисунке 42 представлены результаты анализа относительного уровня экспрессии генов *ssrA*, *abrB* и *pmxE* у штамма C65A в зависимости от источника углерода. В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

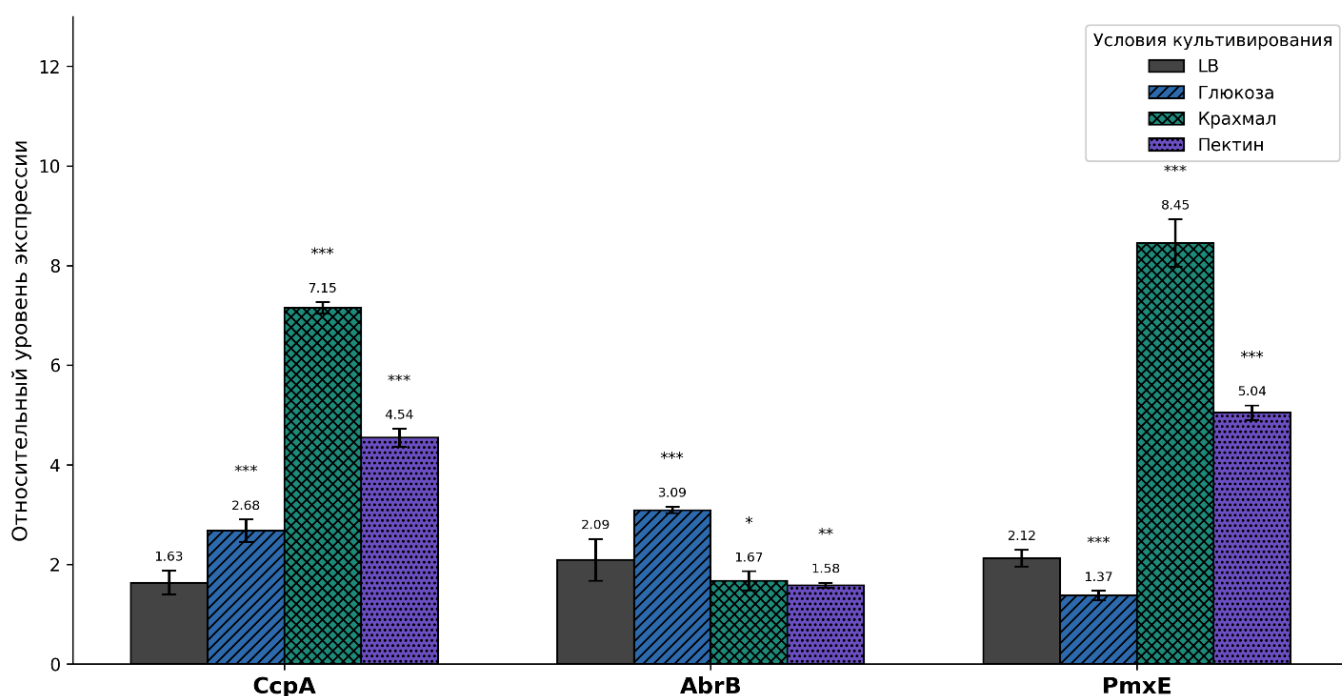


Рисунок 42. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма C65A относительно 16sBam * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs LB)

Штамм C65A демонстрирует ряд уникальных черт экспрессионного профиля, не наблюдавшихся у ранее рассмотренных штаммов. Наиболее примечательной особенностью является экспрессия генов *cspA* и *abrB* на глюкозе: оба регулятора одновременно повышали транскрипцию относительно LB — *cspA* до 2,68 ($p < 0,001$), *abrB* до 3,09 ($p < 0,001$). При этом одновременная активация *abrB* — репрессора генов, закономерно сопровождается подавлением *pmxE* (1,37; $p < 0,001$), что подтверждает функциональную связь между повышенным уровнем *AbrB* и репрессией биосинтеза полимиксина.

На полисахаридных субстратах восстанавливается взаимосвязь регуляторов: *cspA* возрастает до 7,15 на крахмале и 4,54 на пектине ($p < 0,001$), тогда как *abrB* снижается до 1,67 ($p < 0,05$) и 1,58 ($p < 0,01$) соответственно. Следует отметить, что степень подавления *abrB* на полисахаридах у C65A существенно меньше, чем у большинства ранее исследованных штаммов, что

может свидетельствовать о частичном сохранении репрессорного влияния *AbrB* на гены даже в оптимальных для биосинтеза полимиксина условиях.

Экспрессия гена *pmxE* на крахмале достигала уровня 8,45 ($p < 0,001$) — одного из наиболее высоких значений среди всей исследуемой группы штаммов, превышающего базовый уровень в 4,0 раза. Пектин также обеспечивал значимую индукцию до 5,04 ($p < 0,001$), однако уступал крахмалу по индукционному потенциалу в 1,7 раза. Таким образом, по-видимому, у штамма С65А крахмал является предпочтительным субстратом для увеличения транскрипции *pmxE*, хотя пектин также сохраняет существенный индукционный эффект.

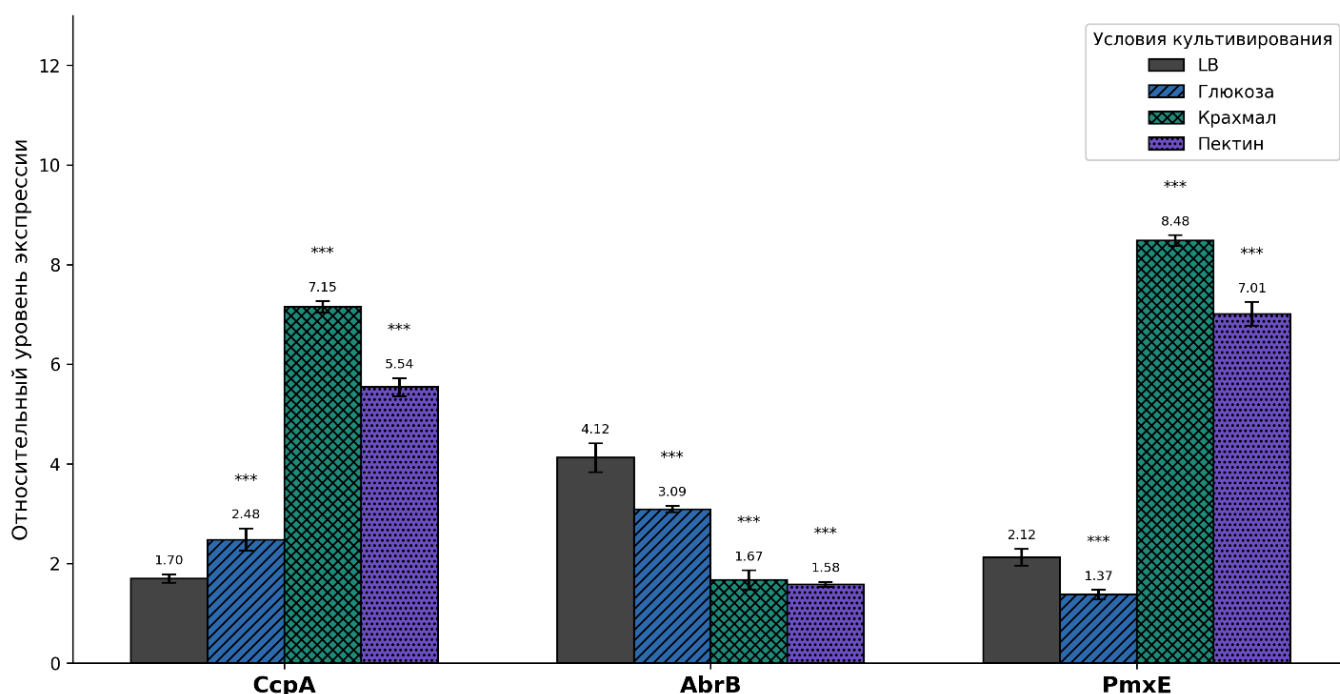


Рисунок 43. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CsrA*, *AbrB* у штамма С65В относительно *16sBam* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs LB)

На рисунке 43 представлены результаты анализа относительного уровня экспрессии генов *csrA*, *abrB* и *pmxE* у штамма С65В в зависимости от источника углерода. В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

Наиболее характерной особенностью штамма С65В, выделяющей его на фоне всей исследуемой группы, является высокий базовый уровень экспрессии гена *abrB* в среде LB (4,12) — наибольшее значение данного показателя среди всех рассмотренных штаммов. Столь высокая конститутивная активность репрессора генов стационарной фазы в богатой питательной среде свидетельствует об усиленном подавлении программ биосинтеза вторичных метаболитов в условиях активного роста и может отражать штаммоспецифичные особенности. При культивировании на глюкозе *abrB* снижался до 3,09 ($p < 0,001$), на крахмале и пектине — до 1,67 и 1,58 соответственно ($p < 0,001$). Несмотря на высокий стартовый уровень, полисахаридные субстраты обеспечивали эффективное подавление *abrB* — более чем в 2,5 раза,.

Ген *csrA* при низком базовом уровне в LB (1,70) последовательно активировался при замене источника углерода: умеренно на глюкозе (2,48; $p < 0,001$) и значительно на полисахаридах — до 7,15 на крахмале и 5,54 на пектине ($p < 0,001$).

Ген *ptxE* демонстрировал подавление на глюкозе (1,37; $p < 0,001$) и выраженную индукцию на полисахаридных субстратах: до 8,48 на крахмале и 7,01 на пектине ($p < 0,001$), что соответствует увеличению в 4,0 и 3,3 раза относительно LB соответственно. Как и у штамма С65А, крахмал незначительно, но превосходил пектин по индукционному потенциалу в отношении *ptxE*.

Для С65В, как и для С65А, крахмал является оптимальным источником углерода для максимизации транскрипции *ptxE*, а пектин служит эффективной альтернативой, обеспечивая сопоставимый уровень индукции биосинтеза полимиксина.

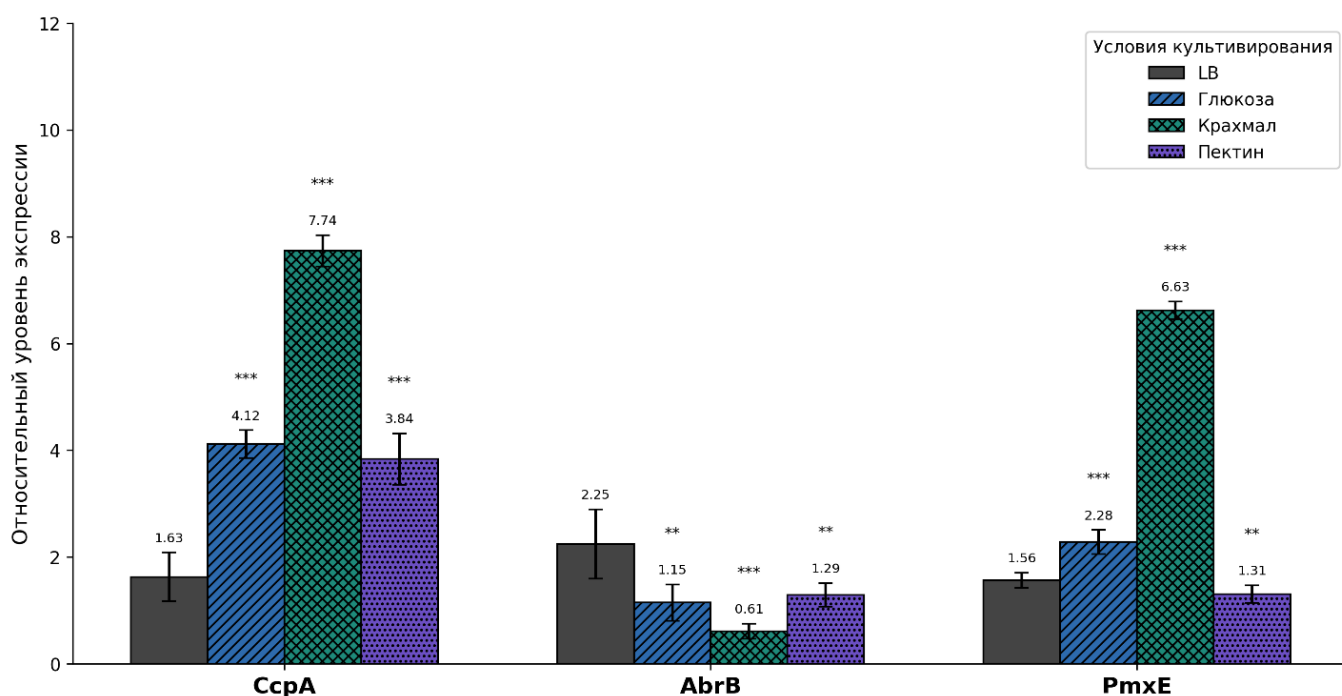


Рисунок 44. Динамика экспрессии генов *PtxE*, *CsrA*, *AbrB* у штамма C15 относительно *16sBam* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs LB)

На рисунке 44 представлены результаты анализа относительного уровня экспрессии генов *csrA*, *abrB* и *ptxE* у штамма C15 в зависимости от источника углерода. В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

Штамм C15 демонстрирует наиболее сложный и нетипичный экспрессионный профиль среди всех исследованных штаммов, характеризующийся диссоциацией между активацией регуляторных генов и транскрипцией *ptxE* в ряде условий культивирования.

Ген *csrA* активировался при всех альтернативных источниках углерода относительно LB (1,63): на глюкозе до 4,12 ($p < 0,001$), на крахмале до 7,74 ($p < 0,001$) и на пектине до 3,84 ($p < 0,001$). Примечательно, что глюкоза и пектин обеспечивали сопоставимые уровни индукции *csrA*, тогда как крахмал существенно превосходил оба субстрата, будучи наиболее эффективным активатором данного гена. Аналогичная закономерность наблюдалась и для *abrB*: все три источника углерода подавляли его транскрипцию относительно базового уровня (2,25) — до 1,15 на глюкозе ($p < 0,01$), 0,61 на крахмале ($p <$

0,001) и 1,29 на пектине ($p < 0,01$). Таким образом, по регуляции *ssrA* и *abrB* штамм C15 следует общей закономерности, выявленной для большинства исследованных штаммов.

Для гена *ptxE* крахмал обеспечивал ожидаемую выраженную индукцию до 6,63 ($p < 0,001$) — в 4,2 раза выше базового уровня (1,56). Глюкоза также индуцировала *ptxE* до 2,28 ($p < 0,001$), воспроизводя паттерн штамма O1.27 и свидетельствуя об ослаблении катаболитной репрессии данного гена в присутствии моносахарида. Однако пектин, несмотря на одновременную активацию *ssrA* и подавление *abrB*, оказывал достоверное ингибирующее действие на транскрипцию *ptxE* (1,31; $p < 0,01$) — снижение ниже базового уровня.

Таким образом, для штамма C15 крахмал является оптимальным источником углерода, обеспечивающим координированную активацию всего регуляторного каскада и максимальную индукцию биосинтеза полимиксина. Использование пектина, напротив, нецелесообразно ввиду парадоксального подавления *ptxE* в данных условиях, несмотря на активацию регуляторных генов, что указывает на существование у данного штамма дополнительного уровня регуляции экспрессии генов биосинтеза полимиксина.

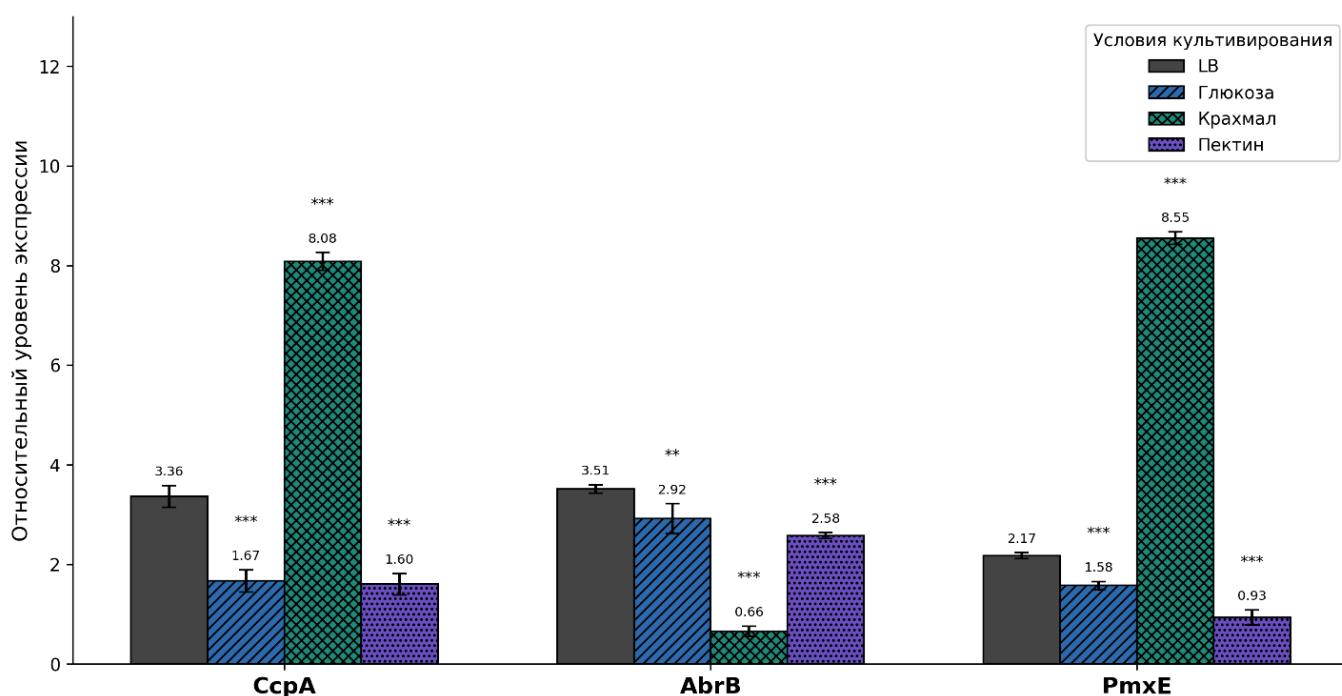


Рисунок 45. Динамика экспрессии генов *PmxE*, *CspA*, *AbrB* у штамма С.49.1А относительно *16sBam* * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs LB)

На рисунке 45 представлены результаты анализа относительного уровня экспрессии генов *cspA*, *abrB* и *pmxE* у штамма С.49.1А в зависимости от источника углерода. В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

Штамм С.49.1А демонстрирует наиболее выраженную моносубстратную специфичность среди всей исследуемой группы: крахмал является единственным источником углерода, обеспечивающим координированную активацию регуляторного каскада и индукцию биосинтеза полимиксина, тогда как глюкоза и пектин оказывают подавляющее действие на все ключевые гены.

Ген *cspA* при базовом уровне 3,36 в LB резко снижал экспрессию на глюкозе (1,67; $p < 0,001$) и пектине (1,60; $p < 0,001$), достигая значений, сопоставимых с минимальными уровнями экспрессии данного гена среди всех штаммов. Крахмал, напротив, обеспечивал выраженную индукцию до 8,08 ($p < 0,001$) — увеличение в 2,4 раза относительно LB и почти в 5 раз

относительно пектина, что указывает на высокую специфичность сигнальных путей, активируемых продуктами деградации крахмала у данного штамма.

Ген *abrB* в LB демонстрировал повышенный базовый уровень (3,51), сопоставимый с таковым у штамма С65В, что свидетельствует об активной репрессии генов стационарной фазы в богатой питательной среде. На глюкозе наблюдалось умеренное снижение до 2,92 ($p < 0,01$), на пектине — до 2,58 ($p < 0,001$), однако наиболее выраженное подавление обеспечивал крахмал, снижая уровень *abrB* до 0,66 ($p < 0,001$) — более чем в 5 раз относительно LB.

На крахмале уровень транскрипции гена *pmxE* достигал 8,55 ($p < 0,001$) — одного из наиболее высоких значений в исследуемой группе, в 3,9 раза превышающего базовый уровень (2,17). Глюкоза умеренно подавляла *pmxE* (1,58; $p < 0,001$), тогда как пектин снижал транскрипцию ниже базового уровня (0,93; $p < 0,001$), что ранее было описано для штамма С15.

В совокупности полученные данные однозначно указывают, что крахмал - оптимальный источник углерода для штамма С.49.1А при задаче увеличения биосинтеза полимиксина.

Стьюдента, vs LB)

На рисунке 46 представлены результаты анализа относительного уровня экспрессии генов *sspA*, *abrB* и *pmxE* у штамма С 76.2 в зависимости от источника углерода. В качестве референсного гена использован *16sBam*; за базовый уровень принята экспрессия в среде LB.

Ген *abrB*, кодирующий репрессор генов стационарной фазы, обнаруживал противоположную тенденцию: его экспрессия последовательно снижалась от 2,78 в LB до 0,78 на пектине ($p < 0,001$). Взаимосвязь уровней *sspA* и *abrB* согласуется с описанной у *Bacillus* spp. перекрёстной регуляцией данных факторов и свидетельствует о её сохранности у штамма С 76.2.

Наиболее биотехнологически значимый результат получен для гена *pmxE*, входящего в кластер биосинтеза полимиксина: на глюкозе его экспрессия подавлялась (1,39; $p < 0,001$), тогда как на крахмале и пектине

возрастала до 6,45 и 7,31 соответственно ($p < 0,001$), превышая базовый уровень в 3,1–3,5 раза.

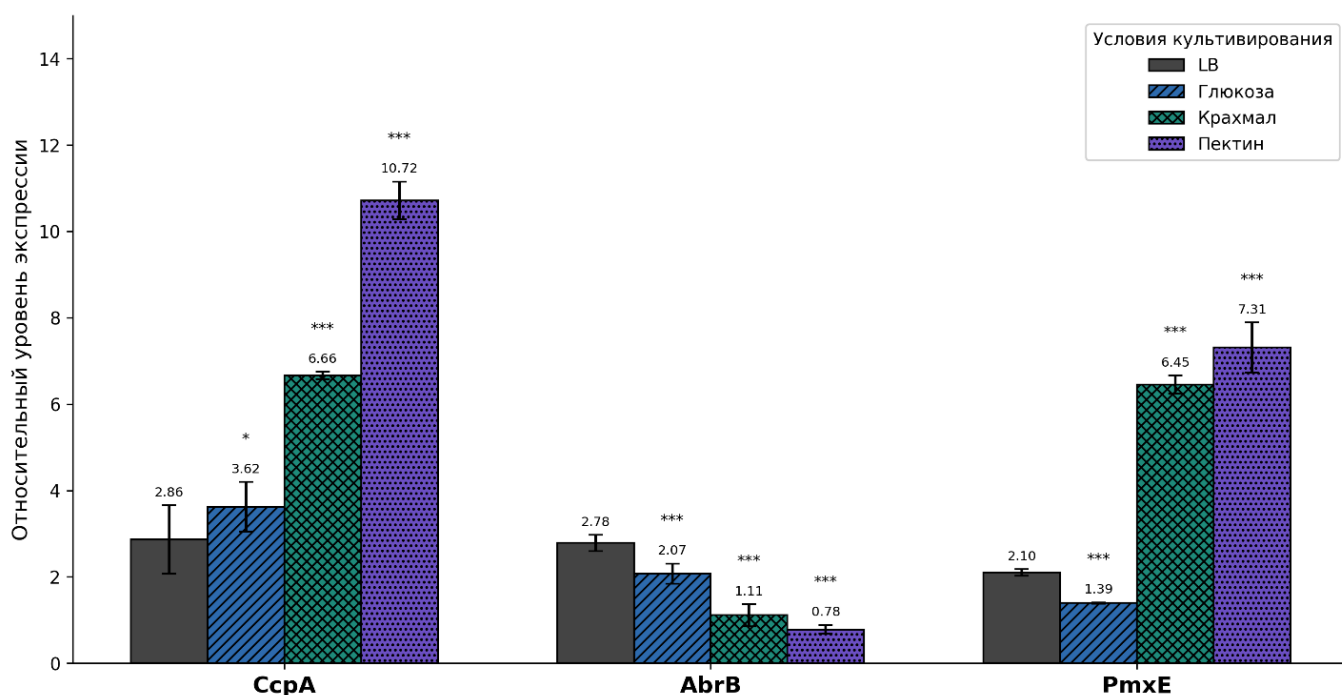


Рисунок 46. Динамика экспрессии генов PmxE, CsrA, AbrB у штамма С 76.2 относительно 16sBam * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий

Ген *csrA*, кодирующий центральный регулятор катаболитной репрессии, демонстрировал последовательное возрастание транскрипционной активности по мере увеличения молекулярной сложности источника углерода: от 2,86 в LB до 3,62 на глюкозе ($p < 0,05$), 6,66 на крахмале и 10,72 на пектине ($p < 0,001$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что источник углерода является одним из ключевых факторов, определяющих уровень экспрессии исследуемых генов у изученных штаммов. В присутствии глюкозы, как правило, наблюдается снижение экспрессии целевых генов, что, по-видимому, связано с действием катаболической репрессии и отсутствием необходимости в активации альтернативных метаболических путей. Напротив, на средах с крахмалом и пектином отмечается более высокая или сопоставимая экспрессия целевых генов, что указывает на перестройку регуляторных механизмов в условиях использования сложных полисахаридных субстратов.

Особое значение в формировании данного ответа, вероятно, имеет изменение экспрессии регуляторных генов *ccpA* и *abrB*. Повышение уровня *ccpA* может отражать участие глобальной регуляции углеводного обмена в адаптации клеток к альтернативным источникам углерода, тогда как снижение *abrB* на этих средах, по-видимому, сопровождается ослаблением репрессивного контроля и создает условия для активации биосинтетического пути. Таким образом, можно заключить, что крахмал и пектин оказывают индуцирующее влияние на экспрессию целевых генов, тогда как глюкоза, напротив, ассоциирована с её подавлением.

Обобщая результаты анализа экспрессии, следует подчеркнуть выраженную штаммоспецифичность реакции на источник углерода. У штамма AG8 единственным эффективным индуктором *ptxE* являлся пектин, у штамма R5 — крахмал, тогда как у штамма C76.2 индуцирующим действием обладали оба сложных субстрата. При этом во всех случаях сохранялась единая закономерность: индукция *ptxE* сопровождалась активацией *ccpA* и подавлением *abrB*, что согласуется с описанной для представителей рода *Bacillus* иерархической системой регуляции, в которой CcpA опосредует углеродную катаболитную репрессию, а AbrB выступает в качестве глобального репрессора генов стационарной фазы роста и вторичного метаболизма (Sprehe et al., 2007; Strauch et al., 1990).

Различие в том, какой именно субстрат обуславливает снятие репрессии, по-видимому, определяется набором катаболических оперонов, характерным для конкретного штамма, — наличием и активностью систем утилизации пектина и крахмала, продукты деградации которых выступают сигналом для перестройки регуляторной сети.

Практическое значение данного наблюдения состоит в том, что оптимальный состав индуцирующей питательной среды не может быть экстраполирован с одного штамма-продуцента на другой и требует индивидуального подбора для каждого случая, что ограничивает универсальность предложенного подхода, однако одновременно открывает

возможность целенаправленного регулирования биосинтеза применительно к конкретному штамму-продуценту.

3.6 Изучение свойств штаммов, мутантных по *abrB*

Система CRISPR-Cas, представляющая собой адаптивный механизм защиты прокариот, в настоящее время широко используется как инструмент направленного редактирования геномов: Cas-нуклеаза под управлением комплементарной направляющей РНК вносит двухцепочечный разрыв в заданном участке ДНК, репарация которого позволяет осуществлять точные делеции целевых последовательностей. При получении штаммов, использованных в настоящей работе, данный подход применяли для направленной делеции гена глобального регулятора *abrB* в штамме *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. Поскольку AbrB выступает репрессором генов, связанных с продукцией вторичных метаболитов, его инактивацию рассматривали как способ повышения биосинтетического потенциала штамма. Полученные мутантные клоны продемонстрировали клон-специфичный характер изменений: у части из них усиливалась антиоксидантная, ДНК-защитная и SOS-ингибирующая активность, тогда как у других выраженного эффекта не наблюдалось.

Результаты сравнительного анализа антиоксидантной активности мутантных штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 в условиях окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода, представлены на рисунке 47. Антиоксидантная активность контрольного штамма B-1895 составила 71,6%, что служило контрольным показателем для оценки эффекта делеции гена *abrB*.

Среди исследованных мутантов выявлена значительная вариабельность антиоксидантного ответа. Статистически значимые различия относительно контрольного штамма ($p < 0,001$) зафиксированы для всех исследованных вариантов.

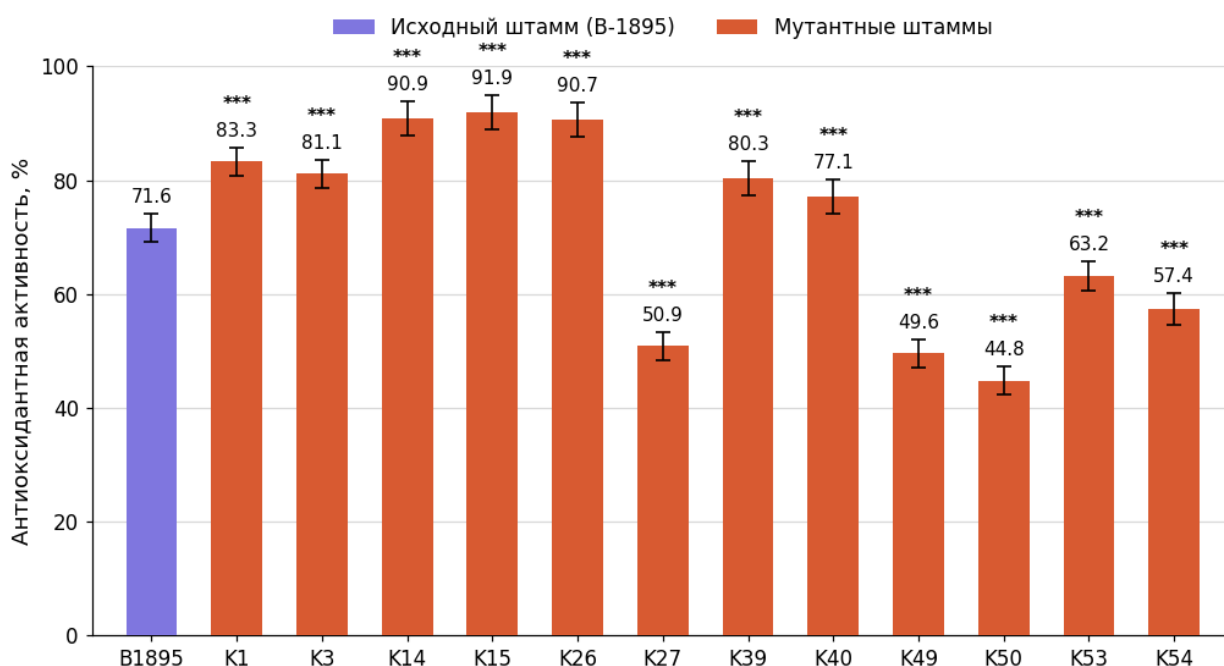


Рисунок 47. сравнение антиоксидантного эффекта у мутантов *B. amyloliquefaciens* B-1895 с контрольным штаммом при использовании перекиси водорода в качестве индуктора. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs B1895)

Наиболее выраженным усилением антиоксидантного потенциала характеризовались штаммы K14, K15 и K26, у которых активность достигала 90,9%, 91,9% и 90,7% соответственно, превышая показатель контроля на 19–20%. Столь существенный прирост активности у данной группы мутантов может быть обусловлен усилением экспрессии ферментов антиоксидантной защиты — каталазы, супероксиддисмутазы или пероксидазы — либо активацией неферментативных механизмов нейтрализации активных форм кислорода. Умеренно повышенную активность (80,3–83,3%) демонстрировали штаммы K1, K3 и K39, тогда как K40 показал значение 77,1%, незначительно превышающее показатель у контрольного штамма.

Принципиально иная картина наблюдалась у штаммов K27, K49 и K50, антиоксидантная активность которых составила 50,9%, 49,6% и 44,8% соответственно, что соответствует снижению на 21–27% относительно B-1895. Подобное ослабление защитных механизмов указывает на то, что соответствующие мутации могут затрагивать гены, непосредственно или

косвенно вовлечённые в антиоксидантный ответ, либо оказывают негативное плейотропное воздействие на клеточный метаболизм. Промежуточное положение занимали штаммы K53 и K54 с активностью 63,2% и 57,4%, характеризующиеся умеренным снижением относительно контроля.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что мутагенез *B. amyloliquefaciens* B-1895 приводит к разнонаправленным изменениям антиоксидантного потенциала: часть мутантов (прежде всего K14, K15, K26) демонстрирует существенное усиление устойчивости к окислительному стрессу и представляет наибольший интерес для дальнейшего изучения, тогда как другая часть (K27, K49, K50) характеризуется ослаблением защитных систем. Выявленные штаммы с повышенной антиоксидантной активностью могут рассматриваться как перспективные кандидаты для применения в биотехнологии.

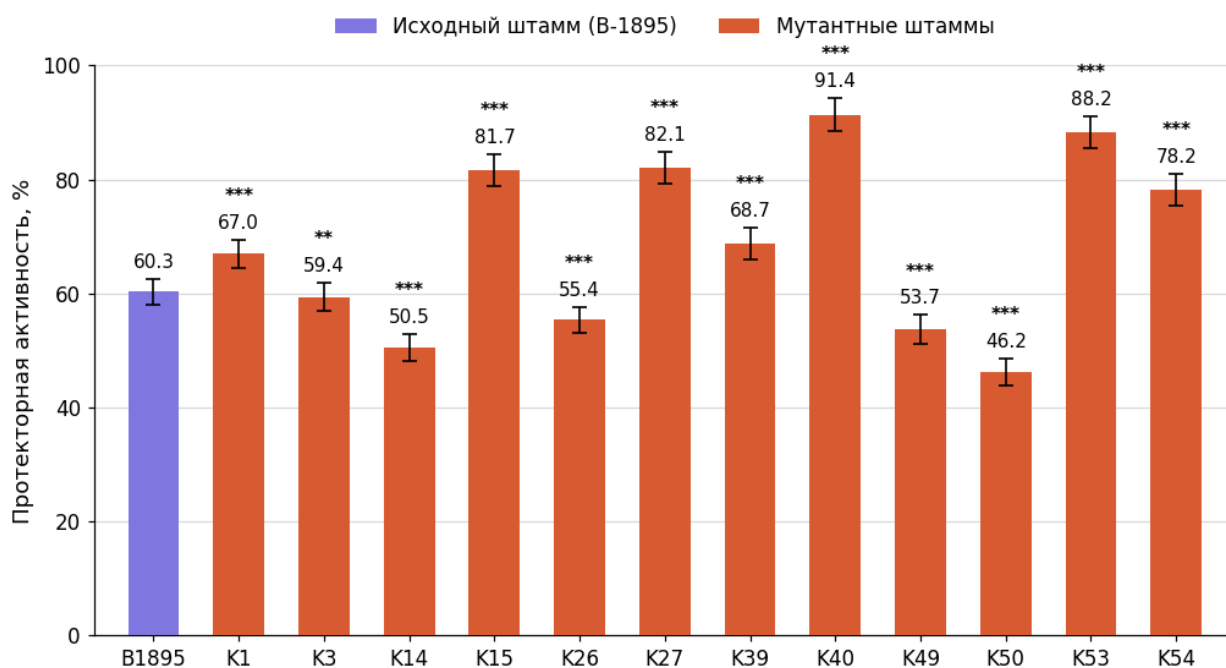


Рисунок 48. сравнение возможности подавления SOS-ответа у мутантов *B. amyloliquefaciens* B-1895 с контрольным штаммом при использовании ципрофлоксацина в качестве индуктора. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs B1895)

На рисунке 48 представлены результаты оценки способности мутантных штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 подавлять SOS-ответ в условиях

стресса, индуцированного ципрофлоксацином. Протекторная активность контрольного штамма В-1895 составила 60,3%, что отражает базовый уровень способности ингибировать механизмы репарации повреждений ДНК, активируемые в ответ на действие фторхинолонового антибиотика.

Анализ данных выявил выраженную дифференциацию мутантов по способности подавлять SOS-ответ, причём характер распределения штаммов по группам принципиально отличался от наблюдавшегося при оценке антиоксидантной активности, что указывает на независимость механизмов, ответственных за данные фенотипические признаки. Статистически значимые отличия от контрольного штамма зафиксированы для всех исследуемых вариантов ($p < 0,001$ для большинства штаммов; $p < 0,01$ для К3), что свидетельствует о достоверности выявленных различий.

Наиболее высокой протекторной активностью обладали штаммы К40 и К53, показатели которых достигали 91,4% и 88,2% соответственно, превышая контрольный уровень на 28–31%. Повышенная способность подавлять SOS-ответ также отмечена у штаммов К27 (82,1%), К15 (81,7%) и К54 (78,2%). Примечательно, что штаммы К40 и К27, демонстрирующие высокую протекторную активность при действии ципрофлоксацина, характеризовались лишь умеренной или сниженной антиоксидантной активностью. Данное несоответствие свидетельствует о том, что указанные мутанты, по всей видимости, несут изменения в генах, специфически регулирующих ответ на повреждения ДНК, — в частности, компонентах SOS-регулона, RecA/LexA-зависимых путях или системах репарации двунитевых разрывов — но не затрагивающих редокс-гомеостаз клетки. Умеренное повышение активности относительно контроля зафиксировано у штаммов К1 (67,0%) и К39 (68,7%).

Напротив, штаммы К14 (50,5%), К26 (55,4%), К49 (53,7%) и К50 (46,2%) демонстрировали протекторную активность ниже уровня контрольного штамма. Особого внимания заслуживает штамм К50, у которого показатель составил лишь 46,2% — наименьшее значение в исследуемой выборке, что соответствует снижению на 14% относительно В-1895. Сниженная

протекторная активность данной группы мутантов может быть обусловлена нарушением экспрессии факторов, непосредственно взаимодействующих с SOS-каскадом, либо компенсаторными перестройками метаболизма, косвенно влияющими на интенсивность SOS-ответа.

Сопоставление профилей протекторной и антиоксидантной активности по двум экспериментальным системам позволяет выделить несколько функционально значимых групп. Штаммы K15 и K1 проявляют повышенную активность в обоих тестах, что может указывать на активацию общих стресс-защитных регуляторных систем. В то же время штаммы K40 и K27 демонстрируют высокую специфичность именно к подавлению SOS-ответа при относительно невысоких антиоксидантных показателях, тогда как K14, K49 и K50 характеризуются снижением активности в обеих системах, что может свидетельствовать о негативном эффекте соответствующих мутаций.

Таким образом, штаммы K40, K53, K27 и K15 представляют наибольший интерес в качестве объектов дальнейшего анализа.

На рисунке 49 отображены результаты оценки ДНК-протекторной активности мутантных штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* В-1895 в условиях генотоксического стресса, индуцированного диоксидином — синтетическим антибактериальным препаратом группы хиноксалинов, механизм действия которого связан с прямым повреждением молекулы ДНК и индукцией окислительного стресса. Протекторная активность контрольного штамма В-1895 составила 52,1%, что является наименьшим базовым значением среди трёх применявшихся в работе экспериментальных систем и отражает умеренный защитный потенциал исходной культуры в отношении диоксидин-индуцированных повреждений генетического материала.

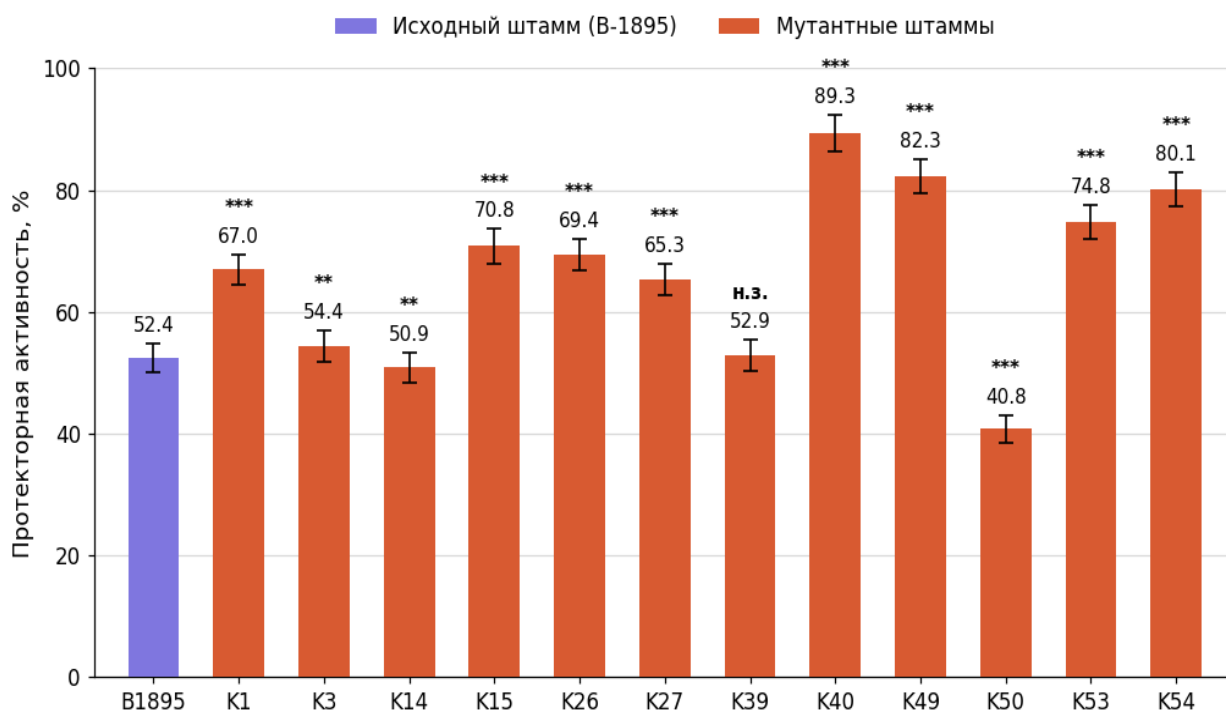


Рисунок 49. сравнение ДНК-протекторной активности мутантов *B. amyloliquefaciens* B-1895 с контрольным штаммом при использовании диоксидина в качестве индуктора. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t-критерий Стьюдента, vs B1895)

Анализ полученных данных выявил значительную вариабельность ДНК-протекторной активности среди исследованных мутантов, причём диапазон наблюдаемых значений оказался наиболее широким по сравнению с предыдущими экспериментальными системами — от 40,8% (K50) до 89,3% (K40). Статистически значимые различия относительно контрольного штамма зафиксированы для всех мутантов ($p < 0,001$ для большинства; $p < 0,01$ для K3 и K14), за единственным исключением — штамм K39 демонстрировал активность 52,9%, неотличимую от контрольного уровня, что указывает на нейтральный характер соответствующей мутации.

Лидирующие позиции по ДНК-протекторной активности занимали штаммы K40 (89,3%), K49 (82,3%) и K54 (80,1%), превышающие показатель контроля на 28–37%. Так, если K40 демонстрировал высокую протекторную активность также при индукции ципрофлоксацином (91,4%), то штаммы K49 и K54, напротив, характеризовались сниженными показателями при

пероксидном стрессе. Подобная специфичность паттерна активности свидетельствует о том, что мутации в K49 и K54 предпочтительно активируют механизмы защиты от прямых повреждений ДНК — в частности, системы эксцизионной репарации, репарации двунитевых разрывов или детоксикации электрофильных соединений, — не затрагивая при этом антиоксидантные пути нейтрализации активных форм кислорода. Высокую активность демонстрировали также штаммы K53 (74,8%) и K15 (70,8%), тогда как K26 (69,4%), K27 (65,3%) и K1 (67,0%) показали небольшое увеличение показателей.

Существенное снижение ДНК-протекторной активности относительно контрольного штамма зафиксировано у K50 (40,8%), что коррелирует с низкими показателями данного штамма в двух предыдущих экспериментальных системах и подтверждает общее ослабление защитного потенциала в результате соответствующей мутации. Штаммы K3 (54,4%) и K14 (50,9%) демонстрировали значения, незначительно отличающиеся от контроля, однако статистически достоверно сниженные ($p < 0,01$).

Полученные 12 мутантных штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895, с использованием CRISPR-Cas с делецией гена *abrB*, демонстрируют, что нарушение функции этого глобального регулятора может по-разному влиять на уровень протекторных свойств. Штамм K40 устойчиво демонстрирует высокие показатели протекторной активности во всех трёх системах, что делает его приоритетным кандидатом для углублённого молекулярно-генетического анализа. Штамм K15 также проявляет стабильно повышенную активность во всех тестах, хотя и с менее выраженным эффектом. Напротив, K50 последовательно занимает нижние позиции во всех трёх экспериментальных системах,

У части мутантов наблюдалось увеличение антиоксидантной, ДНК-защитной, SOS-ингибирующей активности, тогда как у других выраженного усиления не отмечалось. Это, вероятно, связано с тем, что после редактирования в области *abrB* сохранились 23 нефункциональных

нуклеотида, включая терминатор, а значит, итоговый фенотип мог определяться не только самой делецией, но и особенностями остаточной регуляторной структуры, а также дополнительными мутациями или различиями в уровне экспрессии соседних генов.

Таким образом, можно заключить, что полная или частичная инактивация *abrB* способствует увеличению синтеза вторичных метаболитов с протекторной активностью, однако эффект является штамм- и клон-специфичным. Это указывает на сложный характер регуляции, при котором потеря функции *abrB* не всегда приводит к одинаковому биохимическому ответу, а выраженность полезных свойств зависит от особенностей конкретного мутанта.

Совокупность представленных данных свидетельствует о том, что регуляция нерибосомального синтеза вторичных метаболитов у исследованных споровых бактерий носит многоуровневый характер и определяется иерархическим взаимодействием регуляторных механизмов различной степени специфичности — от неспецифических перестроек транскрипционного аппарата, опосредованных мутациями в *rpoB*, через модуляцию глобальными регуляторными белками (AbrB), до опосредованной катаболитной репрессией метаболической регуляции биосинтеза, контролируемой CsrA. Установленная иерархия регуляторных воздействий имеет значение для разработки стратегий направленного повышения продукции целевых метаболитов, поскольку позволяет обоснованно выбирать между генетическими подходами и негенетическими методами оптимизации условий культивирования в зависимости от конкретных задач биотехнологического производства.

Полученные результаты вносят вклад в понимание молекулярных механизмов регуляции вторичного метаболизма у споровых бактерий и создают методологическую основу для селекции и создания штаммов-продуцентов биологически активных соединений.

ВЫВОДЫ

1. Методом мутагенеза с последующим отбором на селективных средах, содержащих рифампицин, получены рифампицин-резистентные мутанты ряда штаммов. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей в программе Unipro UGENE выявил от 13 до 18 точечных замен на штамм, преимущественно транзиций, с кластеризацией в области, гомологичной кластерам I и II гена *rpoB* у представителей рода *Bacillus*. Методом направленного мутагенеза получен делеционный мутант K15 с удалённым участком гена *abrB* (позиции 879–1163 п.н.).

2. Rif^R-мутанты демонстрировали повышенную протекторную и антиоксидантную активность по сравнению с исходными штаммами. Активность в отношении подавления кворум-сенсинга у Rif^R-мутантов, напротив, снижалась по сравнению с контрольными вариантами, что свидетельствует о разобщённости регуляции соответствующих метаболических путей.

3. Полногеномное секвенирование штаммов CL33, CL35 и CL56 позволило идентифицировать их видовую принадлежность: CL33 и CL56 отнесены к *B. licheniformis*, CL35 — к *B. safensis*. Во всех трёх геномах обнаружен ген *cotA*, кодирующий лакказу с широкой субстратной специфичностью, тогда как гены *aiiA* и *BsDyP* отсутствовали.

4. Анализ экспрессии генов-регуляторов показал, что инактивация *abrB* снимает репрессию с биосинтетических кластеров, однако итоговый фенотип варьирует между клонами. Замена источника углерода в питательной среде дополнительно снижает активность CsrA-опосредованной катаболитной репрессии, что усиливает продукцию целевых метаболитов.

5. Сравнительный анализ плеiotропных эффектов мутаций в генах *rpoB* и *abrB* показал, что оба гена являются перспективными мишенями для направленной модификации, однако обеспечивают различные фенотипические эффекты. Мутации в *rpoB* преимущественно усиливают

протекторную и антиоксидантную активность, тогда как инактивация *abrB* перестраивает баланс между ростом, споруляцией и вторичным метаболизмом. Наиболее перспективным подходом для целенаправленного повышения продукции вторичных метаболитов признана комбинация генетической модификации по генам *rpoB* и *abrB* с оптимизацией состава питательной среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что мутации в гене *rpoB*, приводящие к рифампицин-резистентности (Rif^R), существенно усиливают протекторную и противогрибковую активность штаммов. Увеличение активности у рифампицин-резистентных штаммов косвенно свидетельствует о гиперпродукции вторичных метаболитов, гены синтеза которых обнаружены в геномах изученных штаммов.

Полученные результаты подчеркивают перспективность Rif^R-мутантов для разработки биопрепаратов с антимутагенным потенциалом. Также Rif^R-мутанты штаммов *Bacillus* являются перспективной основой для получения постбиотических препаратов с улучшенными противогрибковыми и протекторными свойствами, не требующих прохождения процедуры сертификации ГМО.

Ген *abrB* играет ключевую роль как глобальный регулятор, который в норме сдерживает преждевременную активацию вторичного метаболизма, споруляции и ряда адаптивных процессов у *Bacillus*. Его инактивация или ослабление функции снимает часть репрессии с биосинтетических путей, что может приводить к усилению протекторной, антимутагенной и противогрибковой активности за счет повышения продукции вторичных метаболитов. Поэтому его удаление или нарушение работы не просто меняет один отдельный признак, а перестраивает всю регуляторную сеть клетки, влияя на баланс между ростом, споруляцией и синтезом вторичных метаболитов. При этом эффект может быть неодинаковым у разных клонов, потому что итоговый фенотип зависит от степени нарушения гена, остаточных регуляторных элементов и других особенностей штамма.

Полученные данные демонстрируют, что эпигенетическая регуляция синтеза вторичных метаболитов у бактерий тесно связана с углеродным катаболизмом и иерархической сетью транскрипционных факторов. Замена глюкозы на сложные углеводы (крахмал, пектин) снимает CCR,

опосредованную CsrA, путем снижения уровня его метаболических активаторов (фруктозо-1,6-бисфосфат, глюкозо-6-фосфат), что активирует альтернативные пути утилизации углерода, индуцирует экспрессию генов деградации (например, *amyE*) и стимулирует продукцию метаболитов, в частности полимиксина. Также в данном контексте *abrB* следует рассматривать как важный глобальный репрессор, который ограничивает переход бактерий к синтезу вторичных метаболитов. Когда его активность снижается, снимается блокировка с биосинтетических путей, и клетка легче переключается на образование биоактивных соединений. Активность *abrB* можно косвенно подавлять не только генетически, но и за счёт изменения состава питательной среды. При замене глюкозы на другие источники углерода и при изменении соотношения питательных компонентов клетка перестраивает регуляторные сети, и это может снижать экспрессию *abrB*, тем самым ослабляя его репрессорное действие.

По-видимому, наиболее перспективным подходом к получению штаммов-высокоэффективных продуцентов вторичных метаболитов, является одновременное воздействие на генетическом и метаболическом уровнях. Генетические изменения, в частности, мутации в регуляторных генах, потенциально позволяют напрямую перестраивать биосинтетические и регуляторные сети, тогда как варьирование условий культивирования способно дополнительно способствовать активации нужных путей за счёт перестройки клеточного метаболизма и снижения репрессии. Можно предположить, что сочетание этих двух подходов будет давать более выраженный и устойчивый эффект по сравнению с использованием каждого из них по отдельности, поскольку теоретически это позволяет одновременно снять ограничения на уровне генома и создать благоприятные условия для экспрессии биосинтетических кластеров.

Полученные штаммы с повышенной протекторной и противогрибковой активностью могут служить основой для разработки биопрепаратов, которые могут быть востребованы в сельском хозяйстве, экологии и медицине.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абилов С., Глазер В. Мутагенез с основами генотоксикологии. – ЛитРес, 2016.
2. Авдеева Л. В., Драговоз И.В., Корж Ю. В. и др. Антагонистическая активность штаммов *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB В-7404 и БИМ В-439Д по отношению к фитопатогенным бактериям и микромицетам //Мікробіологічний журнал. – 2014. – №. 76,№ 6. – С. 27-33.
3. Демин К. А. Питательная среда для культивирования почвенных микроорганизмов : пат. 2864926 Рос. Федерация : МПК С12Q 1/00 / Демин К. А., Празднова Е. В., Мазанко М. С., Куликов М. П., Стаценко В. Н. — Оpubл. 30.06.2026.
4. Демин К. А. Плотная питательная среда для культивирования почвенных микроорганизмов : пат. 2863268 Рос. Федерация : МПК С12N 1/00 / Демин К. А., Празднова Е. В., Мазанко М. С., Куликов М. П., Стаценко В. Н. — Оpubл. 01.06.2026.
5. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. – 1986.
6. Землянко О. М., Рогоза Т. М., Журавлева Г. А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам //Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – №. 3. – С. 4-17.
7. Празднова Е. В., Андриянов А. И., Васильченко Н. Г. Нерибосомально синтезируемые метаболиты и генетические механизмы их синтеза в реализации фунгицидного эффекта бактерий р. *Bacillus* и *Paenibacillus* (обзор) //Живые и биокосные системы. – 2018. – №. 25. – С. 6-6.
8. Празднова Е. В., Куликов М. П., Стаценко В. Н., Брень А. Б. База данных геномов бактерий-продуцентов биологически активных соединений : свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2026620600 Рос. Федерация. — Оpubл. 10.02.2026.
9. Стаценко, В. Н. Плейотропное действие гена *groV* на устойчивость к антибиотикам и синтез вторичных метаболитов : выпускная квалификационная работа бакалавра : направление подготовки 06.03.01

«Биология» / В. Н. Стаценко ; Южный федеральный университет. – Ростов-на-Дону, 2020. – 51 с. – Текст : непосредственный.

10. Чистяков В. А. и др. Постбиотики: новая группа биопрепаратов //Живые и биокосные системы. – 2023. – Т. 46. – С. 6.

11. Чистяков В. А. Патент № 2724464 С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/20, А01N 63/00, А01Р 3/00. Штаммы, биопрепарат, способ получения биопрепарата и способ биологической защиты сельскохозяйственных культур от фузариоза : № 2019139147 : заявл. 02.12.2019 : опубл. 23.06.2020 / В. А. Чистяков, А. В. Горовцов, А. В. Усатов [и др.]; заявитель Общество с ограниченной ответственностью «Агрофирма «Урожайная»

12. Чистяков В. А. Патент № 2751487 С1 Российская Федерация, МПК А01N 63/22. Способ приготовления жидкой питательной среды и способ получения жидкого микробиологического препарата на основе смеси штаммов спорообразующих бактерий-антагонистов фитопатогенных грибов р. *Fusarium* : № 2020122106 : заявл. 03.07.2020 : опубл. 14.07.2021a / В. А. Чистяков, А. В. Горовцов, А. В. Усатов [и др.]; заявитель Общество с ограниченной ответственностью «Агрофирма «Урожайная».

13. Шепелин А. П. Сравнительная оценка качества среды Сабуро отечественного и импортного производства //Актуальные проблемы медицины. – 2013. – Т. 23. – №. 18 (161). – С. 182-187.

14. Ahmad T. et al. Biocontrol potential of lipopeptides produced by the novel *Bacillus subtilis* strain Y17B against postharvest *Alternaria* fruit rot of cherry //Frontiers in Microbiology. – 2023. – Т. 14. – С. 1150217.

15. Aleti G., Sessitsch A., Brader G. Genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes //Computational and structural biotechnology journal. – 2015. – Т. 13. – С. 192-203.

16. Ayoub Moubareck C. Polymyxins and bacterial membranes: a review of antibacterial activity and mechanisms of resistance //Membranes. – 2020. – Т. 10. – №. 8. – С. 181.

17. Bagewadi Z. K. et al. In-Silico analysis, molecular docking and dynamic simulation of anti-cancer metabolites derived from *Bacillus velezensis* // *Medicine in Microecology*. – 2026. – C. 100165.
18. Baidara P. et al. Characterization of the antimicrobial peptide penisin, a class Ia novel lantibiotic from *Paenibacillus* sp. strain A3 // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2016. – V. 60, №. 1. – P. 580-591.
19. Bais H. P., Fall R., Vivanco J. M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production // *Plant physiology*. – 2004. – T. 134. – №. 1. – C. 307-319.
20. Bayona D. E. et al. Genomic Insights into Antimicrobial Biosynthetic Potential of *Bacillus velezensis* Isolated from Traditional Peruvian Tocosh // *Microorganisms*. – 2026. – T. 14. – №. 2. – C. 287.
21. Beatty P. H., Jensen S. E. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola // *Canadian journal of microbiology*. – 2002. – T. 48. – №. 2. – C. 159-169.
22. Belitsky B. R., Kim H. J., Sonenshein A. L. CcpA-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase gene expression // *Journal of bacteriology*. – 2004. – T. 186. – №. 11. – C. 3392-3398.
23. Bogdanova A. et al. Polyketides Are Agents for Probiotics Antagonizing Pathogenic Microbiota // XIV International Scientific Conference “INTERAGROMASH 2021”. – Springer, Cham, 2022. – P. 60-68.
24. Borah P. Primer designing for PCR // *Science Vision*. – 2011. – T. 11. – №.3. – C. 134-136.
25. Brown D. P. et al. Characterization of *spo0A* homologues in diverse *Bacillus* and *Clostridium* species identifies a probable DNA-binding domain // *Molecular microbiology*. – 1994. – T. 14. – №. 3. – C. 411-426.
26. Cai X. C. et al. Rifampicin-resistance mutations in the *rpoB* gene in *Bacillus velezensis* CC09 have pleiotropic effects // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – T. 8.

- C. 178. Tyc O. et al. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria //Trends in microbiology. – 2017. – T. 25. – №. 4. – C. 280-292.
- 27. Cai X. C. et al. Rifampicin-resistance mutations in the rpoB gene in *Bacillus velezensis* CC09 have pleiotropic effects //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 178.
- 28. Campoli-Richards D. M. et al. Ciprofloxacin: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use //Drugs. – 1988. – T. 35. – №. 4. – C. 373-447.
- 29. Carballeira N. M. et al. Characterization of novel methyl-branched chain fatty acids from a halophilic *Bacillus* species //Journal of natural products. – 2001. – T. 64. – №. 2. – C. 256-259.
- 30. Cenci G. et al. In vitro inhibitory activity of probiotic spore-forming bacilli against genotoxins //Letters in applied microbiology. – 2008. – T. 46. – №. 3. – C. 331-337.
- 31. Chakraborty K. et al. Difficidin class of polyketide antibiotics from marine macroalga-associated *Bacillus* as promising antibacterial agents //Applied microbiology and biotechnology. – 2021. – T. 105. – №. 16. – C. 6395-6408.
- 32. Chen M. et al. Recent advances in antimicrobial lipopeptide fengycin secreted by *Bacillus*: Structure, biosynthesis, antifungal mechanisms, and potential application in food preservation //Food Chemistry. – 2025. – T. 489. – C. 144937.
- 33. Chen X. H. et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease //Journal of biotechnology. – 2009. – T. 140. – №. 1-2. – C. 38-44.
- 34. Chen X. H. et al. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens //Journal of biotechnology. – 2009. – T. 140. – №. 1-2. – C. 27-37.
- 35. Chen X. H. et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42 //Journal of bacteriology. – 2006. – T. 188. – №. 11. – C. 4024-4036.

36. Cheng W. et al. Anti-tumor role of *Bacillus subtilis* fmbJ-derived fengycin on human colon cancer HT29 cell line //Neoplasma. – 2016. – T. 63. – №. 2. – C. 215-222.
37. Chernyshova A. P. et al. Characterization of *Bacillus velezensis* EV17 and K-3618 and Their Polyketide Antibiotic Oxydifficidin, an Inhibitor of Prokaryotic Translation with Low Cytotoxicity //International Journal of Molecular Sciences. – 2025. – T. 26. – №. 24. – C. 11777.
38. Chistyakov V. A. et al. The use of biosensors to explore the potential of probiotic strains to reduce the SOS response and mutagenesis in bacteria //Biosensors. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 25.
39. Chklovski A. et al. CheckM2: a rapid, scalable and accurate tool for assessing microbial genome quality using machine learning //Nature methods. – 2023. – T. 20. – №. 8. – C. 1203-1212.
40. Cochrane S. A., Vederas J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates //Medicinal research reviews. – 2016. – T. 36. – №. 1. – C. 4-31.
41. Contesini F. J., Melo R. R., Sato H. H. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application //Critical reviews in biotechnology. – 2018. – T. 38. – №. 3. – C. 321-334.
42. Cui Y. et al. Abh, AbrB3, and Spo0A play distinct regulatory roles during polymyxin synthesis in *Paenibacillus polymyxa* SC2 //Microbiology Spectrum. – 2024. – T. 12. – №. 1. – C. e02293-23.
43. Dai C. et al. Surfactin and its antibacterial mechanism on *Staphylococcus aureus* and application in pork preservation //Food and Bioprocess Technology. – 2025. – T. 18. – №. 2. – C. 1311-1324.
44. Danilova I., Sharipova M. The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production //Frontiers in microbiology. – 2020. – T. 11. – C. 1782.
45. Deleu M., Paquot M., Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes //Biophysical journal. – 2008. – T. 94. – №. 7. – C. 2667-2679.

46. Deng Y. et al. Lipopeptide C17 fengycin B exhibits a novel antifungal mechanism by triggering metacaspase-dependent apoptosis in *Fusarium oxysporum* //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2024. – T. 72. – №. 14. – C. 7943-7953.
47. Detert Oude Weme R., Seidel G., Kuipers O. P. Probing the regulatory effects of specific mutations in three major binding domains of the pleiotropic regulator CcpA of *Bacillus subtilis* //Frontiers in Microbiology. – 2015. – T. 6. – C. 1051.
48. Ding L., Guo W., Chen X. Exogenous addition of alkanolic acids enhanced production of antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Pc3 //Applied microbiology and biotechnology. – 2019. – T. 103. – №. 13. – C. 5367-5377.
49. Dsouza M. et al. Genome-based comparative analyses of Antarctic and temperate species of *Paenibacillus* // PloS one. – 2014. – V. 9, №. 10. – P. e108009
50. Duban M., Cociancich S., Leclère V. Nonribosomal peptide synthesis definitely working out of the rules //Microorganisms. – 2022. – T. 10. – №. 3. – C. 577.
51. Duc L. H. et al. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use //Applied and environmental microbiology. – 2004. – T. 70. – №. 4. – C. 2161-2171.
52. Fadeeva N. I. et al. Change in the activity of enzymes under the action of dioxidine and florenal //Pharmaceutical Chemistry Journal. – 1980. – T. 14. – №. 10. – C. 674-677.
53. Faires N. et al. The catabolite control protein CcpA controls ammonium assimilation in *Bacillus subtilis* //J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – T. 1. – C. 141-148.
54. Fang J., Kato C. FAS or PKS, lipid biosynthesis and stable carbon isotope fractionation in deep-sea piezophilic bacteria //Commun. Curr. Res. Educ. Top. Trends Appl. Microbiol. – 2007. – T. 1. – C. 190-200.
55. Fujita M., González-Pastor J. E., Losick R. High-and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis* //Journal of bacteriology. – 2005. – T. 187. – №. 4. – C. 1357-1368.

56. Galinier A. et al. The *Bacillus subtilis* *crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1997. – T. 94. – №. 16. – C. 8439-8444.
57. Gao H. et al. Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – T. 9. – C. 456.
58. Gao Z. et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea* // *Biological Control*. – 2017. – T. 105. – C. 27-39.
59. Garcia-Gonzalez E. et al. Biological effects of paenilamicin, a secondary metabolite antibiotic produced by the honey bee pathogenic bacterium *Paenibacillus larvae* // *Microbiologyopen*. – 2014. – T. 3. – №. 5. – C. 642-656.
60. Gautam A. DNA and RNA Isolation Techniques for Non-experts. – Cham : Springer, 2022. – C. 79-84.
61. Golosova O. et al. Unipro UGENE NGS pipelines and components for variant calling, RNA-seq and ChIP-seq data analyses // *PeerJ*. – 2014. – T. 2. – C. e644.
62. Grady E. N. et al. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review // *Microbial cell factories*. – 2016. – V. 15, №. 1. – P. 1-18.
63. Guglya E. B. et al. *Bacillus*-Based Biocontrol Agents Mediate Pathogen Killing by Biodegradable Antimicrobials from Macrolactin Family // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – T. 26. – №. 22. – C. 11167.
64. Hamon M. A. et al. Identification of *AbrB*-regulated genes involved in biofilm formation by *Bacillus subtilis* // *Molecular microbiology*. – 2004. – T. 52. – №. 3. – C. 847-860.
65. Han D. et al. Therapeutic effect of iturin A on *Candida albicans* oral infection and its pathogenic factors // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2024. – T. 68. – №. 1. – C. e00948-23.
66. Harwood C. R. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses // *Trends in biotechnology*. – 1992. – T. 10. – C. 247-256.

67. Harwood C. R. et al. Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group // FEMS microbiology reviews. – 2018. – V. 42, №. 6. – P. 721-738.
68. He Z. et al. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – V. 73, №. 1. – P. 168-178.
69. Henkin T. M. The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis* // FEMS microbiology letters. – 1996. – T. 135. – №. 1. – C. 9-15.
70. Henkin T. M. The role of the CcpA transcriptional regulator in carbon metabolism in *Bacillus subtilis* // FEMS microbiology letters. – 1996. – T. 135. – №. 1. – C. 9-15.
71. Hertweck C. The biosynthetic logic of polyketide diversity // Angewandte Chemie International Edition. – 2009. – T. 48. – №. 26. – C. 4688-4716.
72. Huang E., Yousef A. E. Draft genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF, which coproduces a lantibiotic, paenibacillin, and polymyxin E1. – 2012.
73. Jiang A. et al. Role of fusaricidin against pokkah boeng disease of sugarcane by affecting fungal signalling pathways and inducing *Fusarium sacchari* conidia death // Pest Management Science. – 2026.
74. Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M. Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review // Journal of natural products. – 2019. – T. 82. – №. 7. – C. 2038-2053.
75. Khan A. R. et al. *Bacillus* spp. as bioagents: uses and application for sustainable agriculture // Biology. – 2022. – T. 11. – №. 12. – C. 1763.
76. Kim H. S. et al. Isolation and characterization of *Bacillus* strains for biological control // Journal of microbiology. – 2003. – T. 41. – №. 3. – C. 196-201.
77. Kim J. F. et al. Genome sequence of the polymyxin-producing plant-probiotic rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* E681 // Journal of bacteriology. – 2010. – T. 192. – №. 22. – C. 6103-6104.

78. Klausmann P. et al. Influence of *B. subtilis* 3NA mutations in *spo0A* and *abrB* on surfactin production in *B. subtilis* 168 //Microbial Cell Factories. – 2021. – T. 20. – C. 1-15.
79. Koch A., Mizrahi V., Warner D. F. The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? //Emerging microbes & infections. – 2014. – T. 3. – №. 1. – C. 1-11.
80. Koller T. O. et al. Paenilamicins are context-specific translocation inhibitors of protein synthesis //Nature Chemical Biology. – 2024. – T. 20. – №. 12. – C. 1691-1700.
81. Kolmogorov M. et al. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs //Nature biotechnology. – 2019. – T. 37. – №. 5. – C. 540-546.
82. Koschorreck K. et al. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids //Applied Microbiology and Biotechnology. – 2008. – T. 79. – №. 2. – C. 217-224.
83. Kulikov M. P. et al. Antioxidant, DNA-protective, and SOS inhibitory activities of *Enterococcus durans* metabolites //Gene Reports. – 2022. – T. 27. – C. 101544.
84. Lal S., Tabacchioni S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a minireview //Indian Journal of Microbiology. – 2009. – T. 49. – №. 1. – C. 2-10.
85. Langendries S., Goormachtig S. *Paenibacillus polymyxa*, a Jack of all trades //Environmental Microbiology. – 2021. – T. 23. – №. 10. – C. 5659-5669.
86. Lee B. Y. et al. Systemic resistance to strawberry anthracnose induced by *Paenibacillus polymyxa* TP3 requires the fusaricidin synthetase gene *fusA*. – 2026.
87. Lee S. H. et al. An antibiotic fusaricidin: a cyclic depsipeptide from *Paenibacillus polymyxa* E681 induces systemic resistance against *Phytophthora* blight of red-pepper //Phytoparasitica. – 2013. – T. 41. – №. 1. – C. 49-58.
88. Lee Y. S. et al. Isolation and antifungal activity of methyl 2, 3-dihydroxybenzoate from *Paenibacillus elgii* HOA73 // Microbial pathogenesis. – 2017. – V. 106. – P. 139-145.

89. Leehan J. D., Nicholson W. L. Environmental dependence of competitive fitness in rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Bacillus subtilis* //Applied and Environmental Microbiology. – 2022. – T. 88. – №. 5. – C. e02422-21.
90. Li S. et al. Promoter analysis and transcription regulation of *fus* gene cluster responsible for fusaricidin synthesis of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 // Applied microbiology and biotechnology. – 2013. – V. 97, №. 21. – P. 9479-9489.
91. Li Y. et al. Fusaricidin biosynthesis is controlled via a KinB-Spo0A-AbrB signal pathway in *Paenibacillus polymyxa* WLY78 //Molecular Plant-Microbe Interactions. – 2021. – T. 34. – №. 12. – C. 1378-1389.
92. Lilge L., Kuipers O. P. A two-step regulatory circuit involving Spo0A-AbrB activates mersacidin biosynthesis in *Bacillus subtilis* //International journal of antimicrobial agents. – 2024. – T. 63. – №. 5. – C. 107155.
93. Lisboa M. P. et al. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest //International Microbiology. – 2006. – T. 9. – №. 2. – C. 111-118.
94. Liyaskina E. V. et al. Production and characterization of the exopolysaccharide from strain *Paenibacillus polymyxa* 2020 //PloS one. – 2021. – T. 16. – №. 7. – C. e0253482.
95. Lohans C. T. et al. Structural characterization of the highly cyclized lantibiotic paenicidin A via a partial desulfurization/reduction strategy // Journal of the American Chemical Society. – 2012. – V. 134, №. 48. – P. 19540-19543.
96. Lorca G. L. et al. Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK //Journal of bacteriology. – 2005. – T. 187. – №. 22. – C. 7826-7839.
97. Lu F. et al. Isolation and identification of an endophytic strain EJS-3 producing novel fibrinolytic enzymes //Current Microbiology. – 2007. – T. 54. – C. 435-439.
98. Ma S. et al. Epimeric Macrolactin Analogs From a Marine-Derived *Bacillus velezensis* Against Herpesvirus //Chemistry & Biodiversity. – 2025. – C. e202402748.

99. Manioglu S. et al. Antibiotic polymyxin arranges lipopolysaccharide into crystalline structures to solidify the bacterial membrane //Nature communications. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 6195.
100. Maughan H., Galeano B., Nicholson W. L. Novel rpoB mutations conferring rifampin resistance on *Bacillus subtilis*: global effects on growth, competence, sporulation, and germination //Journal of bacteriology. – 2004. – T. 186. – №. 8. – C. 2481-2486.
101. Mohammad M., Badaluddin N. A., Asri E. A. Biological functions of *Paenibacillus* spp. for agriculture applications //Bulgarian Journal of Agricultural Science. – 2024. – T. 30. – №. 5.
102. Mojgani N. Bacteriocin-producing rhizosphere bacteria and their potential as a biocontrol agent //Rhizotrophs: Plant growth promotion to bioremediation. – 2017. – C. 165-181.
103. Mondol M. A. M. et al. Ieodomycins A–D, antimicrobial fatty acids from a marine *Bacillus* sp //Journal of natural products. – 2011. – T. 74. – №. 7. – C. 1606-1612.
104. Mondol M. A. M., Shin H. J., Islam M. T. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity //Marine drugs. – 2013. – T. 11. – №. 8. – C. 2846-2872.
105. Moyne A. L., Cleveland T. E., Tuzun S. Molecular characterization and analysis of the operon encoding the antifungal lipopeptide bacillomycin D //FEMS Microbiology Letters. – 2004. – T. 234. – №. 1. – C. 43-49.
106. Müller S. et al. Bacillaene and sporulation protect *Bacillus subtilis* from predation by *Myxococcus xanthus* //Applied and environmental microbiology. – 2014. – T. 80. – №. 18. – C. 5603-5610.
107. Naing K. W. et al. Characterization of antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups // Annals of Microbiology. – 2014. – V. 64, №. 1. – P. 55-63.

108. Nakano M. M. et al. *srfA* is an operon required for surfactin production, competence development, and efficient sporulation in *Bacillus subtilis* // Journal of bacteriology. – 1991. – V. 173, №. 5. – P. 1770-1778.
109. Nasiri V., Dalimi A., Ghaffarifar F. LB broth-lyophilized Rabbit serum (LLR) as a new and suitable culture medium for cultivation of promastigotes of *Leishmania major* //Journal of parasitic diseases. – 2017. – T. 41. – №. 1. – C. 247-251.
110. Neung S. et al. Insecticidal potential of *Paenibacillus elgii* HOA73 and its combination with organic sulfur pesticide on diamondback moth, *Plutella xylostella* // Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. – 2014. – V. 57, №. 2. – P. 181-186.
111. Niu B. et al. Polymyxin P is the active principle in suppressing phytopathogenic *Erwinia* spp. by the biocontrol rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1 //BMC microbiology. – 2013. – T. 13. – C. 1-13.
112. Olishavska S., Nickzad A., Déziel E. *Bacillus* and *Paenibacillus* secreted polyketides and peptides involved in controlling human and plant pathogens //Applied microbiology and biotechnology. – 2019. – T. 103. – №. 3. – C. 1189-1215.
113. Omura S. et al. Herbimycin, a new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces* //The Journal of antibiotics. – 1979. – T. 32. – №. 4. – C. 255-261.
114. Ongena M. *Bacillus*-based biological control of plant diseases //Natural products and Biocontrol Congress 2014. – 2014.
115. Pandey A. K., Barbetti M. J., Lamichhane J. R. *Paenibacillus polymyxa* //Trends in Microbiology. – 2023. – T. 31. – №. 6. – C. 657-659.
116. Pandey K. D. et al. Secondary metabolites from bacteria and viruses //Natural bioactive compounds. – 2021. – C. 19-40.
117. Parisot J. et al. Molecular mechanism of target recognition by subtilin, a class I lanthionine antibiotic //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2008. – T. 52. – №. 2. – C. 612-618.

118. Park S. Y. et al. Efficient production of polymyxin in the surrogate host *Bacillus subtilis* by introducing a foreign *ectB* gene and disrupting the *abrB* gene // *Applied and environmental microbiology*. – 2012. – V. 78, №. 12. – P. 4194-4199.
119. Parks D. H. et al. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy // *Nucleic acids research*. – 2022. – T. 50. – №. D1. – C. D785-D794.
120. Patel Y. et al. Mutations in *rpoB* that confer rifampicin resistance can alter levels of peptidoglycan precursors and affect β -lactam susceptibility // *MBio*. – 2023. – T. 14. – №. 2. – C. e03168-22.
121. Patil P. S., Gore N. S. Bacterial non-ribosomal peptides: a sustainable approach for combatting phytopathogenic fungi in agriculture // *New Zealand Journal of Botany*. – 2024. – C. 1-15.
122. Plotnikov M. B. et al. Antithrombotic and Thrombolytic Effects of a New Proteolytic Preparation Trombovazim (Russia) // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2009. – T. 147. – C. 438-440.
123. Poulaki E. G., Tjamos S. E. *Bacillus* species: factories of plant protective volatile organic compounds // *Journal of applied microbiology*. – 2023. – T. 134. – №. 3. – C. lxad037.
124. Prazdnova E. et al. Functional Genomic Analysis of Three Novel Candidate Probiotic Strains with Quorum-Quenching and Predicted Mycotoxin Mitigation Potential // *Applied Microbiology*. – 2026. – T. 6. – №. 6. – C. 70.
125. Prazdnova E. V. et al. DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 // *Letters in applied microbiology*. – 2015. – T. 61. – №. 6. – C. 549-554.
126. Prazdnova E. V. et al. Genomic Analysis and Metabolite Profiling of Three Probiotic *Bacillus* Strains for Potential Application in Aquaculture // *Preventive Nutrition and Food Science*. – 2025. – T. 30. – №. 3. – C. 274.
127. Prazdnova E. V. et al. SOS response inhibitory properties by potential probiotic formulations of *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis*

- KATMIRA1933 obtained by solid-state fermentation //Current microbiology. – 2019. – T. 76. – №. 3. – C. 312-319.
128. Qiao J. et al. Research advances in the identification of regulatory mechanisms of surfactin production by *Bacillus*: a review //Microbial Cell Factories. – 2024. – T. 23. – №. 1. – C. 100.
129. Rahman F. B. et al. Molecular genetics of surfactin and its effects on different sub-populations of *Bacillus subtilis* //Biotechnology Reports. – 2021. – T. 32. – C. e00686.
130. Rahman L. et al. Surfactin-conjugated silver nanoparticles as an antibacterial and antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* //Acs Applied Materials & Interfaces. – 2023. – T. 15. – №. 37. – C. 43321-43331.
131. Raza W. et al. Isolation and characterisation of fusaricidin-type compound-producing strain of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 active against *Fusarium oxysporum* f. sp. *neovium* // European Journal of Plant Pathology. – 2009. – V. 125, №. 3. – P. 471-483.
132. Raza W. et al. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* // Biological Control. – 2015. – V. 80. – P. 89-95.
133. Raza W., Hongsheng W., Qirong S. Response of *Paenibacillus polymyxa* to iron: alternations in cellular chemical composition and the production of fusaricidin type antimicrobial compounds // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2010. – V. 53, №. 5. – P. 1145-1154.
134. Reimer J. M. et al. Piecing together nonribosomal peptide synthesis //Current opinion in structural biology. – 2018. – T. 49. – C. 104-113.
135. Sansinenea E., Ortiz A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp //Biotechnology letters. – 2011. – T. 33. – C. 1523-1538.
136. Seo D. J. et al. Antifungal activity of chitinase obtained from *Paenibacillus ehimensis* MA2012 against conidial of *Collectotrichum gloeosporioides* in vitro // Microbial pathogenesis. – 2016. – V. 96. – P. 10-14.

137. Sharma A. et al. Diversity of entomopathogenic bacteria associated with the white grub, *Brahmina coriacea* // Journal of pest science. – 2013. – V. 86, №. 2. – P. 261-273.
138. Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms //Current opinion in chemical biology. – 2003. – T. 7. – №. 2. – C. 285-295.
139. Shih S. Y. et al. Isolation and genome characterization of *Paenibacillus polymyxa* 188, a potential biocontrol agent against fungi //Journal of Applied Microbiology. – 2024. – T. 135. – №. 4. – C. 1xae075.
140. Sood S. et al. Paenilarvins: iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* // Chembiochem. – 2014. – V. 15, №. 13. – P. 1947-1955.
141. Sprehe M. et al. CcpA mutants with differential activities in *Bacillus subtilis* //Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. – 2007. – T. 12. – №. 1-2. – C. 96-105.
142. Statsenko V. N., Prazdnova E. V., Kulikov M. P. Influence of rifampicin-resistance mutations on the synthesis of antioxidant, DNA-protective, and SOS-inhibitory metabolites //Applied Biochemistry and Microbiology. – 2025. – T. 61. – №. 3. – C. 542-550.
143. Strauch M. et al. The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1990. – T. 87. – №. 5. – C. 1801-1805.
144. Sun C. et al. Fusaricidins from *Paenibacillus polymyxa* ZJU11 mediate the biological control of postharvest mango anthracnose //Postharvest Biology and Technology. – 2026. – T. 234. – C. 114148.
145. Sur S., Romo T. D., Grossfield A. Selectivity and mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide, from molecular dynamics // The Journal of Physical Chemistry B. – 2018. – V. 122, №. 8. – P. 2219-2226.

146. Süssmuth R. D., Mainz A. Nonribosomal peptide synthesis—principles and prospects // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2017. – T. 56. – №. 14. – C. 3770-3821.
147. Tahir H. A. S. et al. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2 // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – T. 8. – C. 171.
148. Tanaka Y. et al. Activation and products of the cryptic secondary metabolite biosynthetic gene clusters by rifampin resistance (*rpoB*) mutations in actinomycetes // *Journal of bacteriology*. – 2013. – T. 195. – №. 13. – C. 2959-2970.
149. Teng Y. et al. Gene cluster analysis for the biosynthesis of elgicins, novel lantibiotics produced by *Paenibacillus elgii* B69 // *BMC microbiology*. – 2012. – V. 12, №. 1. – P. 1-9.
150. Tobisch S. et al. Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis* // *Journal of bacteriology*. – 1999. – T. 181. – №. 22. – C. 6996-7004.
151. Toral L. et al. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea* // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – T. 9. – C. 1315.
152. Tsai S. H. et al. The potential biocontrol agent *Paenibacillus polymyxa* TP3 produces fusaricidin-type compounds involved in the antagonism against gray mold pathogen *Botrytis cinerea* // *Phytopathology®*. – 2022. – V. 112, №. 4. – P. 775-783.
153. Turinsky A. J. et al. *Bacillus subtilis* *ccpA* gene mutants specifically defective in activation of acetoin biosynthesis // *Journal of Bacteriology*. – 2000. – T. 182. – №. 19. – C. 5611-5614.
154. Vasilchenko A. S. et al. Macrolactin a is an inhibitor of protein biosynthesis in bacteria // *Biochimie*. – 2025. – T. 232. – C. 25-34.
155. Vater J. et al. Characterization of novel fusaricidins produced by *Paenibacillus polymyxa*-M1 using MALDI-TOF mass spectrometry // *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*. – 2015. – V. 26, №. 9. – P. 1548-1558.

156. Von der Weid I. et al. Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD-62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi // *Journal of Applied Microbiology*. – 2003. – V. 95, №. 5. – P. 1143-1151.
157. Vos P. et al. (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. – Springer Science & Business Media, 2011. – T. 3.
158. Wang S. et al. Exploring mechanisms of antifungal lipopeptide iturin A from *Bacillus* against *Aspergillus niger* // *Journal of Fungi*. – 2024. – T. 10. – №. 3. – C. 172.
159. Weselowski B. et al. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production // *BMC microbiology*. – 2016. – V. 16, №. 1. – P. 1-10.
160. Wu X. C. et al. Paenimacrolidin, a novel macrolide antibiotic from *Paenibacillus* sp. F6-B70 active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Microbial Biotechnology*. – 2011. – T. 4. – №. 4. – C. 491-502.
161. Xiao B. et al. Complete genome sequence and comparative genome analysis of the *Paenibacillus mucilaginosus* K02 // *Microbial pathogenesis*. – 2016. – V. 93. – P. 194-203.
162. Xiao S. et al. Secondary metabolites from marine-derived *Bacillus*: a comprehensive review of origins, structures, and bioactivities // *Marine Drugs*. – 2022. – T. 20. – №. 9. – C. 567.
163. Yaraguppi D. A. et al. Iturin: a promising cyclic lipopeptide with diverse applications // *Biomolecules*. – 2023. – T. 13. – №. 10. – C. 1515.
164. Yin Y. et al. Strategies for improving fengycin production: a review // *Microbial Cell Factories*. – 2024. – T. 23. – №. 1. – C. 144.
165. Yu Z. et al. Enhanced production of polymyxin E in *Paenibacillus polymyxa* by replacement of glucose by starch // *BioMed research international*. – 2018. – V. 2018.

166. Yu Z. et al. Enhanced production of polymyxin E in *Paenibacillus polymyxa* by replacement of glucose by starch // *BioMed research international*. – 2018. – V. 2018.
167. Zavilgelsky G. B., Kotova V. Y., Manukhov I. V. Action of 1, 1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2007. – T. 634. – №. 1-2. – C. 172-176.
168. Zeigler D. R., Perkins J. B. The genus *Bacillus* // *Practical handbook of microbiology*. – CRC Press, 2021. – C. 249-278.
169. Zhang D. et al. Enhanced Iturin A Synthesis and Antifungal Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* by Genetic Engineering of Protease, ATP Supply and its Operon // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2025. – T. 73. – №. 38. – C. 24092-24101.
170. Zhang Q. et al. Understanding energy fluctuation during the transition state: The role of AbrB in *Bacillus licheniformis* // *Microbial Cell Factories*. – 2024. – T. 23. – №. 1. – C. 296.
171. Zhao H. Y., Feng H. Engineering *Bacillus pumilus* alkaline serine protease to increase its low-temperature proteolytic activity by directed evolution // *BMC biotechnology*. – 2018. – T. 18. – C. 1-12.
172. Zhou L. et al. Pan-genome analysis of *Paenibacillus polymyxa* strains reveals the mechanism of plant growth promotion and biocontrol // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2020. – T. 113. – C. 1539-1558.
173. Zihahirwa Kulimushi P., Argüelles Arias A., Franzil L., Steels S., Ongena M. et al. Stimulation of fengycin-type antifungal lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* in the presence of the maize fungal pathogen *Rhizomucor variabilis* // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – V. 8. – P. 850.
174. Żółkiewicz J. et al. Postbiotics—a step beyond pre-and probiotics // *Nutrients*. – 2020. – T. 12. – №. 8. – C. 2189.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Спектр генов синтеза вторичных метаболитов

Штамм	Вид	Обнаруженные гены синтеза	Активность <i>in vivo</i>
R1	<i>Bacillus subtilis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин Пульхериминовая кислота 1-карбапен-2-эм-3-карбоновая кислота Плипластин	Пробиотик рыб
R4	<i>Bacillus amyloliquefaciens/velezensis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Бацилизин Плипластин Лоцилломицин	Пробиотик рыб
R5	<i>Bacillus amyloliquefaciens/velezensis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Бацилизин	Пробиотик рыб
CL33	<i>Bacillus licheniformis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Пульхериминовая кислота Шизокинен Лихенизин	Пробиотик КРС (коров)
CL35	<i>Bacillus safensis</i>	Бациллибактин Фенгицин	Пробиотик КРС (коров)

		Бацилизин Плантазолицин Шизокинен Лихенизин	
CL56	<i>Bacillus licheniformis</i>	Бациллибактин Фенгицин Пульхериминова я кислота Шизокинен Лихенизин Лихеницидин	Пробиотик КРС (коров)
V3.14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>Bacillus velezensis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Бацилизин Макролактин Н Плантазолицин Диффицидин	Антагонист <i>Fusarium</i>
R4.6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>Bacillus velezensis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Бацилизин Макролактин Н Плантазолицин Диффицидин	Антагонист <i>Fusarium</i>
K1.14	<i>Paenibacillus peoriae</i>	Фузарицидин В Скабихелин Пенинодин Пенилан Тридекаптин Пельгепептин Пенилипогептин Продигиозин	Антагонист <i>Fusarium</i>
R4.24	<i>Paenibacillus peoriae</i>	Аурантинин Фузарицидин В Скабихелин	Антагонист <i>Fusarium</i>

		Тридекаптин Пенилипогептин Октапептин С4	
R4.5	<i>Paenibacillus peoriae</i>	Полимиксин Аурантинин Фузарицидин В Пенинодин Тридекаптин	Антагонист <i>Fusarium</i>
R5.31	<i>Paenibacillus peoriae</i>	Полимиксин Аурантинин Фузарицидин В Пенинодин Пенилан Тридекаптин Пенилипогептин	Антагонист <i>Fusarium</i>
R3.13	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Полимиксин Аурантинин Фузарицидин В Пенилан Тридекаптин Пенибациллин Бовиенимид А Пеницидин А Фрейразин	Антагонист <i>Fusarium</i>
R6.14	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Полимиксин Аурантинин Фузарицидин В Пенилан Тридекаптин Бовиенимид А	Антагонист <i>Fusarium</i>
O1.27	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Полимиксин Аурантинин Фузарицидин В Пенилан Тридекаптин Бовиенимид А	Антагонист <i>Fusarium</i>
O2.11	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	Полимиксин Аурантинин	Антагонист <i>Fusarium</i>

		Фузарицидин В Пенилан Тридекаптин Бовиенимид А	
21A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>Bacillus velezensis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Бацилизин Макролактин Н Диффицидин Андалузицин Бациллотиазол	Антагонист <i>Candida</i>
43A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>Bacillus velezensis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Бацилизин Макролактин Н Диффицидин Андалузицин Бациллотиазол	Антагонист <i>Candida</i>
7A	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> / <i>Bacillus velezensis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Бацилизин Макролактин Н Диффицидин Андалузицин Бациллотиазол	Антагонист <i>Candida</i>
15A	<i>Bacillus halotolerans</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин	Антагонист <i>Candida</i>

31A	<i>Bacillus halotolerans</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин	Антагонист <i>Candida</i>
35A	<i>Bacillus halotolerans</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин	Антагонист <i>Candida</i>
40A	<i>Bacillus halotolerans</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин	Антагонист <i>Candida</i>
41A	<i>Bacillus halotolerans</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин	Антагонист <i>Candida</i>
42A	<i>Bacillus halotolerans</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин	Антагонист <i>Candida</i>
58B	<i>Bacillus subtilis</i>	Бациллибактин Фенгицин Полимиксин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин	Антагонист <i>Candida</i>

		Пульхериминова я кислота 1-карбапен-2-эм- 3-карбоновая кислота	
60B	<i>Bacillus subtilis</i>	Бациллибактин Полимиксин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин Пульхериминова я кислота 1-карбапен-2-эм- 3-карбоновая кислота	Антагонист <i>Candida</i>
C65A	<i>Bacillus subtilis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин Пульхериминова я кислота 1-карбапен-2-эм- 3-карбоновая кислота	Антагонист <i>Candida</i>
C65B	<i>Bacillus subtilis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин Пульхериминова я кислота 1-карбапен-2-эм- 3-карбоновая кислота	Антагонист <i>Candida</i>

8A	<i>Bacillus subtilis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин Пульхериминова я кислота 1-карбапен-2-эм- 3-карбоновая кислота	Антагонист <i>Candida</i>
50.1B	<i>Bacillus subtilis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин Пульхериминова я кислота 1-карбапен-2-эм- 3-карбоновая кислота	Антагонист <i>Candida</i>
B1895	<i>Bacillus amyloliquifaciens/velezensis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Бацилизин Макролактин Н Плантазолицин Диффицидин	Пробиотик широкого спектра
KATMIR A 1933	<i>Bacillus subtilis</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин Субтилозин А Бацилизин Пульхериминова я кислота	Пробиотик широкого спектра

		1-карбапен-2-эм-3-карбоновая кислота	
AG46	<i>Bacillus safensis</i>	Бациллибактин Фенгицин Бацилизин	Фитостимулятор
AG8	<i>Bacillus atrophaeus</i>	Бациллибактин Фенгицин Сурфактин Бациллин 1-карбапен-2-эм-3-карбоновая кислота Аурантинин	Фитостимулятор
C 76.2	<i>Bacillus</i>		Антагонист <i>Candida</i>

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Антагонистическая активность штаммов бактерий против грибов рода *Candida*

Название штамма	Зона подавления без добавления <i>Candida</i> в среду, мм	Зона подавления с добавлением <i>Candida</i> в среду, мм	Тип антагонизма	Индукция, мм
С 1	0	0		
С 2	0	0		
С 3	0	0		
С 4	7	7	К	
С 5	0	0		
С 6.1	17	16	К	
С 6.2	5	4	К	
С 7	0	0		
С 8А	4	4	К	
С 8В	6	7	И	1
С 9	0	0		
С 10	0	0		
С 11	20	24	И	4
С 12	0	0		
С 13	0	0		
С 14	0	0		
С 15	23	28	И	5
С 16	0	0		
С 17	0	0		
С 18	0	0		
С 19	0	0		
С 20.1	13	13	К	
С 20.2А	10	12	И	2
С 20.2В	11	11	К	
С 21	0	0		
С 22	8	10	И	2
С 23	0	0		
С 24	0	0		
С 25	0	0		

C 26	0	0		
C 27.1A	21	24	И	3
C 27.1B	17	25	И	8
C 27.2	14	18	И	4
C 28A	1	3	И	2
C 29	0	0		
C 30	0	0		
C 31	0	0		
C 32.1	7	13	И	6
C 33	0	0		
C 34	0	0		
C 35.1	12	15	И	3
C 35.2	0	4	И	4
C 36	0	0		
C 37	0	0		
C 38	0	0		
C 39	0	0		
C 40	0	0		
C 41	0	0		
C 42	0	0		
C 43	0	0		
C 44	0	0		
C 45	0	0		
C 46	0	0		
C 47	0	0		
C 48	0	0		
C 49.1A	14	27	И	13
C 49.1B	17	24	И	7
C 49.1C	15	23	И	8
C 49.1D	18	17	К	
C 50	28	28	К	
C 50.1	19	25	И	6
C 51.1	14	20	И	6
C 51.2A	27	30	И	3
C 51.2B	11	15	И	4
C 52	0	0		
C 53.1	23	26	И	3
C 53.2	20	19	К	
C 54	0	0		

C 55	0	0		
C 56	0	0		
C 57A	0	0		
C 57B	0	1	И	1
C 57C	4	3	К	
C 58	18	20	И	2
C 59.1	17	15	К	
C 59.2	14	20	И	6
C 60	16	24	И	8
C 61A	14	23	И	9
C 61B	17	20	И	3
C 62A	11	14	И	3
C 62B	30	23	К	
C 63.1	15	20	И	5
C 63.2	15	19	И	4
C 64	17	19	И	2
C 65A	25	22	К	
C 65 B	25	27	И	2
C 66	0	0		0
C 67	0	0		0
C 68	15	15	К	0
C 69	0	0		0
C 70	0	0		0
C 71	0	0		0
C 72	0	0		0
C 73	17	16	К	
C 74	17	15	К	
C 75	24	27	И	3
C 76	18	30	И	12
C 76.2	0	25	И	25