

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579.64+579.22+579.25

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-213-223>

Поступила в редакцию 12.05.2023

Received 12.05.2023

Е. Ю. Шмыга¹, А. А. Муратова², Э. И. Коломиец¹

¹Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии»,
Минск, Республика Беларусь

²Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИЙ – ОСНОВЫ ПРЕПАРАТА МИКРОБНОГО «БИОПРОДУКТИН»

Аннотация. Культуры бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *Priestia megaterium* БИМ В-1269 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д, составляющие основу биопрепарата «Биопродуктин», обладают взаимно дополняющими свойствами – выраженной антимикробной, азотфиксирующей, фосфатмобилизующей и фитостимулирующей активностью, способностью синтезировать ряд гидролитических ферментов (протеиназу, эндо-1,4-β-ксилау, эндо-1,4-β-глюканазу, α-амилазу и фитазу), индолилуксусную кислоту, сидерофоры. В геномах изучаемых штаммов бактерий установлено наличие генов, кодирующих синтез бацилломина, бациллибактина, бацилломицина, диффицидина, фенгигина, макролактин, сурфактина и итурина, что подтверждает их значительный антимикробный потенциал. Показано также наличие в бактериальной хромосоме генов, определяющих синтез индолилуксусной кислоты – основного гормона роста растений.

Ключевые слова: бактерии родов *Bacillus* и *Priestia*; антимикробная, азотфиксирующая, фосфатмобилизующая и ростстимулирующая активность; гидролитические ферменты; ИУК; сидерофоры

Для цитирования: Шмыга, Е. Ю. Физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика бактерий – основы препарата микробного «Биопродуктин» / Е. Ю. Шмыга, А. А. Муратова, Э. И. Коломиец // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2023. – Т. 68, № 3. – С. 213–223. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-213-223>

Ekatsiaryna Yu. Shmyga¹, Anna A. Muratova², Emiliya I. Kalamiyets¹

¹State Scientific and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology”, Minsk, Republic of Belarus

²Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF THE BACTERIA – THE BASIS OF THE MICROBIAL PREPARATION “BIOPRODUCTIN”

Abstract. Cultures of *Bacillus amyloliquefaciens* BIM B-1267 D, *B. mojavensis* BIM B-1268 D, *Priestia megaterium* BIM B-1269 D and *B. amyloliquefaciens* BIM B-1270 D bacteria, which form the basis of the bioproduct “Bioproductin”, have mutually complementary properties – pronounced antimicrobial, nitrogen-fixing, phosphate-mobilizing and phytostimulating activities, the ability to synthesize a number of hydrolytic enzymes (proteinase, endo-1,4-β-xylanase, endo-1,4-β-glucanase, α-amylase and phytase), indolyacetic acid, siderophores. In the genomes of the studied bacterial strains, the presence of genes encoding the synthesis of bacillen, bacillibactin, bacillomycin, diffidicin, phengicin, macrolactin, surfactin, and iturin was established, which confirms their significant antimicrobial potential. It is also shown that the genes determining the synthesis of indolyacetic acid – the main hormone of plant growth – are present in the bacterial chromosome.

Keywords: bacteria of the genus *Bacillus* and *Priestia*, antimicrobial, nitrogen-fixing, phosphate-mobilizing and growth-stimulating activities, hydrolytic enzymes, IUC, siderophores

For citation: Shmyga E. Yu., Muratova A. A., Kalamiyets E. I. Physiological and biochemical and molecular genetic characteristics of the bacteria – the basis of the microbial preparation “Bioproductin”. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 3, pp. 213–223 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-3-213-223>

Введение. В качестве агентов биологического контроля особый интерес представляют собой бактерии рода *Bacillus*. Наряду с высокой антимикробной активностью в отношении широкого спектра возбудителей болезней сельскохозяйственных культур [1, 2] они характеризуются способностью к спорообразованию, что обеспечивает длительную сохранность биопрепаратов на их основе и возможность применения в широком диапазоне природных температур. Предста-

вители данного рода обладают огромным метаболическим потенциалом и способны синтезировать фитогормоны, ферменты, антибиотики и многие другие биологически активные соединения [3, 4]. Образуемые продукты метаболизма улучшают минеральное питание и ростовые характеристики растений, подавляют патогенную микрофлору, индуцируют системную устойчивость растений.

Для изучения бактерий рода *Bacillus* широко используются микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические методы [5]. В настоящее время существует возможность выявления внутривидового генетического разнообразия близкородственных бактерий с помощью различных вариантов полимеразной цепной реакции (ПЦР). Наиболее часто используемыми являются RAPD-ПЦР (амплификация с применением случайных праймеров [6]) и REP-ПЦР (амплификация консервативных повторяющихся последовательностей [7]), которые позволяют быстро и достоверно установить индивидуальные особенности бактериальных штаммов [8].

Целью настоящей работы являлась физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов бактерий, входящих в состав препарата микробного «Биопродуктин».

Объекты и методы исследования. Основными объектами исследования являлись штаммы бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *Priestia megaterium* БИМ В-1269 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д, составляющие основу микробного препарата «Биопродуктин», предназначенного для повышения биологической активности почвы, улучшения фитосанитарного состояния посевов и повышения продуктивности зерновых культур.

Глубинное культивирование исследуемых бактерий осуществляли в течение 32–36 ч в колбах Эрленмейера на качалке (180 об/мин, при температуре 30 ± 2 °С) в модифицированной питательной среде Мейнелла, содержащей раствор микроэлементов следующего состава (г/л дистиллированной воды): $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01. Раствор микроэлементов стерилизовали при 115 °С в течение 30 мин и вносили в стерильную питательную среду в объеме 20 мл/л.

Физиолого-биохимические свойства бактерий определяли, используя общепринятые методы [9].

Антагонистическую активность бактерий исследовали методом лунок [10].

Азотфиксирующую активность штаммов оценивали по способности к росту на безазотистой среде Эшби с добавлением 0,5 %-ного спиртового раствора бромтимолового синего [11]. Для количественного определения азотфиксирующей активности бактерий использовали метод, приведенный в работе [12].

Целлюлозолитическую активность исследуемых бактерий определяли спектрофотометрическим методом [13], α -амилазную – по способности катализировать гидролиз крахмала до декстринов различной молекулярной массы (ГОСТ Р 54330-2011), протеиназную – модифицированным методом Ансона (ГОСТ Р 53974-2010), эндо-1,4- β -ксилазназную активность бактерий – фотометрически [14], активность фитазы – по ГОСТ 31487-2012.

Для оценки содержания индолилуксусной кислоты (ИУК) использовали спектрофотометрический метод [15].

Производство сидерофоров определяли экспресс-методом с FeCl_3 . Для этого 0,5 мл двухсуточной культуральной жидкости (КЖ) бактерий смешивали с 0,5 мл 2 %-ного FeCl_3 и наблюдали за изменением окраски. При положительной реакции цвет жидкости приобретает оранжево- или розово-коричневый оттенок [16].

Фосфатмобилизующую активность оценивали по диаметру зоны гидролиза $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ на среде NBRiP [17], а содержание подвижных форм фосфора – по методу Чирикова (ГОСТ 26204-91).

Для определения ростстимулирующего эффекта использовали семена редиса и овса. Семена редиса сорта Рудольф в течение 2 ч замачивали в КЖ бактерий, разведенной до концентраций 2 и 5 %, а также в стерильной дистиллированной воде (контроль), после чего их промывали стерильной водой, раскладывали в чашки Петри с увлажненными бумажными фильтрами и помещали в термостат при температуре 24–25 °С. Через 3–4 сут определяли всхожесть семян, а через 10 сут – длину проростков в опытном и контрольном вариантах. Овес сорта Запавет в течение 20 мин замачивали в 2 и 5 % КЖ бактерий, промывали стерильной водой и высевали в почву. В качестве контроля использовали зерна овса, замоченные в дистиллированной воде. Через 3–4 сут

определяли всхожесть семян, а через 10 сут – сухую массу корня и стебля проростков в опытном и контрольном вариантах.

Геномную ДНК бактерий выделяли с помощью набора реактивов Bacteria DNA Preparation Kit (Jena Bioscience GmbH, Германия) согласно инструкциям фирм-изготовителей. Концентрацию и степень очистки нуклеиновых кислот определяли на спектрофотометре NanoPhotometer P-Class P 330 (Implen, Германия).

Для выявления генетической гетерогенности штаммов *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д использовали RAPD-ПЦР с праймером 1254 и REP-ПЦР с праймерами ERIC1, BOX [4, 5]. Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей реактивы производства «Праймтех» (Республика Беларусь): 0,2 ммоль/л дезоксинуклеотидтрифосфатов; 0,5 мкмоль/л праймера; *Taq*-полимеразу (1,0 ед.), АМ-буфер с MgCl₂ (1×) и 50 нг ДНК матрицы. Протокол амплификации включал в себя следующие стадии: начальную денатурацию – 5 мин при 95 °С; денатурацию – 5 мин при 94 °С, отжиг праймеров – 5 мин при 40 °С (праймеры 1254 и ERIC1) и 45 °С (праймер BOX), элонгацию – 5 мин при 72 °С (4 цикла); денатурацию – 1 мин при 94 °С, отжиг праймеров – 30 с при 48 °С (праймеры 1254 и ERIC1) и 45 °С (праймер BOX), элонгацию – 2 мин при 72 °С и заключительную элонгацию – 10 мин при 72 °С (35 циклов).

Для выявления в пределах хромосом изучаемых штаммов генов, участвующих в антимикробной и ростстимулирующей активности, были сконструированы специфичные праймеры (табл. 1). Также в работе были использованы последовательности праймеров к генам *baeB* (бациллин) – размер ПЦР-продукта 860 п. н., *dhbA* (бациллинактин) – 846, *bmyD* (бацилломицин) – 723, *dfnA* (диффицидин) – 887, *fenA* (фенгицин) – 903, *mlnA* (макролактин) – 1077, *srfAA* (сурфактин) – 1131 п. н., описанные в диссертационной работе [18]. Проверка на наличие шпилечных структур в пределах праймеров и определение температуры отжига проводились с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и онлайн-олигокалькулятора Олиго Кальк (<http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>). Для проведения ПЦР использовали реактивы фирмы «Праймтех» (Республика Беларусь). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 10 нг ДНК матрицы, 0,2 ммоль/л каждого дНТФ, 0,2 мкмоль/л каждого праймера, *Taq*-полимеразу (1,0 ед.) и АМ-буфер (1×).

Т а б л и ц а 1. Характеристика праймеров и режимы амплификации ДНК

Table 1. Characteristics of primers and modes of DNA amplification

Праймер	Последовательность (5'→3')	Режим ПЦР	Участие в синтезе метаболита (размер ПЦР-продукта)
<i>dhbC</i> -F	AGACSTTGTTCGCTTCG	95 °С – 5 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин (30 циклов); 72 °С – 10 мин (1 цикл)	Бациллинактин (1034 п. н.)
<i>dhbC</i> -R	AGGTGCTGGACGCTTACAAGC		
<i>dhbE</i> -F	CACCGGGCTATCGAAACTGA	95 °С – 5 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 47 с (30 циклов); 72 °С – 10 мин (1 цикл)	Бациллинактин (759 п. н.)
<i>dhbE</i> -R	TCTACCTCTTCAGCCGCAAC		
<i>itu A</i> -F	TGCCAGACAGTATGAGGCAG	95 °С – 5 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 53 с (30 циклов); 72 °С – 10 мин (1 цикл)	Итурин (885 п. н.) [19]
<i>itu A</i> -R	CATGCCGTATCCACTGTGAC		
<i>itu B</i> -F	TAAAGCAGCGGATAAAGCGT	72 °С – 53 с (30 циклов); 72 °С – 10 мин (1 цикл)	Итурин (874 п. н.) [20]
<i>itu B</i> -R	AATGGCGACTAACGTATCGG		
<i>itu D</i> -F	GATGCGATCTCCTTGGATGT	95 °С – 5 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 53 °С – 30 с, 72 °С – 40 с (30 циклов); 72 °С – 10 мин (1 цикл)	Итурин (647 п. н.) [21]
<i>itu D</i> -R	ATCGTCATGTGCTGCTTGAC		

Окончание табл. 1

Праймер	Последовательность (5'→3')	Режим ПЦР	Участие в синтезе метаболита (размер ПЦР-продукта)
<i>phyC-F</i>	ACGCCATTGAGATTTACG	95 °С – 5 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 46 °С – 30 с, 72 °С – 42 с (30 циклов); 72 °С – 10 мин (1 цикл)	Фитаза (697 п. о.)
<i>phyC-R</i>	GCAATTCTTTCCACG		
<i>trpA-F</i>	СТТСТGCCCTTGAAATCGGC	95 °С – 5 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 31 с (30 циклов); 72 °С – 10 мин (1 цикл)	Триптофан (509 п. о.)
<i>trpA-R</i>	TGAAATGCCAAAACCGACCG		
<i>trpB-F</i>	GGCCCCTTGAGGAAATCGAA	95 °С – 5 мин (1 цикл); 95 °С – 30 с, 54 °С – 30 с, 72 °С – 52 с (30 циклов); 72 °С – 10 мин (1 цикл)	Триптофан (862 п. о.)
<i>trpB-R</i>	CCGATCCCCGGGTAATCAAG		

Разделение продуктов амплификации осуществляли путем горизонтального электрофореза в 1,0 %-ном агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл) с использованием ТАЕ-буфера (1×), результаты документировали в системе ChemiDoc MP (BioRad, США). В качестве референсной ДНК применяли маркеры молекулярных масс ДНК GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) и 1 kb DNA Ladder («Евроген»).

Для статистической обработки данных использовали стандартные пакеты программ Excel 2016. Приведены средние значения из трех независимых экспериментов и их стандартные ошибки. Различия по сравнению с контролем считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Изучение физиолого-биохимических свойств исследуемых культур показало, что все штаммы образуют оксидазу, каталазу, активно разжижают желатин, утилизируют цитрат, малонат, гидролизуют крахмал и казеин, редуцируют нитраты до нитритов, растут на МПА в присутствии NaCl (от 2,0 до 7,0 %), но дают отрицательную реакцию на индол, сероводород, аммиак, не способны к гидролизу мочевины и к дезаминированию фенилаланина.

Три из четырех исследуемых штаммов бактерий (*B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д) проявляют антагонистическую активность в отношении широкого спектра возбудителей болезней зерновых культур [22], что обусловлено их способностью синтезировать широкий спектр антимикробных пептидов. Так, с помощью ПЦР-анализа в геномах бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д выявлен ряд генов, кодирующих синтез антимикробных пептидов: *baeB* (бациллин) – размер ПЦР-продукта 860 п. н., *dhbACE* (бациллибактин) – 846, 1034 и 759 соответственно, *bmyD* (бацилломицин) – 723, *dfnA* (диффицидин) – 887, *fenA* (фенгицин) – 903, *mInA* (макролактин) – 1077, *srfaA* (сурфактин) – 1131, *itu ABD* (итурин) – 885, 874 и 647 п. н. соответственно. В геноме бактерий *P. megaterium* БИМ В-1269 Д гены, кодирующие синтез антимикробных пептидов, не обнаружены (рис. 1), а штамм не проявлял антагонистической активности.

Ранее с помощью качественных тестов было выявлено, что штаммы *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д обладают способностью к азотфиксации [23]. Их азотфиксирующая активность, подтвержденная ацетиленовым методом, в среднем составила $52,1 \pm 0,36$ и $84,9 \pm 0,14$ нМ C_2H_4 соответственно.

Установлено, что все исследованные штаммы способны синтезировать гидролитические ферменты (протеиназу, эндо-1,4-β-глюканазу, эндо-1,4-β-ксилазу, α-амилазу, фитазу) (табл. 2).

Высокая фитазная активность штамма *P. megaterium* БИМ В-1269 Д (1,25 ед/мл) подтверждает способность культуры к фосфатмобилизации [24, 25]. Кроме того, в результате сравнительной оценки содержания подвижных форм фосфора у бактерий *P. megaterium* БИМ В-1269 Д и коллекционных штаммов – фосфатмобилизаторов *R. aquatilis* 27, *P. putida* F32, *Bacillus* sp. 20Н,

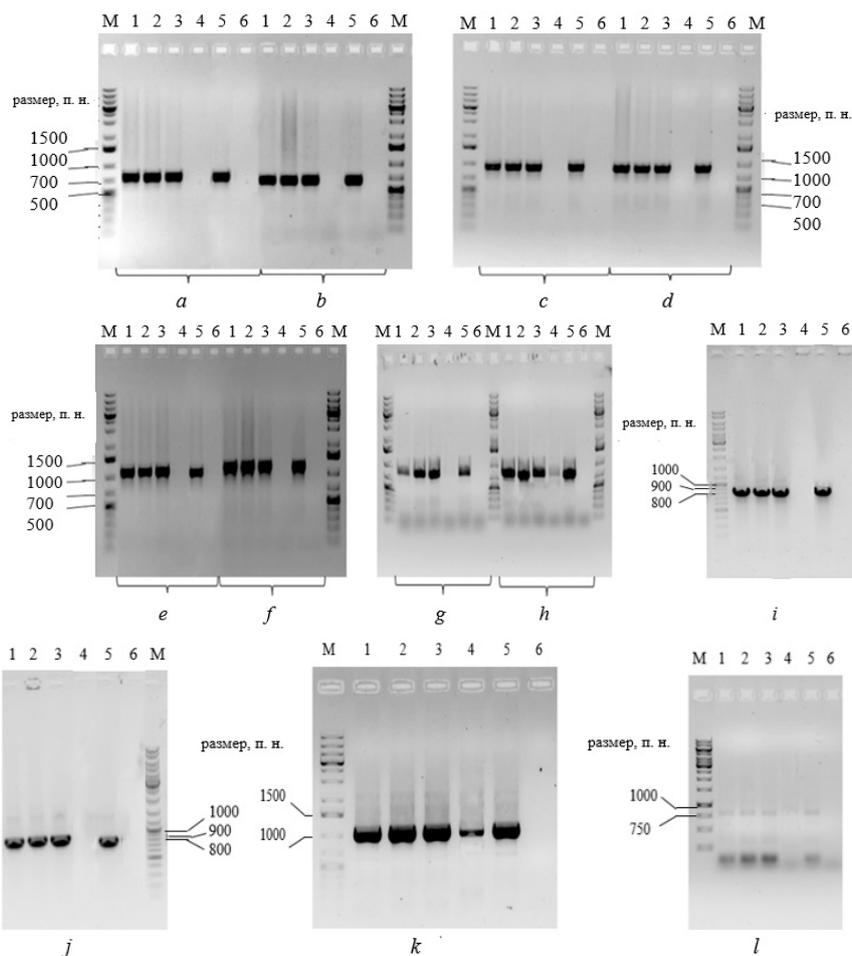


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с помощью специфических праймеров, к генам *bmyD* (a), *itu D* (b), *fenA* (c), *dfnA* (d), *mlnA* (e), *srfAA* (f), *itu A* (g), *itu B* (h), *baeB* (i), *dhbA* (j), *dhbC* (k), *dhbE* (l): М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК; 1 – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270; 2 – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д; 3 – *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д; 4 – *P. megaterium* БИМ В-1269 Д; 5 – положительный контроль (*B. velezensis* БИМ В-439Д); 6 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь без ДНК)

Fig. 1. Electrophoregram of PCR products obtained using specific primers to genes *bmyD* (a), *itu D* (b), *fenA* (c), *dfnA* (d), *mlnA* (e), *srfAA* (f), *itu A* (g), *itu B* (h), *baeB* (i), *dhbA* (j), *dhbC* (k), *dhbE* (l): M – marker of molecular weights of DNA fragments; 1 – *B. amyloliquefaciens* BIM B-1270; 2 – *B. amyloliquefaciens* BIM B-1267 D; 3 – *B. mojavensis* BIM B-1268 D; 4 – *P. megaterium* BIM B-1269 D; 5 – positive control (*B. velezensis* BIM B-439D); 6 – negative control (PCR mixture without DNA)

Т а б л и ц а 2. Ферментативная активность исследуемых бактерий, ед/мл

T a b l e 2. Enzymatic activity of the studied bacteria, units/ml

Штамм бактерий	Активность бактерий				
	протеолитическая	эндо-1,4-β-ксилазная	эндо-1,4-β-глюканазная	α-амилазная	фитазная
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-1267 Д	10,6 ± 0,72	4,4 ± 0,22	1,8 ± 0,17	0,41 ± 0,07	0,15 ± 0,07
<i>B. mojavensis</i> БИМ В-1268 Д	10,2 ± 0,53	3,7 ± 0,37	1,6 ± 0,20	0,56 ± 0,03	0,22 ± 0,04
<i>B. amyloliquefaciens</i> БИМ В-1270 Д	10,5 ± 0,81	4,2 ± 0,28	1,7 ± 0,26	0,49 ± 0,06	0,17 ± 0,02
<i>P. megaterium</i> БИМ В-1269 Д	6,2 ± 0,44	0,4 ± 0,23	0,2 ± 0,16	0,13 ± 0,03	1,25 ± 0,04

Bacillus sp. ИH установлено, что при использовании для выращивания бактерий среды NBRiP с $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ количество ионов P_2O_5 повышается в ряду *Bacillus* sp. ИH ($4,0 \text{ мг/дм}^3$) < *Bacillus* 20H ($7,1 \text{ мг/дм}^3$) < *R. aquatilis* 27 ($9,9 \text{ мг/дм}^3$) < *P. putida* F32 ($24,7 \text{ мг/дм}^3$) < *P. megaterium* БИМ В-1269 ($26,0 \text{ мг/дм}^3$), что также свидетельствует о выраженной способности *P. megaterium* БИМ В-1269 Д к фосфатмобилизации.

Исследуемые штаммы бактерий образуют сидерофоры (положительная реакция с FeCl_3) и синтезируют ИУК: штамм *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д – $10,7 \text{ мкг/мл}$, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д – $22,0$, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д – $10,2$, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д – $68,0 \text{ мкг/мл}$. Согласно классификации, предложенной в работе [26], исследуемые штаммы можно отнести к активным продуцентам ауксинов (более 10 мкг/мл). Также в геномах бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д с помощью ПЦР-анализа выявлены гены, участвующие в синтезе ИУК (*trpAB*) (рис. 2, а, б).

Следует отметить, что при использовании праймеров *phyC-F* и *phyC-R* ген *phyC*, участвующий в синтезе фермента фитазы, был обнаружен только у штаммов бактерий-антагонистов (рис. 2, в).

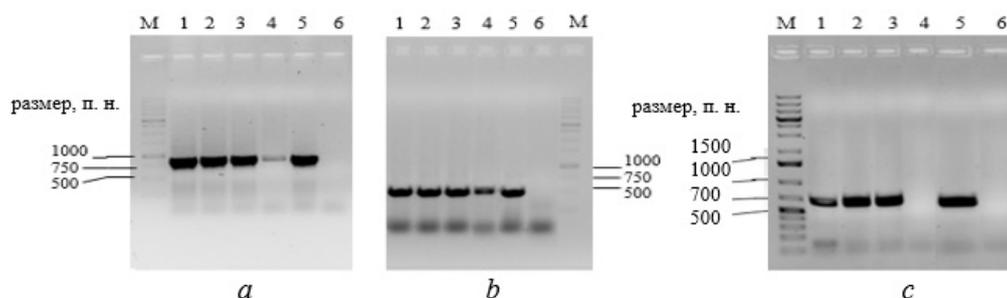


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с помощью специфичных праймеров к генам *trpB* (а), *trpA* (б), *phyC* (с): М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК; 1 – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270; 2 – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д; 3 – *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д; 4 – *P. megaterium* БИМ В-1269 Д; 5 – положительный контроль (*B. velezensis* БИМ В-439Д); 6 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь без ДНК)

Fig. 2. Electrophoregram of PCR products obtained using specific primers to genes *trpB* (а), *trpA* (б), *phyC* (с): М – marker of molecular weights of DNA fragments; 1 – *B. amyloliquefaciens* BIM В-1270; 2 – *B. amyloliquefaciens* BIM В-1267 D; 3 – *B. mojavensis* BIM В-1268 D; 4 – *P. megaterium* BIM В-1269 D; 5 – positive control (*B. velezensis* BIM В-439D); 6 – negative control (PCR mixture without DNA)

Результаты модельных опытов на семенах овса и редиса подтвердили ростстимулирующую активность исследуемых штаммов бактерий, причем наилучшие результаты были достигнуты при использовании 2,0 % КЖ. Показано, что рабочие растворы бактерий-антагонистов в концентрации 2,0 % стимулируют развитие корневой системы: на семенах редиса – на 14,8–34,5 %, на семенах овса – на 11,4–28,6 %. Наиболее высокая активность наблюдалась при использовании 2,0 % КЖ штамма *P. megaterium* БИМ В-1269 Д, где зафиксирован прирост корневой массы редиса на 82,7 %, овса – на 51,4 %.

Для выявления генетической гетерогенности и дифференциации штаммов *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д проведено их генотипирование с использованием методов RAPD-ПЦР с праймером 1254 и RER-ПЦР с праймерами ERIC1, BOX.

В результате амплификации с праймером 1254 для исследуемых бактерий получены фингерпринты, содержащие от 3 до 5 ампликонов размером 300–2500 п. н. (рис. 4, а). Идентичные профили: один фрагмент размером 750 п. н. был характерен для штаммов *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д и *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д; два фрагмента размером 450 и 1300 п. н. – для штаммов *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д и один фрагмент размером 300 п. н. – для штаммов *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д. Оставшиеся ПЦР-фингерпринты исследуемых штаммов отличались.

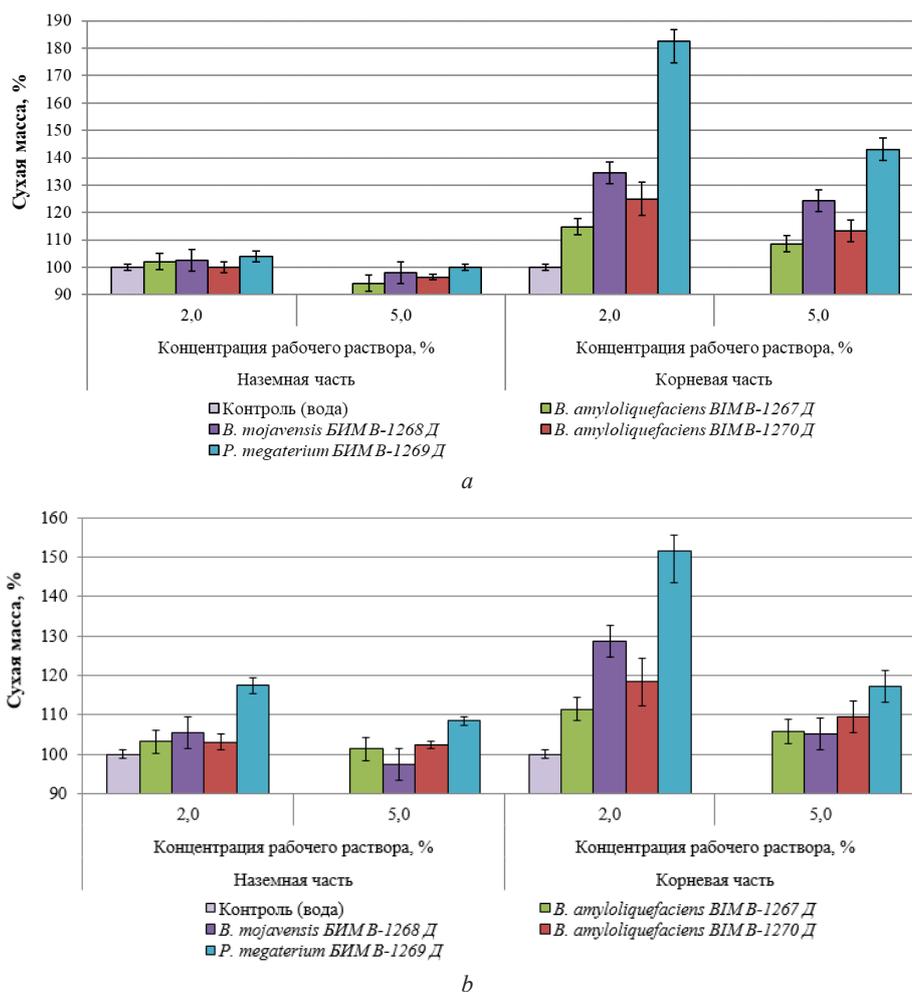


Рис. 3. Ростстимулирующая активность бактерий на семенах редиса сорта Рудольф (a) и овса сорта Запавет (b)
 Fig. 3. Growth-stimulating activity of bacteria on seeds of: a – radish (variety Rudolf); b – oats (variety Zapavet)

В результате амплификации с праймером ERIC1 для исследуемых штаммов получены фингерпринты, содержащие от 2 до 8 ампликонов размером 700–2400 п. н. (рис. 4, b). Идентичный профиль всех штаммов был схож в одном фрагменте размером 1100 п. н., а один идентичный фингерпринт размером 1400 п. н. был характерен для штаммов *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д. Остальные ПЦР-фингерпринты у штаммов отличались.

При проведении ПЦР с праймером BOX для исследуемых бацилл получены фингенрпринты, содержащие от 2 до 7 ампликонов размером 500–2200 п. н. (рис. 4, c). Профили ампликонов для штаммов *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д были схожи в двух фрагментах – размерами 700 и 1400 п. н. Кроме того, выявлены идентичные профили: один фрагмент размером 600 п. н. был характерен для штаммов *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д и *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д; четыре фрагмента размерами 800, 1000, 1600 и 2200 п. н. – для штаммов *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, фингенрпринты других размеров исследуемых штаммов отличались.

Полученные результаты свидетельствуют, что для оценки генетической гетерогенности и паспортизации бактерий рода *Bacillus* целесообразно проводить генотипирование с несколькими произвольными праймерами. В данной работе среди использованных праймеров большей разрешающей способностью для дифференциации исследуемых штаммов бацилл обладал праймер 1254.

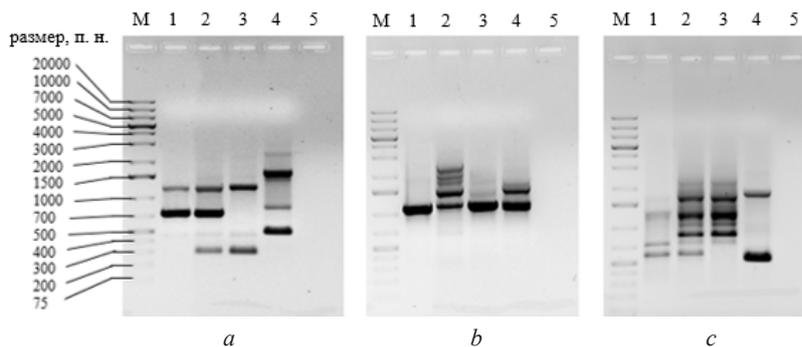


Рис. 4. Электрофореграммы профилей ампликонов, полученных методами RAPD- и REP-ПЦР для исследуемых штаммов бактерий с использованием праймеров 1254 (a), ERIC1 (b), BOX (c): М – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК; 1 – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270; 2 – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д; 3 – *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д; 4 – *P. megaterium* БИМ В-1269 Д; 5 – отрицательный контроль (ПЦР-смесь без ДНК)

Fig. 4. Electrophoregrams of amplicon profiles obtained by RAPD- and REP-PCR methods for the studied bacterial strains using primers 1254 (a), ERIC1 (b), BOX (c): M – marker of molecular weights of DNA fragments; 1 – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270; 2 – *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д; 3 – *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д; 4 – *P. megaterium* БИМ В-1269 Д; 5 – negative control (PCR mixture without DNA)

Заклучение. На основании изучения физиолого-биохимических свойств штаммов бактерий, составляющих основу микробного препарата «Биопродуктин», установлено, что исследуемые культуры обладают выраженной антимикробной, азотфиксирующей, фосфатмобилизующей и фитостимулирующей активностью и способны синтезировать ряд гидролитических ферментов (протеиназу, эндо-1,4-β-ксилазу и эндо-1,4-β-глюканазу, α-амилазу и фитазу), ИУК, образуют сидерофоры. Подтверждена генетическая гетерогенность и дифференциация изучаемых штаммов методом RAPD-ПЦР с праймером 1254 и REP-ПЦР с праймерами ERIC1, BOX. Большой разрешающей способностью для дифференциации исследуемых штаммов бацилл обладал праймер 1254. В геномах бактерий *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1267 Д, *B. mojavensis* БИМ В-1268 Д, *P. megaterium* БИМ В-1269 Д и *B. amyloliquefaciens* БИМ В-1270 Д выявлены гены, ответственные за синтез биологически активных соединений с фитозащитными (*baeB* (бациллин), *dhbACE* (бациллибактин), *bmyD* (бацилломицин), *dfnA* (диффицидин), *fenA* (фенгицин), *mlnA* (макролактин), *srfAA* (сурфактин), *itu ABD* (итурин)) и ростстимулирующими (*trpAB* (синтез ИУК) и *phyC* (фермент фитаза)) свойствами, что в совокупности определяет перспективность выделенных штаммов в растениеводстве для повышения биологической активности почвы, контроля фитопатогенных микроорганизмов и повышения продуктивности сельскохозяйственных культур.

Список использованных источников

1. Биопрепараты на основе бактерий рода *Bacillus* для управления здоровьем растений / М. В. Штерншис [и др.] – Новосибирск : Изд-во Сибир. отд-ния РАН, 2016. – 231 с.
2. Азизбекян, Р. Р. Биологические препараты для защиты сельскохозяйственных растений / Р. Р. Азизбекян // Биотехнология. – 2018. – Т. 34, № 5. – С. 37–47.
3. Genome diversity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens / X. H. Chen [et al.] // J. Biotechnol. – 2009. – Vol. 140, N 1–2. – P. 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>
4. Чеботарь, В. К. Штамм бактерий *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* bs89 в качестве средства повышения продуктивности растений и их защиты от болезней : пат. WO2017039491 A1 / В. К. Чеботарь, С. В. Ерофеев. – Опубл. 09.03.2017.
5. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42 / A. Koumoutsi [et al.] // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186, N 4. – P. 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/jb.186.4.1084-1096.2004>
6. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains / Y. H. Shangkuan [et al.] // J. Appl. Microbiol. – 2000. – Vol. 89, N 3. – P. 452–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01134.x>
7. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting / N. Акорьянц [et al.] // Nucl. Acids Res. – 1992. – Vol. 20, N 19. – P. 5137–5142. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5137>
8. Типирование бактерий с помощью ПЦР : учеб.-метод. рекомендации к практ. занятиям по курсу «Молекулярная эпидемиология» / авт.-сост. : Д. П. Бажанов. – Минск : Междунар. гос. экол. ун-т им. А. Д. Сахарова, 2004. – 16 с.

9. Методы почвенной микробиологии и биохимии : учеб. пособие / И. В. Асеева [и др.] ; под ред. Д. Г. Звягинцева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Изд-во МГУ, 1991. – 302 с.
10. Возняковская, Ю. М. Некоторые новые методы количественного учета почвенных микроорганизмов и изучения их свойств / Ю. М. Возняковская. – Ленинград : Б. и., 1982. – 53 с.
11. Widawati, S. Role of indigenous nitrogen-fixing bacteria in promoting plant growth on post tin mining soil / S. Widawati, S. Suliasih // *Makara J. Sci.* – 2019. – Vol. 2, N 1. – P. 28–38. <https://doi.org/10.7454/mss.v23i1.10801>
12. Умаров, М. М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях / М. М. Умаров // *Почвоведение.* – 1976. – № 11. – С. 119–123.
13. Soluble chromogenic substrates [Electronic resource]. – Mode of access: <https://secure.megazyme.com/enzyme-substrates/soluble-chromogenic-substrates>. – Date of access: 04.03.2022.
14. Novel substrates for the automated and manual assay of endo-1,4- β -xylanase / D. Mangan [et al.] // *Carbohydr. Res.* – 2017. – Vol. 445. – P. 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.02.009>
15. Рамезанпур, М. Р. Образование индолилуксусной кислоты местными штаммами флюоресцирующих псевдомонад, изолированных из ризосферы риса, культивируемого в северных провинциях Ирана / М. Р. Рамезанпур // *Уч. записки Ереван. гос. ун-та. Химия и биология.* – 2009. – № 2. – С. 59–64.
16. Sujatha, N. Siderophore production by the isolates of fluorescent Pseudomonads / N. Sujatha, K. Ammani // *Int. J. Curr. Res. Rev.* – 2013. – Vol. 5, N 20. – P. 1–7.
17. Jayadi, M. *In vitro* selection of rock phosphate solubility by microorganism from Ulti-sols in South Sulawesi, Indonesia / M. Jayadi, I. B. Baharuddin // *Am. J. Agricult. Forest.* – 2013. – Vol. 1, N 4. – P. 68–73. <https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20130104.14>
18. Бережная, А. В. Организация генома, физиолого-биохимические свойства и особенности глубинного культивирования бактерий *Bacillus velezensis* БИМ В-439 Д – основы биопестицида Бетапротектин : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06 / А. В. Бережная. – Минск, 2019. – 145 л.
19. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* XJ-BV2007 on growth of *Alternaria alternata* and production of tenuazonic acid / Jia Qinlan [et al.] // *Toxins.* – 2023. – Vol. 15, N 1. – Art. 53. <https://doi.org/10.3390/toxins15010053>
20. Screening of primer sets for amplification cyclic lipopeptide gene of *Bacillus* against *Banana fusarium* Wilt / Tao Deng [et al.] // *Mol. Microbiol. Res.* – 2021. – Vol. 11, N 2. – P. 1–10. <https://doi.org/10.5376/mmr.2021.11.0002>
21. Endophytic *Bacillus spp.* produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize / S. K. Gond [et al.] // *Microbiol. Res.* – 2015. – Vol. 172. – P. 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004>
22. Характеристика микробного консорциума – основы биопрепарата комплексного действия для повышения продуктивности зерновых культур / Е. Ю. Шмыга [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / НАН Беларуси, Ин-т микробиологии ; редкол. : Э. И. Коломиец (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2019. – Т. 11. – С. 333–342.*
23. Шмыга, Е. Ю. Выделение и характеристика бактерий – основы комплексного микробного препарата для защиты от болезней и повышения продуктивности зерновых культур / Е. Ю. Шмыга // *Магистерский вестник: сб. науч. работ магистрантов и аспирантов : в 3 ч. / редкол. : М. Г. Жилинский [и др.]. – Минск, 2018. – Ч. 2 : Естественные и технические науки. – С. 152–161.*
24. Identification of β -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus spp.* from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils / M. A. Jorquera [et al.] // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2011. – Vol. 75, N 1. – P. 163–172. – <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00995.x>
25. Reyes, I. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants / I. Reyes [et al.] // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 1999. – Vol. 28, N 3. – P. 281–290. – <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00583.x>
26. Образование ауксинов эндофитными бактериями подземных органов *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Scop. (Orchidaceae) / Н. В. Шеховцова [и др.] // *Вестн. Оренбург. гос. ун-та.* – 2011. – № 12 (131). – С. 366–368.

References

1. Shternshis M. V., Belyaev A. A., Tsvetkova V. P., Shpatova T. V., Lelyak A. A., Bakhvalov S. A. *Biopreparations based on bacteria of the genus Bacillus for plant health management.* Novosibirsk, Publishing House of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 2016. 231 p. (in Russian).
2. Azizbekyan R. R. Biological preparations for agricultural plants protection. *Biotechnology in Russia*, 2018, no. 5, pp. 37–47.
3. Chen X. H., Koumoutsis A., Scholz R., Schneider K., Vater J., Süßmuth R., Piel J., Borriss R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 2009, vol. 140, no. 1–2, pp. 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>
4. Chebotar' V. K., Erofeev S. V. *Bacterial strain Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum bs89 as a means of increasing plant productivity and protecting them from diseases* : pat. WO2017039491 A1. Publ. 09.03.2017 (in Russian).
5. Koumoutsis A., Chen X.-H., Henne A., Liesegang H., Hitzeroth G., Franke P., Vater J., Borriss R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 2004, vol. 186, no. 4, pp. 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/jb.186.4.1084-1096.2004>

6. Shangkuan Y. H., Yang J.-F., Lin H.-C., Shaio M.-F. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, vol. 89, no. 3, pp. 452–462. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01134.x>
7. Akopyanz N., Bukanov N. O., Westblom T. U., Kresovich S., Berg D. E. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1992, vol. 20, no. 19, pp. 5137–5142. <https://doi.org/10.1093/nar/20.19.5137>
8. Bazhanov D. P. *Typing of bacteria using PCR*. Minsk, International State Ecological University named after A. D. Sakharov, 2004. 16 p. (in Russian).
9. Aseeva I. V., Bab'eva I. P., Byzov B. A., Guzeev V. S. *Methods of soil microbiology and biochemistry. 2nd ed.* Moscow, Publishing House of Moscow State University, 1991. 302 p. (in Russian).
10. Voznyakovskaya Yu. M. *Some new methods of quantitative accounting of soil microorganisms and the study of their properties*. Leningrad, 1982. 53 p. (in Russian).
11. Widawati S., Suliasih S. Role of indigenous nitrogen-fixing bacteria in promoting plant growth on post tin mining soil. *Makara Journal of Science*, 2019, vol. 2, no. 1, pp. 28–38. <https://doi.org/10.7454/mss.v23i1.10801>
12. Umarov M. M. Acetylene method of studying nitrogen fixation in soil microbiology investigations. *Pochvovedenie [Soil science]*, 1976, no. 11, pp. 119–123 (in Russian).
13. *Soluble chromogenic substrates*. Available at: <https://secure.megazyme.com/enzyme-substrates/soluble-chromogenic-substrates> (accessed 04.03.2022).
14. Mangan D., Cornaggia C., Liadova A., McCormack N., Ivory R., McKie V. A., Ormerod A., McCleary B. V. Novel substrates for the automated and manual assay of endo-1,4- β -xylanase. *Carbohydrate Research*, 2017, vol. 445, pp. 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.02.009>
15. Ramezanpour M. R. Formation of indolylacetic acid by local strains of fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of rice cultivated in the northern provinces of Iran. *Uchenye zapiski Erevanskogo gosudarstvennogo universiteta. Khimiya i biologiya [Scientific notes of Yerevan State University. Chemistry and biology]*, 2009, no. 2, pp. 59–64 (in Russian).
16. Sujatha N., Ammani K. Siderophore production by the isolates of fluorescent *Pseudomonads*. *International Journal of Current Research and Review*, 2013, vol. 5, no. 20, pp. 1–7.
17. Jayadi M., Baharuddin I. B. *In vitro* selection of rock phosphate solubility by microorganism from Ultisols in South Sulawesi, Indonesia. *American Journal of Agriculture and Forestry*, 2013, vol. 1, no. 4, pp. 68–73. <https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20130104.14>
18. Berezhnaya A. V. *Genome organization, physiological and biochemical properties and features of deep cultivation of bacteria Bacillus velezensis BIM B-439 D – fundamentals of the biopesticide Betaprotectin. Ph. D. thesis*. Minsk, 2019. 145 p. (in Russian).
19. Qinlan J., Yingying Fan, Shuaishuai Duan, Qiaomei Qin, Yu Ding, Min Yang, Yan Wang, Fengjuan Liu, Cheng Wang Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* XJ-BV2007 on growth of *Alternaria alternata* and production of tenuazonic acid. *Toxins*, 2023, vol. 15, no. 1, art. 53. <https://doi.org/10.3390/toxins15010053>
20. Tao Deng, Lijia Guo, Laying Yang, You Zhou, Jun Wang, Zhiqiang Liu, Junsheng Huang. Screening of primer sets for amplification cyclic lipopeptide gene of *Bacillus* against *Banana fusarium* Wilt. *Molecular Microbiology Research*, 2021, vol. 11, no. 2, pp. 1–10. <https://doi.org/10.5376/mmr.2021.11.0002>
21. Gond S. K., Bergen M. S., Torres M. S., White Jr J. F. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research*, 2015, vol. 172, pp. 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004>
22. Shmyga E. Yu., Sidorenko A. V., Mandrik-Litvinkovich M. N., Kuptsov V. N., Kolomiets E. I. Characteristics of the microbial consortium – fundamentals of a complex biological product for increasing the productivity of grain crops. *Mikrobnnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty: sbornik nauchnykh trudov. Tom 11 [Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: collection of scientific works. Vol. 11]*. Minsk, 2019, pp. 333–342 (in Russian).
23. Shmyga E. Yu. Isolation and characterization of bacteria – the basis of a complex microbial preparation for protection from diseases and increasing the productivity of grain crops. *Magisterskii vestnik: sbornik rabot magistrantov i aspirantov. Chast' 2. Estestvennye i tekhnicheskie nauki [Master's Bulletin: a collection of works of undergraduates and graduate students. Pt. 2. Natural and technical sciences]*. Minsk, 2018, pp. 152–161 (in Russian).
24. Jorquera M. A., Crowley D. E., Marschner P., Greiner R., Teresa Fernández M., Romero D., Menezes-Blackburn D., de la Luz Mora M. Identification of β -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, vol. 75, no. 1, pp. 163–172. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00995.x>
25. Reyes I., Bernier L., Simard R. R., Antoun H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, vol. 28, no. 3, pp. 281–290. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00583.x>
26. Shekhovtsova N. V., Marakaev O. A., Pervushina K. A., Kholmogorov S. V., Tsaplyaeva K. G. Formation of auxins by endophytic bacteria of underground organs *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo (Orchidaceae). *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta [Bulletin of the Orenburg State University]*, 2011, no. 12 (131), pp. 366–368 (in Russian).

Информация об авторах

Шмыга Екатерина Юрьевна – науч. сотрудник. Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии» (ул. Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kozich.katyusha@mail.ru

Муратова Анна Алексеевна – ст. науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: anya.muratova.93@mail.ru

Коломиец Эмилия Ивановна – академик, д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Государственное научно-производственное объединение «Химический синтез и биотехнологии» (ул. Купревича, 2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolomiets@biotech.bas-net.by

Information about the authors

Ekatsiaryna Yu. Shmyga – Researcher. State Scientific and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology” (2, Kuprevich Str., 2220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kozich.katyusha@mail.ru

Anna A. Muratova – Senior Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 222084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: anya.muratova.93@mail.ru

Emiliya I. Kalamiyets – Academician, D. Sc. (Biol.), Professor, Chief Researcher. State Scientific and Production Association “Chemical Synthesis and Biotechnology” (2, Kuprevich Str., 2220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolomiets@biotech.bas-net.by