

Heavy metal-driven changes in the exometabolite profile of *Bacillus velezensis* S18

Short communication

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Elistratova A.A., Sharipova M.R., Khilyas I.V.*

Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, 18 Kremlyovskaya str., Kazan, 420008, Russia

ABSTRACT. Anthropogenic heavy metal contamination of aquatic ecosystems results in the toxic effects on microorganisms and the disruption of microbial community structures. To adapt to toxic stress, microorganisms employ various detoxification mechanisms, one of which is the biosynthesis of siderophores. In this study, we analyzed the changes in the exometabolite profile of the *Bacillus velezensis* S18 strain grown in the presence of different concentrations of heavy metals. It was demonstrated that salts of $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, AlCl_3 , ZnSO_4 , MnSO_4 , $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ and GaBr_3 significantly reduced the production of catecholate and hydroxamate-type siderophores, with complete inhibition observed in the presence of Ni^{2+} , Fe^{3+} , and Cu^{2+} . HPLC profiling of exometabolites was performed, and their iron-chelating activity was evaluated using the CAS assay. These findings highlight the potential application of the *B. velezensis* S18 strain in bioremediation processes and the synthesis of broad-spectrum biochelators.

Keywords: *Bacillus*, siderophores, metal-binding metabolites, heavy metals

For citation: Elistratova A.A., Sharipova M.R., Khilyas I.V. Heavy metal-driven changes in the exometabolite profile of *Bacillus velezensis* S18 // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 4. - P. 834-843. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-4-834

1. Introduction

Ubiquitous heavy metal pollution of aquatic resources, driven by high anthropogenic pressure, exerts toxic effects on microorganisms and disrupts microbial community structures. In response to prolonged exposure to metals, microorganisms have adapted by developing comprehensive detoxification mechanisms, including reduced membrane permeability (i.e. barrier function), intra- and extracellular sequestration, active ion efflux, enzymatic detoxification and decreased cellular target affinity for toxic agents (Bruins et al., 2000). One of the most important adaptive mechanisms is the biosynthesis of siderophores—molecules with a high affinity for iron (Ahmed and Holmström, 2014). Although their primary function is the chelation and transport of ferric iron, microorganisms are also capable of using siderophores to bind other metals. Siderophore biosynthesis can be induced not only by iron deficiency but also by the presence of other heavy metals that form complexes with different stability (Butler and Theisen, 2010). Siderophores reduce the toxicity of heavy metals by chelating them and facilitating their transport into microbial cells (Schalk et al.,

2011; Roskova et al., 2022).

Bacteria related to the genus *Bacillus* are widely distributed across diverse aquatic ecosystems, including rivers, lakes, seas and oceans, and play pivotal roles in maintaining microbial equilibrium and bioremediation processes (Argentino et al., 2025). Their metabolic potential, including the capacity to produce complex-forming metabolites, is actively exploited for heavy metal mobilization. The *Bacillus velezensis* species is of particular interest, as its genome contains numerous gene clusters that encode biosynthetic pathways for secondary metabolites such as polyketides (PKs) and non-ribosomal peptides (NRPs) (Prasanna et al., 2021). Siderophores are a key group of these secondary metabolites, with the bacillibactin biosynthetic cluster being the most widely distributed and prevalent among *B. velezensis* representatives (Rabbee et al., 2019).

The aim of this study is to investigate the influence of individual heavy metals on the exometabolite profile of *Bacillus velezensis* S18, with a focus on siderophore production and their iron-chelating activity. To achieve this goal, quantitative determination of siderophores, HPLC profiling, and functional analysis of metal-binding activity were performed.

*Corresponding author.

E-mail address: irina.khilyas@gmail.com (I.V. Khilyas)

Received: August 01, 2025; **Accepted:** August 15, 2025;

Available online: August 31, 2025

© Author(s) 2025. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



2. Materials and Methods

Preparation of solutions and cultivation conditions

Stock solutions of heavy metal salts ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, AlCl_3 , ZnSO_4 , MnSO_4 , $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ and GaBr_3) were prepared and sterilized by filtration through PES membrane filters (0.22 μm). These stock solutions were used to adjust the metal concentrations in M9 minimal medium (g/L: Na_2HPO_4 (6.77), KH_2PO_4 (3), NH_4Cl (1), NaCl (0.5)), pH 7.0. The final concentrations of the metals in the medium were as follows: Fe^{3+} at 10 μM ; Co^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Ga^{3+} at 20 μM ; Ni^{2+} and Zn^{2+} at 100 μM ; Mn^{2+} at 400 μM . Additionally, the M9 medium was supplemented with 0.6% casamino acids, as well as solutions of $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ and CaCl_2 at final concentrations of 246 μM and 100 μM , respectively. M9 medium supplemented with 2,2'-bipyridyl (50 μM) was used as control.

Determination of siderophore production

Cultivation of *B. velezensis* S18 was carried out at 30°C with shaking at 200 rpm for 120 h. Siderophore production was determined using the methods of Arnow (Arnow, 1937) and Atkin (Atkin et al., 1970). All experiments were performed in duplicates.

Metabolite Extraction

Metabolites were extracted from the culture liquid of *B. velezensis* S18 grown in 20 ml of M9 medium containing heavy metal salts at appropriate concentrations. The culture liquid was separated from the biomass by centrifugation at 9000 rpm for 20 min. The resulting supernatant was filtered through a 0.22 μm membrane (PES Millipore Express PLUS Stericup, Millipore, USA) and filtered through C18 cartridges (Supelco Discovery DSC-18, Supelco, USA). Metabolites were eluted with 100% methanol. Eluates were concentrated on a rotary evaporator (Concentrator Plus, Eppendorf, Germany) at a temperature not exceeding 45 °C. The dry residue was resuspended in 50% aqueous methanol for further HPLC analysis.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC analysis was performed on an UltiMate 3000 UHPLC system (Thermo Scientific Dionex, USA) using an Acclaim® PolarAdvantage II (PA2) C18 reversed-phase column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm). Gradient

elution was performed at a flow rate of 1 mL/min using (A) water with 0.01% vol. trifluoroacetic acid (TFA) and (B) acetonitrile:water (80:20, vol/vol) with 0.01% vol. THF. The gradient program was set as follows: 0-40 min, linear increase of phase B from 0% to 60% vol; 40-50 min, increase from 60% to 100% vol of phase B; 50-55 min, isocratic incubation at 100% B; 55-60 min, return to initial conditions (0% B) followed by column re-equilibration. Detection was performed using a photodiode detector (220 nm) and a fluorescence detector (470/530 nm).

Iron-binding activity of metabolites

To analyze the metal-chelating capacity of extracellular metabolites produced by *B. velezensis* S18 after 120h of cultivation under metal exposure, 5 μL aliquots of test samples were loaded into wells on chrome azurol S (CAS) agar plates (Payne, 1994). Formation of orange halos around the wells indicated iron-binding activity.

3. Results and discussion

Effect of Heavy Metals on Siderophore Production

Previous research confirmed that endolithic strain *B. velezensis* S18 is resistant to heavy metals and has the ability to secrete siderophores (Elistratova et al., 2024). The present study aims to evaluate the impact of aquatic toxicants, specifically heavy metals, on the iron-dependent bacterial metabolism of *B. velezensis* S18. The optimal metal concentrations (Fe^{3+} : 10 μM ; Co^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Ga^{3+} : 20 μM ; Ni^{2+} , Zn^{2+} : 100 μM ; Mn^{2+} : 400 μM) were determined based on literature data regarding the effects of metals on *Bacillus* siderophore activity (Gaonkar and Bhosle, 2013).

The results showed that the catechol-type siderophores produced by *B. velezensis* S18 grown in the presence of Co^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , and Ga^{3+} ranged from 4 to 16 μM , representing a 3- to 7-fold reduction compared to the metal-free control (30–54 μM ; Fig. 1A). Complete inhibition of catechol-type siderophores was observed in the presence of Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , and Cu^{2+} (Fig. 1A). The accumulation of hydroxamate-type siderophores was suppressed by ≥ 2 -fold relative to control (31–48 μM) by all heavy metals except Co^{2+} and Ga^{3+} . Siderophore biosynthesis was completely inhibited by iron, nickel and copper (Fig. 1B).

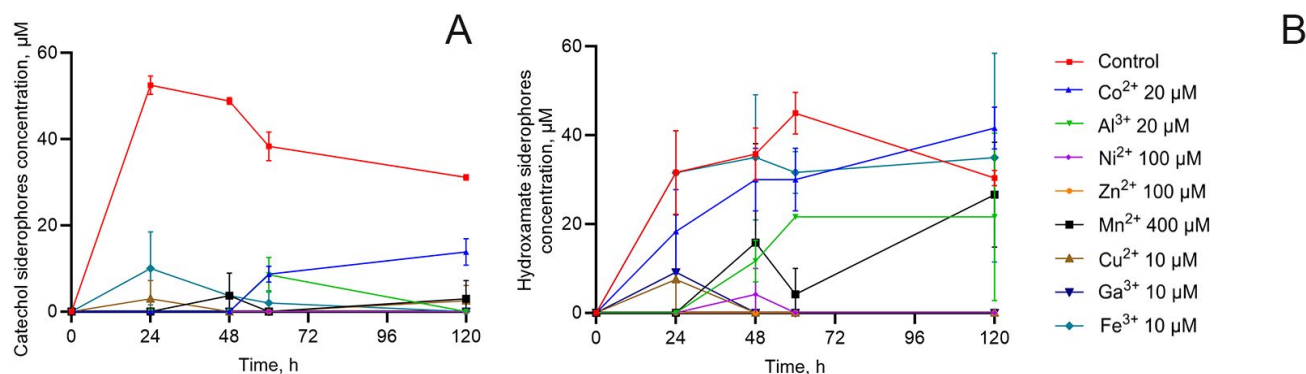


Fig.1. Production dynamics of catechol-type (A) and hydroxamate-type (B) siderophores by *Bacillus velezensis* S18 in the presence/absence of heavy metals. All experiments were performed in duplicates.

Despite the closest phylogenetic relationship between *Bacillus velezensis* and *Bacillus amyloliquefaciens*, studies have shown that the *B. amyloliquefaciens* NAR38.1 strain did not exhibit suppression of siderophore production in the presence of heavy metals in the medium (Gaonkar and Bhosle, 2013; Fan et al., 2017). *B. amyloliquefaciens* NAR38.1 demonstrated neither the capacity to inhibit siderophore accumulation in the presence of Fe^{3+} ($\leq 30 \mu\text{M}$) or Mn^{2+} ($\leq 1000 \mu\text{M}$), and there was no significant decrease in growth. However, lower concentrations of these metals completely inhibited the growth and siderophore production of the *B. velezensis* S18 strain. Furthermore, Cu^{2+} ($10 \mu\text{M}$), Zn^{2+} ($125 \mu\text{M}$), and Co^{2+} ($20 \mu\text{M}$) stimulated siderophore biosynthesis in *B. amyloliquefaciens* NAR38.1, whereas no stimulation of catecholate or hydroxamate siderophore production was observed for *B. velezensis* S18 under the same conditions. The only exception is Al^{3+} ($20 \mu\text{M}$), which exhibited the inhibitory effect on both strains.

Previous studies demonstrated that the accumulation of hydroxamate-type siderophores (schizokinin and N-desoxyschizokinin) by *B. megaterium* ATCC 19213 significantly increased in the presence of high aluminum concentrations (10 mg/L) under iron-deficient conditions (Hu and Boyer, 1996). In contrast, cultivation of *B. velezensis* S18 in aluminum-containing media resulted in reduced accumulation of both catecholate and hydroxamate siderophores. Similarly, the enhancement of hydroxamate-type siderophores production was found for *Bacillus* sp. PZ-1 (Yu et al., 2017).

The present study established that the presence of heavy metals, particularly Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Fe^{3+} , led to a reduction in siderophore production by *B. velezensis* S18. In contrast, other metals exhibited a less significant inhibitory effect, or alternatively, a stimulatory effect on biosynthesis of new metabolites. These findings are consistent with the results of Gaonkar and Bhosle (2013), which demonstrated the complex influence of similar metals on microbial siderophore systems. Significant differences in heavy metal tolerance and siderophore production are observed even between phylogenetically close *Bacillus* species such as *B. velezensis* and *B. amyloliquefaciens*. The phenotypic differences between the two closely related strains are presumably due to their isolation in significantly different ecological niches, resulting in divergent evolutionary adaptations to metal bioavailability and toxicity.

HPLC Profiling of exometabolites and metal-dependent changes

The HPLC profiling of the secondary metabolites of *B. velezensis* S18 revealed significant variability dependent on the presence of metals. In the culture fluid of strain S18 without heavy metals, nine major peaks were detected, which were absent in the medium with ferric iron (Fe^{3+}) (Fig. 2A). However, a single persistent metabolite (retention time (RT) 12.0 min) exhibited an exception to this trend, maintaining production in the presence of Ni^{2+} , Fe^{3+} , and Mn^{2+} . In the presence of CuSO_4 , strain S18 exhibited the accumulation of a distinctive metabolite at RT 14.5 min. In contrast, the presence of Co^{2+} and Zn^{2+} resulted in the induction of *de novo* synthesis of compounds at RT 37.0 and 52.0

minutes, respectively (Fig. 2A). Fluorescence detection revealed four metal-sensitive peaks in the absence of the elements Ni, Fe, Mn, and Cu (Fig. 2B). However, in the presence of these metals, the peaks completely disappeared. This observation suggests that the majority of detected exometabolites of *B. velezensis* S18 might be classified as siderophores. Furthermore, the strain S18 produces fluorescent compounds, which are likely to belong to the hydroxamate-class siderophores.

A comprehensive study on the effects of individual metals (Al, U, Mn, Fe, Cd, Cu, Co, and Ni) and their mixture on *B. cereus* strain CPT56D-587-MTF demonstrated changes in the expression levels of genes involved in the biosynthesis of the catecholate-type siderophore bacillibactin (Goff et al., 2023). Notably, only the combined exposure to heavy metals, as opposed to individual metals (e.g., Ni and Cu), led to the overregulation of bacillibactin biosynthesis genes and its transporters from the Major Facilitator Superfamily (MFS).

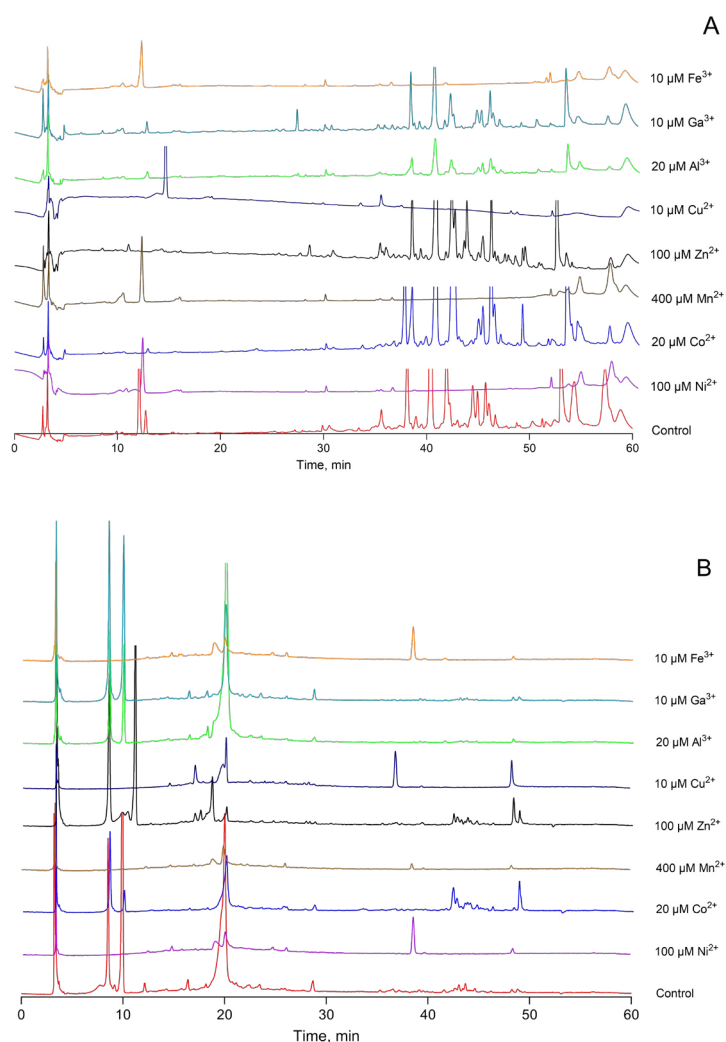


Fig.2. : Metal-induced modifications in the exometabolite profile of *B. velezensis* S18. (A) HPLC chromatograms detected at 220 nm detection and (B) fluorescence emission profile (excitation/emission 470/530 nm detection) of metabolites produced by *B. velezensis* S18 grown in the presence/absence of heavy metals. Lines correspond to the following treatments: Cu^{2+} (dark black); Zn^{2+} (black); Ni^{2+} (violet); Co^{2+} (blue); Control (red); Mn^{2+} (brown); Al^{3+} (bright green); Fe^{3+} (orange); Ga^{3+} (turquoise).

The biosynthesis of microbial siderophores is regulated by the available iron level, therefore preventing the accumulation of excess iron and the subsequent cellular damage. (Andrews et al., 2013). The inhibitory effect of Ni^{2+} and Cu^{2+} on biosynthetic enzyme systems is probably associated with their toxicity; however, in their presence, siderophore transporters exhibit up-regulation (Goff et al., 2023). Meanwhile, other metals have been observed to exert mild inhibitory effects or stimulate the synthesis of novel metal-binding metabolites. In particular, in the strain of *B. toyonensis* SFC 500-1E, up-regulation of siderophore transporters and the Fur regulator was observed in the presence of Cr(VI). (Fernandez et al., 2023).

Metal-binding activity of metabolites

In order to confirm the functional activity of the exometabolite mixtures derived from *B. velezensis* S18 culture liquid at 120 h, assays were performed on CAS agar, with halo formation being visually assessed. The control group, as well as the following compounds: $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , AlCl_3 , and GaBr_3 , demonstrated positive reactions. Growth of strain S18 in media supplemented with iron, nickel, copper, or manganese salts yielded metabolites that lacked Fe(III)-chelating activity. These results align with Arnow and Atkin assay data, confirming metal-dependent regulation of siderophore biosynthesis.

Conversely, the bacterium *B. cereus* CPT56D-587-MTF exhibits enhanced siderophore upregulation exclusively in response to combined exposure to multiple heavy metals. In contrast, *B. velezensis* S18 displays metabolic plasticity characterized by the production of metabolites with Fe(III)-binding activity when exposed to individual metals such as Co^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , and Ga^{3+} . Moreover, this strain demonstrates *de novo* biosynthesis of metal-binding compounds specifically induced by Co^{2+} and Zn^{2+} .

4. Conclusion

This study provides the first evidence that the endolithic strain *Bacillus velezensis* S18 employs a unique strategy for adaptation to heavy metals through changing its exometabolome. We identified metal-specific shifts in the exometabolome characterized by (1) suppression of metabolite production in the presence of Fe^{3+} and (2) *de novo* synthesis of compounds in Co^{2+} - and Zn^{2+} -supplemented media. Furthermore, the dependence of catechol and hydroxamate siderophore production on the presence of heavy metals in the medium was revealed. These findings suggest potential applications for *B. velezensis* S18 in bioremediation processes and the development of bio-chelators with a broad spectrum of activity.

5. Funding

This research was supported by the RSF grant (Russian Science Foundation) № 24-74-00093, <https://rscf.ru/en/project/24-74-00093/>.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Andrews S., Norton I., Salunkhe A.S. et al. 2013. Control of iron metabolism in bacteria. Metal ions in life sciences 12: 203–239. DOI: [10.1007/978-94-007-5561-1_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1_7). PMID: 23595674
- Ahmed E., Holmström S.J. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microbial Biotechnology 7(3): 196–208. DOI: [10.1111/1751-7915.12117](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117)
- Argentino I.C.V., Godoy M.G., Seldin L. 2025. Distribution of *Bacillota* in Water and Sediments from Aquatic Environments. Microbial Ecology 88(1): 3. DOI: [10.1007/s00248-024-02482-0](https://doi.org/10.1007/s00248-024-02482-0)
- Arnou L.E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalaninetyrosine mixtures. Journal of Biological Chemistry 118(2): 531–537. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)74509-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)74509-2)
- Atkin C.L., Neilands J.B., Phaff H.J. 1970. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. Journal of Bacteriology 103(3): 722–733. DOI: [10.1128/jb.103.3.722-733.1970](https://doi.org/10.1128/jb.103.3.722-733.1970)
- Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W. 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. Ecotoxicology and Environmental Safety 45(3): 198–207. DOI: [10.1006/eesa.1999.1860](https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860)
- Butler A., Theisen R.M. 2010. Iron (III)-siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. Coordination chemistry reviews 254(3-4): 288–296. DOI: [10.1016/j.ccr.2009.09.010](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.010)
- Elistratova A.A., Shirshikova T.V., Ivoilova T.M. et al. 2024. Effect of heavy metals on the production of siderophores by an endolithic strain of *Bacillus velezensis* S18. Limnology and Freshwater Biology 4: 877–880. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-877](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-877)
- Fan B., Blom J., Klenk H.P. et al. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* Species Complex. Frontiers in Microbiology 8: 22. DOI: [10.3389/fmicb.2017.00022](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022)
- Fernandez M., Callegari E.A., Paez M.D. et al. 2023. Proteomic analysis to unravel the biochemical mechanisms triggered by *Bacillus toyonensis* SFC 500-1E under chromium(VI) and phenol stress. Biometals 36: 1081–1108. DOI: [10.1007/s10534-023-00506-9](https://doi.org/10.1007/s10534-023-00506-9)
- Gaonkar T., Bhosle S. 2013. Effect of metals on a siderophore producing bacterial isolate and its implications on microbial assisted bioremediation of metal contaminated soils. Chemosphere 93(9): 1835–1843. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2013.06.036](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.036)
- Goff J.L., Chen Y., Thorgersen M.P. et al. 2023. Mixed heavy metal stress induces global iron starvation response. The ISME Journal 17(3): 382–392. DOI: [10.1038/s41396-022-01351-3](https://doi.org/10.1038/s41396-022-01351-3)
- Hu X., Boyer G.L. 1996. Siderophore-Mediated Aluminum Uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. Applied and Environmental Microbiology 62(11): 4044–4048. DOI: [10.1128/aem.62.11.4044-4048.1996](https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4044-4048.1996)
- Payne S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. Methods in Enzymology 235: 329–344. DOI: [10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)

Prasanna S., Prasannakumar M.K., Mahesh H.B. et al. 2021. Diversity and biopotential of *Bacillus velezensis* strains A6 and P42 against rice blast and bacterial blight of pomegranate. Archives of Microbiology 203: 4189-4199. DOI: [10.1007/s00203-021-02400-9](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02400-9)

Rabbee M.F., Ali M.S., Choi J. et al. 2019. *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. Molecules 24(6): 1046. DOI: [10.3390/molecules24061046](https://doi.org/10.3390/molecules24061046)

Roskova Z., Skarohlid R., McGachy L. 2022. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? Science of the Total Environment 819: 153144. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.153144](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153144)

Schalk I.J., Hannauer M., Braud A. 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. Environmental microbiology 13(11): 2844–2854. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x)

Yu S., Teng C., Bai X. et al. 2017. Optimization of Siderophore Production by *Bacillus* sp. PZ-1 and Its Potential Enhancement of Phytoextraction of Pb from Soi. Journal of Microbiology and Biotechnology 27: 1500–1512. DOI: [10.4014/jmb.1705.05021](https://doi.org/10.4014/jmb.1705.05021)

Изменение профиля экзометаболитов *Bacillus velezensis* S18 в присутствии тяжелых металлов



Елистратова А.А., Шарипова М.Р., Хиляс И.В.*

Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская, д.18, Казань, 420008, Россия

АННОТАЦИЯ. Загрязнение водных ресурсов тяжелыми металлами, обусловленное высокой антропогенной нагрузкой, оказывает токсическое влияние на микроорганизмы и структуру микробных сообществ. Для адаптации к токсическому воздействию микроорганизмы используют различные механизмы детоксикации, одним из которых является биосинтез сидерофоров. В рамках данной работы был выполнен анализ изменения профиля экзометаболитов штамма *Bacillus velezensis* S18, выращенного в присутствии разных концентраций тяжелых металлов. Было показано, что соли $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, AlCl_3 , ZnSO_4 , MnSO_4 , $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и GaBr_3 значительно снижали продукцию сидерофоров катехолинового и гидроксаматового типов, достигая полного подавления в присутствии Ni^{2+} , Fe^{3+} и Cu^{2+} . Выполнено ВЭЖХ-профилирование экзометаболитов и оценена их железо-связывающая активность методом CAS-теста. Полученные результаты открывают перспективы использования штамма *B. velezensis* S18 в биоремедиации и синтезе биохелаторов широкого спектра действия.

Ключевые слова: *Bacillus*, сидерофоры, металлсвязывающие метаболиты, тяжелые металлы

Для цитирования: Елистратова А.А., Шарипова М.Р., Хиляс И.В. Изменение профиля экзометаболитов *Bacillus velezensis* S18 в присутствии тяжелых металлов // Limnology and Freshwater Biology. 2025. - № 4. - С. 834-843. DOI: 10.31951/2658-3518-2025-A-4-834

1. Введение

Повсеместное загрязнение водных ресурсов тяжелыми металлами, обусловленное высокой антропогенной нагрузкой, оказывает токсическое влияние на микроорганизмы и структуру микробных сообществ. В ответ на длительное воздействие металлами микроорганизмы выработали комплексные механизмы детоксикации: снижение проницаемости мембран (барьерная функция), внутри- и внеклеточная секвестрация, активный выброс ионов (эффлюкс), ферментативная детоксикация и снижение сродства клеточных мишеней к токсикантам (Bruins et al., 2000). Одним из ключевых адаптивных механизмов является биосинтез сидерофоров - молекул с высокой аффинностью к железу (Ahmed and Holmström, 2014). Хотя их основная функция заключается в хелатировании и транспорте труднодоступного железа, микроорганизмы способны использовать сидерофоры для связывания других металлов. Биосинтез сидерофоров может индуцироваться не только дефицитом железа, но и присутствием других тяжелых металлов, образующих с ними комплексы различной стабильности (Butler

and Theisen, 2010). Сидерофоры уменьшают токсичность тяжелых металлов благодаря их хелатированию и транспортировке внутрь клеток (Schalk et al., 2011; Roskova et al., 2022).

Бактерии рода *Bacillus*, широко распространенные в разнообразных водных экосистемах (реки, озера, моря, океаны), играют ключевую роль в поддержании баланса микробных сообществ и процессах биоремедиации (Argentino et al., 2025). Их метаболический потенциал, включая способность продуцировать комплексообразующие метаболиты, активно используется для мобилизации тяжелых металлов. Особый интерес в этом контексте представляет вид *Bacillus velezensis*, геномы штаммов которого характеризуются наличием многочисленных кластеров генов, кодирующих биосинтез вторичных метаболитов, таких как поликетиды (ПК) и нерибосомные пептиды (НРПЦ) (Prasanna et al., 2021). Среди вторичных метаболитов сидерофоры занимают особое место, причем биосинтетический кластер бацилибактина является наиболее консервативным и широко распространенным среди представителей *B. velezensis* (Rabbee et al., 2019).

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: irina.khilyas@gmail.com (И.В. Хиляс)

Поступила: 01 августа 2025; Принята: 15 августа 2025;
Опубликована online: 31 августа 2025

© Автор(ы) 2025. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



Целью данного исследования является изучение влияния отдельных тяжелых металлов на профиль экзометаболитов *Bacillus velezensis* S18, с акцентом на продукцию сидерофоров и их железо-связывающую активность. Для достижения цели проведено количественное определение сидерофоров, ВЭЖХ-профилирование и функциональный анализ металлсвязывающей активности.

2. Материалы и методы

Подготовка растворов и условия культивирования

Стоковые растворы солей тяжелых металлов ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, AlCl_3 , ZnSO_4 , MnSO_4 , $\text{NiSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ и GaBr_3) готовили и стерилизовали фильтрацией через мембранные PES фильтры (0.22 мкм). Растворы вносили в минимальную среду M9 (состав, г/л: Na_2HPO_4 (6.77), KH_2PO_4 (3), NH_4Cl (1), NaCl (0.5)), pH 7.0. Конечные концентрации солей тяжелых металлов в среде M9: Fe^{3+} (10 мкМ); Co^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Ga^{3+} (20 мкМ); Ni^{2+} и Zn^{2+} (100 мкМ); Mn^{2+} (400 мкМ). В среду M9 дополнительно вносили казаминовые кислоты (6 г/л), а также растворы $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и CaCl_2 до конечных концентраций 246 мкМ и 100 мкМ, соответственно. В качестве контроля использовали среду M9 с добавлением 2,2'-бипиридила (50 мкМ). Культивирование *Bacillus velezensis* S18 проводили при 30 °C, 200 об/мин, 120 часов.

Определение продукции сидерофоров

Определение продукции сидерофоров выполняли с использованием методик Арноу (Arnow, 1937) и Аткина (Atkin et al., 1970). Все эксперименты были выполнены в двух биологических повторностях.

Экстракция метаболитов

Экстракцию метаболитов проводили из культуральной жидкости *B. velezensis* S18, выращенной в 20 мл среды M9, содержащей соли тяжелых металлов в соответствующих концентрациях. Культуральную жидкость отделяли от биомассы центрифугированием при 9000 об/мин в течение 20 мин. Полученный супернатант фильтровали через мембрану 0.22 мкм (PES Millipore Express PLUS Stericup, Millipore, США) и пропускали через C18 картриджи (Supelco Discovery DSC-18, Supelco, США). Метаболиты элюировали 100% метанолом. Элюаты концентрировали на ротормном испарителе (Concentrator Plus, Eppendorf, Германия) при температуре не выше 45 °C. Сухой остаток ресуспендировали в 50% водном метаноле для последующего анализа методом ВЭЖХ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

ВЭЖХ-анализ выполняли на системе UltiMate 3000 UHPLC (Thermo Scientific Dionex, США) с использованием обращенно-фазовой колонки Acclaim® PolarAdvantage II (PA2) C18 (250 × 4.6 мм, 5 мкм). Градиентное элюирование осуществляли со скоростью потока 1 мл/мин, применяя в качестве подвижных фаз: (А) воду с 0.01% об. трифторуксусной кислотой (ТФУ) и (В) ацетонитрил:вода (80:20,

об./об.) с 0.01% об. ТФУ. Градиентную программу задавали следующим образом: 0-40 мин - линейное увеличение фазы В с 0% до 60% об.; 40-50 мин - рост с 60% до 100% об. фазы В; 50-55 мин - изократическое выдерживание при 100% В; 55-60 мин - возврат к начальным условиям (0% В) с последующей реэвilibрацией колонки. Детектирование проводили с помощью фотодиодного детектора (220 нм) и флуоресцентного детектора (470/530 нм).

Железо-связывающая активность метаболитов

Для анализа металлсвязывающей способности внеклеточных метаболитов, полученных после 120ч культивирования штамма *B. velezensis* S18 в присутствии металлов, в чашки Петри с CAS-агаром, содержащим краситель хром азурол S, вносили в лунки по 5 мкл исследуемого образца (Payne, 1994). Образование оранжевых зон вокруг лунок свидетельствовало о железосвязывающей активности.

3. Результаты и обсуждение

Влияние тяжелых металлов на продукцию сидерофоров

Предыдущее исследование подтвердило, что эндолитный штамм *B. velezensis* S18 устойчив к тяжелым металлам и обладает способностью продуцировать сидерофоры (Elistratova et al., 2024). Цель настоящего исследования - оценить влияние водных токсикантов, в частности тяжелых металлов, на железо-зависимый бактериальный метаболизм *B. velezensis* S18. Диапазон концентраций металлов (Fe^{3+} : 10 мкМ; Co^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Ga^{3+} : 20 мкМ; Ni^{2+} , Zn^{2+} : 100 мкМ; Mn^{2+} : 400 мкМ) выбран на основе данных, приведённых в литературных источниках о влиянии металлов на сидерофорную активность бактерий рода *Bacillus* (Gaonkar and Bhosle, 2013).

Результаты показали, что концентрация сидерофоров катехолового типа, продуцируемых *B. velezensis* S18 в присутствии солей Co^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} и Ga^{3+} варьировала в диапазоне 4-16 мкМ, что в 3-7 раз ниже контрольного уровня (30-54 мкМ) в среде без металлов (Рис. 1А). Полное ингибирование биосинтеза сидерофоров катехолового типа наблюдалось в присутствии Mn^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} и Cu^{2+} (Рис. 1А). Аналогично, присутствие всех тяжёлых металлов в среде, кроме Co^{2+} и Ga^{3+} ингибировало накопление сидерофоров гидроксаматового типа штаммом *B. velezensis* S18 как минимум в 2 раза по сравнению с контролем (31-48 мкМ). Железо, никель и медь полностью ингибировали биосинтез сидерофоров (Рис. 1Б).

Несмотря на филогенетическую близость *B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens*, исследования показывают, что у штамма *B. amyloliquefaciens* NAR38.1 не наблюдалось подавления продукции сидерофоров в присутствии тяжелых металлов в среде (Gaonkar and Bhosle, 2013; Fan et al., 2017). *B. amyloliquefaciens* NAR38.1 не продемонстрировал снижения продукции сидерофоров в присутствии Fe^{3+} (≤ 30 мкМ) или Mn^{2+} (≤ 1000 мкМ) или значительного угнетения роста. Однако более низкие концентрации металлов полностью ингибировали рост и продук-

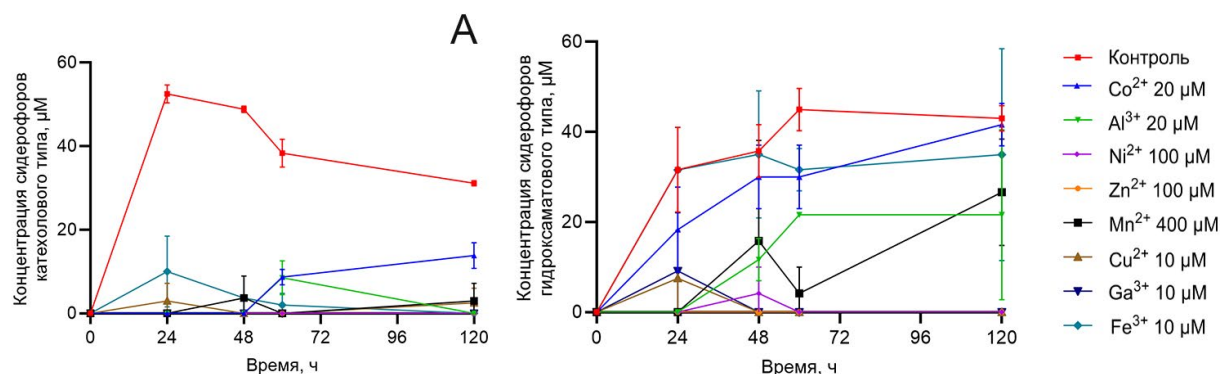


Рис.1. Динамика продукции сидерофоров катехолового (А) и гидроксаматового (Б) типов штаммом *B. velezensis* S18 в присутствии/отсутствии тяжелых металлов. Все эксперименты были выполнены в двух биологических повторностях.

цию сидерофоров штамма *B. velezensis* S18. Кроме того, Cu^{2+} (10 μM), Zn^{2+} (125 μM) и Co^{2+} (20 μM) стимулировали биосинтез сидерофоров штаммом *B. amyloliquefaciens* NAR38.1, тогда как стимуляции продукции сидерофоров катехолового и гидроксаматового типа штаммом *B. velezensis* S18 в присутствии тех же металлов не происходило. Исключение составляет наличие в среде Al^{3+} (20 μM), оказывающего ингибирующее действие на оба штамма.

Более ранние исследования показали, что накопление сидерофоров гидроксаматового типа (шизокинина и N-дезокшизокинина) штаммом *B. megaterium* ATCC 19213 значительно увеличивается в присутствии высоких концентраций алюминия (10 мг/л) в условиях дефицита железа (Hu and Boyer, 1996). В отличие от этого, культивирование штамма *B. velezensis* S18 в среде с алюминием приводило к снижению накопления как катехолового, так и гидроксаматового типов сидерофоров. Аналогично, стимулирующее влияние соли свинца на накопления сидерофоров гидроксаматового типа было показано штаммом *Bacillus* sp. PZ-1 (Yu et al., 2017).

Таким образом, в нашем исследовании установлено, что тяжелые металлы Ni^{2+} , Cu^{2+} и Fe^{3+} подавляют продукцию сидерофоров *B. velezensis* S18, в то время как другие металлы оказывают менее выраженное ингибирующее действие или стимулируют биосинтез новых метаболитов. Полученные данные согласуются с исследованиями Gaonkar and Bhosle (2013), в которых подобные металлы проявляют комплексное влияние на микробные системы сидерофоров. Даже между филогенетически близкими видами *Bacillus* (*B. velezensis* и *B. amyloliquefaciens*) наблюдаются значительные отличия влияния тяжелых металлов в металлоустойчивости и продукции сидерофоров. Вероятно, фенотипические различия между штаммами объясняются выделением из отличающихся экологических ниш, обуславливающими различия в эволюционной адаптации к биодоступности и токсичности металлов.

ВЭЖХ-профилирование экзометаболитов и металл-зависимые изменения

В представленной работе было проведено профилирование вторичных метаболитов методом ВЭЖХ и выявлена выраженная металл-зависимая вариабельность экзометаболизма *B. velezensis* S18. В

культуральной жидкости штамма S18 без тяжелых металлов были задетектированы 9 мажорных пиков, которые отсутствовали в среде с трехвалентным железом (Рис. 2А). Исключение составил устойчивый метаболит (время удерживания (RT) 12.0 мин, чья продукция сохранялась также в присутствии Ni^{2+} , Fe^{3+} и Mn^{2+} . В присутствии CuSO_4 штамм S18 накапливал единственный метаболит с RT 14.5 мин, тогда как Co^{2+} и Zn^{2+} стимулировали *de novo* синтез соединений с RT 37.0 мин и 52.0 мин, соответственно (Рис. 2А). Флуоресцентное детектирование выявило четыре металл-чувствительных пика в контроле, полностью исчезавших в присутствии Ni, Fe, Mn и Cu (Рис. 2Б). Таким образом, полученные данные указывают, что большинство задетектированных экзометаболитов штамма *B. velezensis* S18 потенциально могут быть отнесены к сидерофорам. Кроме того, штамм продуцирует флуоресцирующие соединения, вероятно, относящиеся к гидроксаматному классу сидерофоров.

Всестороннее исследование влияния отдельных металлов (Al, U, Mn, Fe, Cd, Cu, Co и Ni) и их смеси на штамм *Bacillus cereus* str. CPT56D-587-MTF продемонстрировало изменения в уровне экспрессии генов биосинтеза сидерофора катехолового типа – бациллибактина (Goff et al., 2023). Стоит отметить, что только комплексное воздействие тяжелых металлов, в отличие от отдельных (например, Ni и Cu), приводило к сверхрегуляции бациллибактина и его транспортеров из суперсемейства MFC (Major Facilitator Superfamily).

Регуляция биосинтеза микробных сидерофоров осуществляется уровнем железа, что предотвращает его избыточное накопление и связанные с этим клеточные повреждения (Andrews et al., 2013). Вероятно, ингибирующее воздействие Ni^{2+} и Cu^{2+} на ферментные системы биосинтеза, связано с их токсичностью, однако в их присутствии наблюдается сверхрегуляция сидерофорных транспортеров (Goff et al., 2023). В тоже время другие металлы могут оказывать слабое ингибирующее действие или стимулировать синтез новых металл-связывающих метаболитов. В частности, в штамме *B. toyonensis* SFC 500-1E наблюдалась сверхрегуляция сидерофорных транспортеров и регулятора Fur в присутствии Cr(VI) (Fernandez et al., 2023).

Металл-связывающая активность метаболитов

Для подтверждения функциональной активности смеси экзометаболитов, полученных из 120ч культуральной жидкости *B. velezensis* S18, проверяли на CAS-агаре и визуально оценивали образование зон просветления. Положительные реакции зафиксированы для контроля, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , AlCl_3 и GaBr_3 . Наличие в среде роста штамма S18 солей железа, никеля, меди и марганца приводило к формированию экзометаболитов, не обладающих Fe (III)-связывающей активностью. Полученные результаты согласуются с количественными тестами Арноу и Аткина, подтверждая металл-зависимую регуляцию биосинтеза сидерофоров.

В отличие от штамма *B. cereus* str. CPT56D-587-MTF, у которого сверхрегуляция сидерофора активируется исключительно при смешанном воздействии тяжелыми металлами, *B. velezensis* S18 демонстрирует метаболическую пластичность, реализуемую через продукцию метаболитов, обладающих Fe(III)-связывающей активностью, в присутствии отдельных металлов (Co^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} и Ga^{3+}) и биосинтез *de novo* металл-связывающих соединений под воздействием Co^{2+} и Zn^{2+} .

4. Заключение

В работе впервые было продемонстрировано, что эндолитный штамм *B. velezensis* S18 реализует уникальную стратегию адаптации к тяжелым металлам по средствам изменения экзометаболического профиля. Было выявлено металл-специфичное изменение экзометаболизма путем подавления продукции метаболитов в присутствии Fe^{3+} и *de novo* биосинтез соединений в среде, содержащей соли Co^{2+} и Zn^{2+} . Кроме того, была выявлена зависимость продукции сидерофоров катехолинового и гидроксаматового типов от присутствия тяжелых металлов в среде. Установленные закономерности открывают новые возможности для применения штамма *B. velezensis* S18 в процессах биоремедиации и получения биохелаторов широкого спектра действия.

Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-74-00093, <https://rscf.ru/project/24-74-00093/>.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Andrews S., Norton I., Salunkhe A.S. et al. 2013. Control of iron metabolism in bacteria. Metal ions in life sciences 12: 203–239. DOI: [10.1007/978-94-007-5561-1_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-5561-1_7). PMID: 23595674

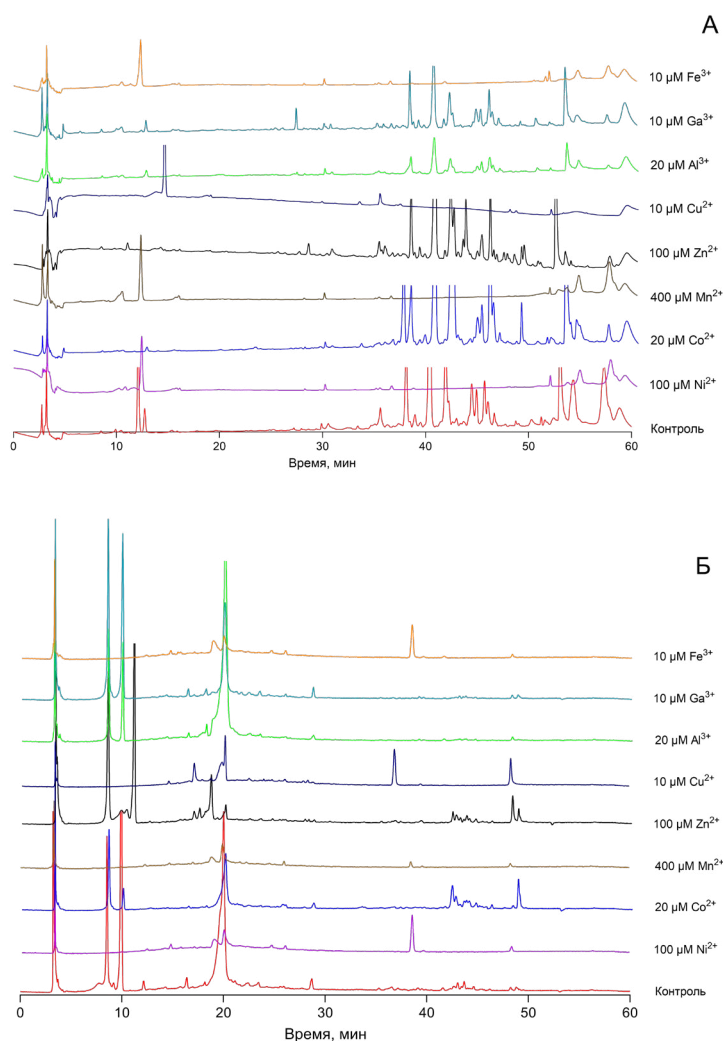


Рис.2. Металл-индуцированные изменения профиля экзометаболитов *B. velezensis* S18. (А) ВЭЖХ хроматограммы при длине волны 220 нм и (Б) флуоресцентные спектры (возбуждение/эмиссия 470/530 нм) метаболитов из культуральной жидкости *B. velezensis* S18. Линии соответствуют следующим условиям: Cu^{2+} (темно-синяя); Zn^{2+} (черная); Ni^{2+} (фиолетовая); Co^{2+} (синяя); контроль (красная); Mn^{2+} (коричневая); Al^{3+} (ярко-зеленая); Fe^{3+} (оранжевая); Ga^{3+} (бирюзовая).

Ahmed E., Holmström S.J. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. Microbial Biotechnology 7(3): 196–208. DOI: [10.1111/1751-7915.12117](https://doi.org/10.1111/1751-7915.12117)

Argentino I.C.V., Godoy M.G., Seldin L. 2025. Distribution of *Bacillota* in Water and Sediments from Aquatic Environments. Microbial Ecology 88(1): 3. DOI: [10.1007/s00248-024-02482-0](https://doi.org/10.1007/s00248-024-02482-0)

Arnow L.E. 1937. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalaninetyrosine mixtures. Journal of Biological Chemistry 118(2): 531–537. DOI: [10.1016/S0021-9258\(18\)74509-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)74509-2)

Atkin C.L., Neilands J.B., Phaff H.J. 1970. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus*, and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum*. Journal of Bacteriology 103(3): 722–733. DOI: [10.1128/jb.103.3.722-733.1970](https://doi.org/10.1128/jb.103.3.722-733.1970)

Bruins M.R., Kapil S., Oehme F.W. 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45(3): 198–207. DOI: [10.1006/eesa.1999.1860](https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1860)

Butler A., Theisen R.M. 2010. Iron (III)–siderophore coordination chemistry: Reactivity of marine siderophores. *Coordination chemistry reviews* 254(3-4): 288–296. DOI: [10.1016/j.ccr.2009.09.010](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.010)

Elistratova A.A., Shirshikova T.V., Ivoilova T.M. et al. 2024. Effect of heavy metals on the production of siderophores by an endolithic strain of *Bacillus velezensis* S18. *Limnology and Freshwater Biology* 4: 877–880. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-877](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-877)

Fan B., Blom J., Klenk H.P. et al. 2017. *Bacillus amylo-liquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* Form an “Operational Group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* Species Complex. *Frontiers in Microbiology* 8: 22. DOI: [10.3389/fmicb.2017.00022](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00022)

Fernandez M., Callegari E.A., Paez M.D. et al. 2023. Proteomic analysis to unravel the biochemical mechanisms triggered by *Bacillus toyonensis* SFC 500-1E under chromium(VI) and phenol stress. *Biometals* 36: 1081–1108. DOI: [10.1007/s10534-023-00506-9](https://doi.org/10.1007/s10534-023-00506-9)

Gaonkar T., Bhosle S. 2013. Effect of metals on a siderophore producing bacterial isolate and its implications on microbial assisted bioremediation of metal contaminated soils. *Chemosphere* 93(9): 1835–1843. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2013.06.036](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.036)

Goff J.L., Chen Y., Thorgersen M.P. et al. 2023. Mixed heavy metal stress induces global iron starvation response. *The ISME Journal* 17(3): 382–392. DOI: [10.1038/s41396-022-01351-3](https://doi.org/10.1038/s41396-022-01351-3)

Hu X., Boyer G.L. 1996. Siderophore-Mediated Aluminum Uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *Applied and Environmental Microbiology* 62(11): 4044–4048. DOI: [10.1128/aem.62.11.4044-4048.1996](https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4044-4048.1996)

Payne S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology* 235: 329–344. DOI: [10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)

Prasanna S., Prasannakumar M.K., Mahesh H.B. et al. 2021. Diversity and biopotential of *Bacillus velezensis* strains A6 and P42 against rice blast and bacterial blight of pomegranate. *Archives of Microbiology* 203: 4189–4199. DOI: [10.1007/s00203-021-02400-9](https://doi.org/10.1007/s00203-021-02400-9)

Rabbee M.F., Ali M.S., Choi J. et al. 2019. *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules* 24(6): 1046. DOI: [10.3390/molecules24061046](https://doi.org/10.3390/molecules24061046)

Roskova Z., Skarohlid R., McGachy L. 2022. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? *Science of the Total Environment* 819: 153144. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.153144](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153144)

Schalk I.J., Hannauer M., Braud A. 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental microbiology* 13(11): 2844–2854. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x)

Yu S., Teng C., Bai X. et al. 2017. Optimization of Siderophore Production by *Bacillus* sp. PZ-1 and Its Potential Enhancement of Phytoextraction of Pb from Soi. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 1500–1512. DOI: [10.4014/jmb.1705.05021](https://doi.org/10.4014/jmb.1705.05021)