Сорбционные и хроматографические процессы. 2026. Т. 26, № 2. С. 411-417.
Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2026. Vol. 26, No 2. pp. 411-417.

ISSN 1680-0613

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья
УДК 543.544.5.068.7
doi: 10.17308/sorpchrom.2026.26/14189

Изучение влияния бактерий *Bacillus subtilis* на продукцию микотоксина зеараленона грибом *Fusarium oxysporum* по данным ВЭЖХ

Алина Сергеевна Завалюева[1,2], Мария Юрьевна Русинова[1], Михаил Юрьевич Сыромятников[1,2]✉

[1]Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия, mihan.vrn@mail.ru✉

[2]Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Аннотация. Микотоксины являются вторичными метаболитами микроскопических грибов и способны накапливаться в растительных культурах в процессе их выращивания, а также при нарушении условий хранения. Эти соединения оказывают негативное влияние на здоровье человека и животных вследствие возможного их содержания в продуктах питания и кормах. С связи с этим необходимо контролировать накопление микотоксинов в растительном сырье. В настоящее время одним из таких подходов является использование бактерий, способных продуцировать вещества с высокой антигрибковой активностью. В качестве микотоксина в настоящей работе выбран зеараленон как один из наиболее распространенных веществ. Цель настоящей работы – хроматографическое определение зеараленона в культуральной жидкости с пробоподготовкой методом QuEChERS для изучения возможности снижения продуцирования токсичных соединений (на примере указанного микотоксина) грибом *Fusarium oxysporum* бактериями *Bacillus subtilis*.

Проводилось глубинное культивирование культур *Fusarium oxysporum* и *Bacillus subtilis* совместно, в жидкой питательной среде сусло-бульон в соотношении 1:1. Пробоподготовку культуральной жидкости осуществляли методом QuEChERS (быстро, просто, дешево, эффективно, надежно и безопасно), который включает жидкость-жидкостную экстракцию между водной фазой, содержащей безводный сульфат магния и хлорид натрия, и ацетонитрильным слоем. Второй этап состоял в дополнительной очистке пробы на силикагеле. Определение зеараленона проводили методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием. Степень извлечения зеараленона из модельных растворов достигла 88±3%, линейность аналитического сигнала наблюдалась при концентрациях аналита 5-50 мкг/см^3, предел обнаружения и предел определения составили 0.8 и 2.5 мкг/дм^3, соответственно.

Анализ культуральной жидкости *Fusarium oxysporum* показал, что содержание ЗОН составляет 4.6± 1.2 мкг/дм^3. В присутствии бактерий *Bacillus subtilis* содержание аналита в культуральной жидкости находится ниже предела определения, что подтверждает способность рассматриваемых бактерий снижать продуцирование токсичных соединений.

Ключевые слова: микотоксины, зеараленон, *Fusarium oxysporum*, *Bacillus subtilis*.

Благодарности: исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект FZGW-2024-0003).

Для цитирования: Завалюева А.С., Русинова М.Ю., Сыромятников М.Ю. Изучение влияния бактерий *Bacillus subtilis* на продукцию микотоксина зеараленона грибом *Fusarium oxysporum* по данным ВЭЖХ // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2026. Т. 26, № 2. С. 411-417. https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2026.26/14189

Original article

Study of the effect of *Bacillus subtilis* bacteria on the production of the mycotoxin zearalenone by the fungus *Fusarium oxysporum* according to HPLC data

Alina S. Zavalyueva[1], Maria Yu. Rusinova[1], Mikhail Yu. Syromyatnikov[1,2]✉

[1]Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, mihan.vrn@mail.ru✉

[2]Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

© Завалюева А. С., Русинова М. Ю., Сыромятников М. Ю., 2026

Сорбционные и хроматографические процессы. 2026. Т. 26, № 2. С. 411-417.
Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy. 2026. Vol. 26, No 2. pp. 411-417.

ISSN 1680-0613

Abstract. Mycotoxins are secondary metabolites of microscopic fungi that can accumulate in plant crops during their cultivation, as well as in case of violation of storage conditions. These compounds have a negative impact on human and animal health due to their possible content in food and feed. In this regard, it is necessary to control the accumulation of mycotoxins in plant materials. Currently, one of such approaches is the use of bacteria capable of producing substances with high antifungal activity. Zearalenone was chosen as a mycotoxin in this study as one of the most common substances. The purpose of this research is the chromatographic determination of zearalenone in culture fluid with sample preparation using the QuEChERS method to study the possibility of reducing the production of toxic compounds (using the example of the specified mycotoxin) by the fungus *Fusarium oxysporum* and gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*.

Deep cultivation of *Fusarium oxysporum* and *Bacillus subtilis* cultures was carried out together in a liquid nutrient medium of wort-broth in a ratio of 1:1. Sample preparation of the culture fluid was carried out by the QuEChERS method (fast, simple, cheap, efficient, reliable and safe), which includes liquid-liquid extraction between an aqueous phase containing anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride and an acetonitrile layer. The second stage consisted of additional sample purification on silica gel. Zearalenone was determined by HPLC with fluorescence detection. The degree of zearalenone extraction from model solutions reached 88±3%, the linearity of the analytical signal was observed at concentrations of 5-50 μg/ml, the detection limit and the determination limit were 0.8 and 2.5 μg/l, respectively.

Analysis of the *Fusarium oxysporum* culture fluid showed that the ZON content was 4.6±1.2 μg/l. In the presence of *Bacillus subtilis* bacteria, the zearalenone content in the culture fluid was below the detection limit, which confirms the ability of the bacteria in question to reduce the production of toxic compounds.

Keywords: mycotoxins, zearalenone, *Fusarium oxysporum*, *Bacillus subtilis*.

Acknowledgments: the study was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (project FZGW-2024-0003).

For citation: Zavalyueva A.S., Rusinova M.Yu., Syromyatnikov M.Yu. Study of the effect of *Bacillus subtilis* bacteria on the production of the mycotoxin zearalenone by the fungus *Fusarium oxysporum* according to HPLC data. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2026. 26(2): 411-417. (In Russ.). https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2026.26/14189

Введение

Микотоксины являются вторичными метаболитами грибов рода *Fusarium*, *Aspergillus* и *Penicillium* [1]. Грибные патогены оказывают негативное влияние на здоровье человека и животных, а также снижают урожайность растительных культур. Одним из наиболее часто встречающихся микотоксинов является зеараленон (ЗОН, рис. 1), который за счет структурного сходства с эстрогенами оказывает негативное влияние на репродуктивную систему животных и человека. ЗОН накапливается преимущественно в зерновых культурах в процессе их созревания и при нарушении условий хранения.

Одним из продуцентов ЗОН является *Fusarium oxysporum*. Преимущественно указанный гриб продуцирует образование фумонизинов. Однако вследствие сложных многостадийных превращений могут образовываться и другие микотоксины, в том числе зеараленон [2]. Актуальной задачей является ингибирование и предотвращение синтеза высокотоксичных соединений [3]. В настоящее время одним из наиболее безопасных подходов является биологический контроль. По сравнению с химическими фунгицидами, биопестициды способны эффективно подавлять рост возбудителей болезней, не вызывая резистентности [4]. Бактерии обладают механизмами биодеградации и

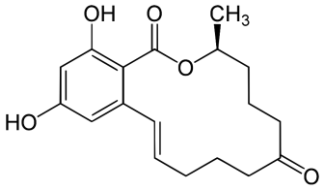

Рис. 1. Структурная формула зеараленона.
Fig. 1. The structural formula of zearalenone.

биосорбции, с помощью которых и удаляют микотоксины.

Bacillus subtilis – аэробные грамположительные почвенные бактерии [5]. *Bacillus subtilis* продуцируют различные метаболиты, в том числе липопептиды (например, итурин, сурфактин и фенгицин), обладающие высокой активностью против фитопатогенов [6].

В литературе преимущественно рассмотрено влияние различных родов бактерий на токсинопродуцирование грибом *Fusarium graminearum* [4, 7], поражающем зерновые культуры. В меньшей степени изучено снижение патогенности *Fusarium oxysporum*, оказывающего негативное влияние на другие растительные культуры [8].

Вследствие малого содержания микотоксинов в объектах анализа, требуется совершенствование методов их определения в сложных матрицах. Наиболее часто для определения зеараленона используется высокоэффективная жидкостная хроматография с флуориметрическим детектированием [9]. Очистка пробы перед анализом обычно проводится на иммуноаффинных колонках [9]. В качестве альтернативного метода пробоподготовки можно рассматривать жидкость-жидкостную экстракцию с последующим извлечением примесных компонентов сорбентом (метод QuEChERS – быстро, просто, дешево, эффективно, надежно и безопасно) [10]. При этом отсутствуют работы по применению указанного варианта пробоподготовки для анализа культуральной жидкости.

Цель работы состояла в хроматографическом определении зеараленона в культуральной жидкости с пробоподготовкой методом QuEChERS для изучения возможности снижения продуцирования токсичных соединений (на примере указанного микотоксина) грибом *Fusarium oxysporum* бактериями *Bacillus subtilis*.

Экспериментальная часть

В работе использовали зеараленон (аналитический стандарт Эврика, Россия), ацетонитрил квалификации х.ч., хлороформ ч.д.а, муравьиную кислоту ч., безводный сульфат магния и хлорид натрия ч.д.а., безводный сульфат натрия х.ч., таблица 1.

Получение биомассы *Fusarium oxysporum* и культуральной жидкости. Для проведения исследования применялись чистые культуры патогенных грибов, поражающих корневую систему, стебли, листья, плоды сельскохозяйственных растений: *Fusarium oxysporum*. Культуры были ранее выделены из листьев сельскохозяйственных растений. В качестве микроорганизмов для детоксикации микотоксинов использовались чистые культуры бактерий *Bacillus subtilis,* изолированные из почвы.

Проводилось глубинное культивирование культур *Fusarium oxysporum* и *Bacillus subtilis* совместно, в жидкой питательной среде сусло-бульон в соотношении 1:1. Питательная среда стерилизовалась в автоклаве при 121°С в течении 15 мин. В стерильных условиях в фалькон на 50 см^3 с питательной средой объёмом 30 см^3 вносили бактериологической петлей культуры *Fusarium oxysporum* и *Bacillus subtilis*. Концентрации внесенных культур составляли 10^9 КОЕ/г, внесенное количество каждой из культур составило 500 мкг. Культивирование проводили в шейкер-инкубаторе Senova BS-

Таблица 1. Некоторые физико-химические свойства зеараленона*
Table 1. Some physico-chemical properties of zearalenone

Систематическое название	M, г/моль	logP	pK_a
(3S,11E)-14,16-дигидрокси-3-метил-3,4,5,6,9,10-гексагидро-1H-2-бензоксациклотетрадецин-1,7(8H)-дион	318.4	4.37	8.54 10.38

*Рассчитаны с использованием программного обеспечения Marvin Sketch (ChemAxon).

3021 (Senova Biotech, Китай) в течении 3 суток при температуре 30°С и скорости вращения 200 об/мин. После завершения инкубации полученную биомассу профильтровали через стерильные бумажные фильтры.

Параллельно проводили глубинное культивирование контрольных образцов культур *Fusarium oxysporum* и *Bacillus subtilis* с концентрацией внесенной культуры 10^9 КОЕ/г и количеством культуры 500 мкг, в тех же условиях с последующим отделением биомассы от культуральной жидкости методом фильтрации на бумажных фильтрах.

Пробоподготовка. Определение зеараленона в биомассе *Fusarium oxysporum* проводили по методике, основанной на ГОСТ 31691-2012 [11], установленной для анализа зерна и продуктов его переработки. Пробу массой 5.0 г заливали 30 $см^3$ хлороформа, добавляли 3 г безводного сульфата натрия. Оставляли на 30 минут для экстракции. Фильтровали полученный экстракт через бумажный фильтр марки «красная лента». Выпаривали хлороформ на роторном испарителе ИР-1ЛТ Labdex до сухого остатка. Сухой остаток растворяли в 1.00 $см^3$ ацетонитрила, анализировали методом ВЭЖХ после центрифугирования.

Определение зеараленона в культуральной жидкости проводили с пробоподготовкой методом QuEChERS [10]. 10.0 $см^3$ пробы помещали в пробирку Эппендорфа емкостью 25 $см^3$, содержащую 4.0 г безводного сульфата магния и 1.0 г хлорида натрия. Приливали 10.0 $см^3$ ацетонитрила, перемешивали полученную смесь в течение 20 с на вихревом смесителе. Центрифугировали полученную смесь, отбирали ацетонитрильный слой, упаривали до сухого остатка, который растворяли в 0.50 $см^3$ ацетонитрила для получения хроматограммы.

Условия хроматографического определения. Исследование состава проб проводили в условиях обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с флуоресцентным детектированием на хроматографе Маэстро ВЭЖХ (Россия) с использованием колонки Kromasil 100-3,5-C18, 4,6×150 мм. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила и воды в объемном соотношении 50:50. Температура термостата 30°С, скорость потока подвижной фазы 1 $см^3$/мин. Длина волны возбуждения флуоресценции – 270 нм, длина волны регистрации флуоресценции – 460 нм.

Обсуждение результатов

Первый этап работы состоял в определении ЗОН в биомассе гриба *Fusarium oxysporum*. На рисунке 2 приведена хроматограмма ацетонитрильного экстракта биомассы. Можно отметить, что в растворе присутствует множество соединений, способных к флуоресценции. Содержание зеараленененона в биомассе *Fusarium oxysporum* составило 10 мкг/кг. В задачи работы не входило количественное определение, поэтому очистка экстракта от мешающих определению примесей для улучшения метрологических характеристик не проводилась. Таким образом, установлено, что в условиях выращивания биомассы продуцируется зеараленон.

Следующий этап работы состоял в изучении ингибирования продуцирования токсичных веществ *Fusarium oxysporum* в присутствии бактерий *Bacillus subtilis*. Культуральная жидкость представляет собой многокомпонентный водный раствор, содержащий микрочастицы биомассы гриба, бактерии и другие компоненты. Для определения ЗОН необходим выбор варианта пробоподготовки. В работах [9, 12] очистку проб зерновых культур для определения микотоксинов проводили в варианте QuEChERS (от Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe – быстро, просто, дешево, эффективно, надежно и безопасно), который

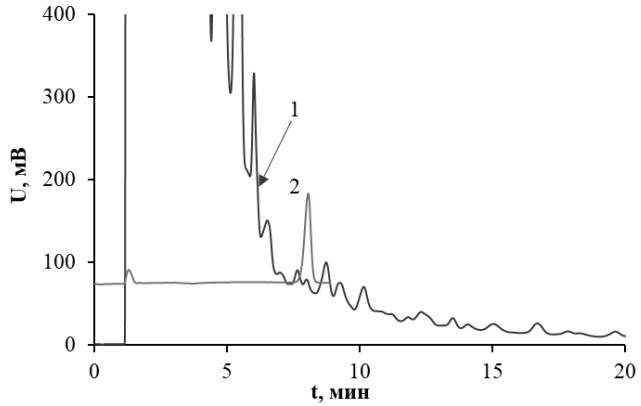

Рис. 2. Хроматограммы экстракта *Fusarium oxysporum* (1) и стандартного образца зеараленона (2, с=1.0 мкг/см^3).
Fig. 2. Chromatograms of *Fusarium oxysporum* extract (1) and standard zearalenone sample (2, c=1.0 micrograms/cm^3).

Таблица 2. Аналитические характеристики определения зеараленона с пробоподготовкой QuEChERS
Table 2. Analytical characteristics of zearalenone determination with QuEChERS sample preparation

t_R, мин	Уравнение регрессии	R^2	Диапазон линейности, мкг/дм^3	c_{min}, мкг/дм^3	c_{lim}, мкг/дм^3	s_r	Степень извлечения R, %
7.56	18.82*x*-3.76	0.9956	5-50	0.8	2.5	0.06	88±3

представляет собой жидкость-жидкостную экстракцию компонентов анализируемого раствора при распределении между органической фазой (обычно используется ацетонитрил) и водной, в которой остаются мешающие определению целевых веществ примеси [10]. Растворимость зеараленона в воде существенно ниже по сравнению с ацетонитрилом [13], что позволяет проводить очистку пробы с минимальными потерями аналита. В таблице 2 приведены аналитические характеристики методики определения ЗОН в модельных растворах с пробоподготовкой QuEChERS. Степень извлечения целевого компонента из водных растворов составила 88±3%. Диапазон линейности аналитического сигнала составил 5-50 мкг/дм^3. Предел обнаружения и предел определения – 0.8 и 2.5 мкг/дм^3, соответственно.

Удовлетворительные аналитические характеристики определения зеараленона в водных растворах позволили провести его определение в полученных культуральных жидкостях. Анализ хроматограмм культуральных жидкостей показал, что присутствие *Bacillus subtilis* снижает продуцирование зеараленона. Содержание целевого вещества в культуральной жидкости *Fusarium oxysporum* составило 4.6±1.2 мкг/дм^3. В присутствии *Bacillus subtilis* содержание ЗОН составляет 1.2±0.8 мкг/дм^3 (рис. 3, таблица 3), что находится ниже предела определения.

Снижение содержания зеараленона в культуральной жидкости при совместном культивировании *Fusarium oxysporum* с *Bacillus subtilis* может быть связано с несколькими, потенциально одновременно действующими механизмами. Известен выраженный антагонизм бактерий рода *Bacillus* в отношении фитопатогенных

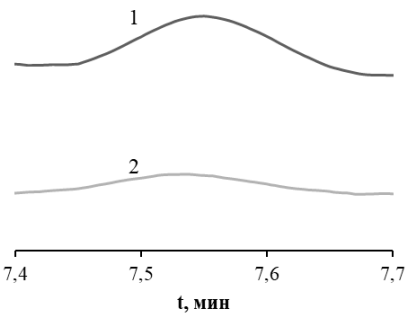

Рис. 3. Фрагмент хроматограмм культуральной жидкости *Fusarium oxysporum* (1) и *Fusarium oxysporum* в присутствии *Bacillus subtilis* (2).
Fig. 3. Fragment of chromatograms of *Fusarium oxysporum* culture fluid (1) and *Fusarium oxysporum* in the presence of *Bacillus subtilis* (2).

Таблица 3. Результаты определения ЗОН в культуральной жидкости
Table 3. Results of determination of ZON in culture fluid

Компоненты КЖ	*Fusarium oxysporum* + *Bacillus subtilis*	*Fusarium oxysporum*
с, мкг/дм^3	1.2±0.8	4.6±1.2

грибов, обусловленный продукцией противогрибковых вторичных метаболитов, включая циклические липопептиды, которые нарушают целостность мембран грибов, подавляют их рост и изменяют метаболическую активность [14, 15]. В таком случае снижение концентрации зеараленона в среде может быть следствием уменьшения биомассы гриба и подавления путей вторичного метаболизма, отвечающих за биосинтез микотоксинов.

Помимо влияния на рост продуцента, для ряда бактерий показана способность снижать концентрации микотоксинов за счёт биотрансформации или биодеградации. Для зеараленона продемонстрированы микробные пути детоксикации, включая превращение в менее активные соединения, что рассматривается как перспективный подход биодетоксикации [16]. Также описаны бактерии (в т.ч. представители рода *Bacillus*), способные снижать уровень микотоксинов в модельных системах, при этом эффективность и набор продуктов трансформации зависят от штамма и условий культивирования [17].

Заключение

В работе показана возможность определения зеараленона в культуральной жидкости после пробоподготовки в варианте QuEChERS методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием (c_{min}=2.5 мкг/дм^3). Это позволило оценить способность бактерий *Bacillus subtilis* ингибировать образование токсичных веществ на примере исследуемого микотоксина патогенным грибом *Fusarium oxysporum*. Концентрация зеараленона в культуральной жидкости составила 4.6±1.2 мкг/дм^3, в то время как в присутствии бактерий по данным ВЭЖХ содержание ЗОН находится ниже предела определения. Дальнейшие исследования планируется направить на оптимизацию условий пробоподготовки для улучшения метрологических характеристик определения микотоксинов, что позволит расширить круг бактерий при рассмотрении их влияния на токсинопродуцирование грибами.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет из-

вестных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

Список литературы/References

1. Loi M., Fanelli F., Liuzzi V. *Toxins.* 2017; 9(4): 111.
2. Ropejko K., Twarużek M. *Toxins.* 2021; 13(1): 35.
3. Han X., Huangfu B., Xu T. *Toxins.* 2022; 14(6): 386.
4. Allaxverdyan V.V., Sidorova T.M., Temerdashev A.Z. *Yug Rossii: e`kologiya, razvi-tie*. 2023; 18(4): 104-113. (In Russ.)
5. Iqbal S., Begum F., Rabaan A.A. *Molecules.* 2023; 28(3): 927.
6. Kaspar F., Neubauer P., Gimpel M. *Journal of Natural Products*. 2019; 82(7): 2038-2053.
7. Shi C., Yan P., Li J. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2014; 11(1): 1094-1105.
8. Hari A., Lahlali R., Ortaakarsu A.B. *Journal of Natural Pesticide Research*. 2024; 10: 100096.
9. Amelin V.G., Karaseva N.M., Tret`yakov A.V. *Zhurnal analiticheskoj ximii*. 2013: 68(1): 64-70. (In Russ.)
10. Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F *Journal of AOAC International*, 2003; 86(2): 412–431, https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412
11. GOST 31691-2012.Zerno i produkty` ego pererabotki, kombikorma. Opredelenie soderzha-niya zearalenona metodom vy`sokoe`ffektivnoj zhidkostnoj xromatografii.(In Russ.)
12. Sadighara P., Basaran B., Afshar A., Nazmara S. *Microchemical Journal.* 2024; 197: 109711.
13. Chang H., Kim W., Park J.-H. *Toxins*. 2017; 9(7): 223.
14. Romero D., Vicente A. de, Rakotoaly R.H. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2007; 20(4): 430-440.
15. Ongena M., Jacques P. *Trends in Microbiology.* 2008; 16(3): 115-125.
16. Wang N., Wu W., Pan J., Long M. *Microorganisms*. 2019; 7(7): 208.
17. Haque M.A. *Microbial Pathogenesis.* 2020; 142: 104095.

Информация об авторах / Information about the authors

А.С. Завалюева– младший научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия, e-mail: a-kh-01@yandex.ru

М.Ю. Русинова– Техник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж, Россия, e-mail: rusinova.vsuet.206@yandex.ru

М.Ю. Сыромятников– Ведущий научный сотрудник лаборатории метагеномики и пищевых биотехнологий, Воронежский государственный университет инженерных технологий, Воронеж. Доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии ВГУ, Воронеж, Россия, e-mail: mihan.vrn@mail.ru

A.S. Zavalyueva – Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: a-kh-01@yandex.ru

M.Yu. Rusinova– Junior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russian Federation, e-mail: rusinova.vsuet.206@yandex.ru

M.Yu. Syromyatnikov – Leading Researcher, Laboratory of Metagenomics and Food Biotechnology, Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh. Associate Professor of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, e-mail: mihan.vrn@mail.ru

Статья поступила в редакцию 20.07.2025; одобрена после рецензирования 19.11.2025; принята к публикации 26.11.2025.
The article was submitted 20.07.2025; approved after reviewing 19.11.2025; accepted for publication 26.11.2025.