

МРНТИ: 31.27.19, 31.27.22

А.В. ЧИЖАЕВА¹, М.Б. АЛИМЖАНОВА¹, Қ. АШИМУЛЫ¹, А.К. САДАНОВ¹,
А.Ж. АЛЫБАЕВА^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2}, А.А. АМАНГЕЛДІ^{1,2}, М.Е. ЕЛУБАЕВА¹

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: aigul_alybaeva@mail.ru

СПЕКТР ЛЕТУЧИХ СОЕДИНЕНИЙ ПРОБИОТИЧЕСКОГО КОНСОРЦИУМА ДЛЯ РЫБ В АКВАКУЛЬТУРЕ

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.08

Аннотация

Летучие органические соединения представляют интерес во многих областях. Среди них анализ продуктов питания и ароматизаторов, исследования окружающей среды и атмосферы, промышленное применение, безопасность или медицина и наука о жизни. Характеристика этих соединений в основном выполнялась путем сбора образцов и анализа за пределами предприятия с помощью газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией в качестве золотого стандарта. С целью определения химической природы метаболитов консорциума антагонистически активных микроорганизмов *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20 и *Propionibacterium freudenreichii* P-8 был исследован спектр летучих соединений консорциума с применением газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Обнаружены метаболиты, обладающие антибактериальной и противогрибковой активностью – органические кислоты, ароматические кислоты (префеновая кислота, гидроксифениллактат, пирролидонкарбоновая кислота и полимолочная кислота), уксусная кислота и другие летучие вещества, а именно диацетил, ацетоин и др.

Ключевые слова: летучие органические соединения, метаболиты, газовая хроматография, масс-спектрометрия.

В настоящее время разработка и использование пробиотических продуктов в аквакультуре нужно для поддержания здоровья и благополучия многих аквакультурных животных. Пробиотические бактерии нетоксичны, их можно использовать в качестве добавки для роста и развития рыб, а также в качестве альтернативного источника антибиотиков для улучшения использования корма, повышения стрессоустойчивости, иммунитета и устойчивости к болезням, а также для улучшения качества воды.

Большинство бактерий живут в активных сообществах и производят большое разнообразие вторичных метаболитов. Эти метаболиты служат сигналами, потенциально участвующими в конкуренции, что позволяет микроорганизмам адаптироваться к различным стрессам [1,2]. Выделяемые бактериями молекулы с низкой молекулярной массой (<300 Да) и высоким давлением паров (0,01 кПа при 20°C) могут легко испаряться и проникать через гетерогенные смеси жидкостей, газов и твердых веществ [3]. На сегодняшний день известны более 1000 бактериальных летучих соединений, но это может быть грубой недооценкой разнообразия летучих органических и неорганических соединений, продуцируемых бактериями [4,5]. Обнаружение и количественная оценка летучих органических соединений (ЛОС), как привлекательных или отталкивающих запахов и ароматов, представляет большой интерес для пищевых и косметических биопроцессов. ЛОС также способствуют способности бактерий взаимодействовать с их собственной средой [6].

Обнаружение ЛОС микробного происхождения является альтернативным подходом, который потенциально может стать надежным, быстрым и относительно недорогим методом дифференциации и идентификации микроорганизмов. Различные аналитические

методы позволяют обнаруживать и идентифицировать летучие органические соединения [7]. Растет объем знаний о наличии и составе летучих метаболитов, выделяемых бактериями и другими микробами [8]. В современном мире для обнаружения ЛОС используют спектрометрические методы.

В настоящее время метаболические пути бактерий подробно исследуются [9]. В основном, появление ЛОС должно быть связано с известным метаболическим путем. Однако на производство бактериями ЛОС влияют условия их роста [10]. Наши знания о путях бактериального метаболизма и, следовательно, производства ЛОС в различных условиях в организме человека все еще очень ограничены.

Газовая хроматография в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) является золотым стандартом обнаружения ЛОС [7]. ГХ-МС обладает большими базами данных для идентификации веществ и возможностью разделения и однозначной идентификации соединений. Полученные результаты в области определения бактериальных ЛОС с помощью ГХ-МС показали его применимость для этой цели. Однако химическая идентификация неизвестных ЛОС невозможна [11].

Материалы и методы

Определение содержания летучих соединений консорциума молочнокислых и пропионовокислых бактерий проводили методом твердофазной микроэкстракции (SPME) и последующей газовой хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС). Для проведения SPME 10 мл культуральной жидкости консорциума помещали в 20-мл виалу с завинчивающейся крышкой (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, США) и выдерживали при 30°C в течение 30 минут для достижения равновесного состояния. Летучие вещества в свободном пространстве адсорбировали на волокне SPME, покрытом 85-мм карбоксемом/полидиметилсилоксаном (CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, США).

Газохроматографический анализ проводили с использованием газового хроматографа 7890, соединенного с 5977A MSD масс-спектрометр (Agilent, Санта-Клара, США). Использовали колонку DBWAXetr (30 м×0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм, J&W Scientific Inc., Фолсом, Калифорния, США), а подвижной фазой (газом-носителем) был гелий (>99,995%, Оренбург-Техгаз, Россия) со скоростью потока 1,0 мл/мин. Объем инъекции составлял 0,5 мкл при соотношении компонентов 10:1, а задержка растворителя составляла 1,5 мин. Температура печи GC была увеличена с начальной температуры 40°C до 200°C при скорости 10 °C/мин. Температуры инжектора и передаточной линии были 250 и 280°C, соответственно. Выполнено обнаружение МС при 70 эВ с диапазоном масс сканирования m/z 34-550 а.е.м. Для управления прибором и обработки результатов использовалась Agilent MSD ChemStation (версия 1701EA). Обработка данных включала определение времени удерживания, площадей пиков, а также идентификацию пиков с использованием их масс-спектров. Масс-спектры идентифицированы с использованием библиотек Wiley 7-е издание и NIST'02. Анализ культуральных супернатантов проводили в трех экземплярах. Пустые эксперименты проводились в трех различных режимах: заготовка волокна, заготовка пустого флакона и заготовка питательной среды без бактерий (MPC бульон (TM Media, Индия)). Калибровка для определения содержания уксусной кислоты в молоке была построена в диапазоне от 2 мг/мл до 50 мг/мл. Коэффициент корреляции составил 0,93. В качестве холостого образца использовали жидкую среду MPC.

Все результаты были средними из трех независимых экспериментов с тремя параллельными повторениями (n=9). Для оценки результатов использовались стандартные статистические методы в Excel (Microsoft® Office 2010) с использованием критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование спектра летучих соединений проводили у двух вариантов консорциума: 1 образец (S1) – консорциум только молочнокислых бактерий *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20; 2 образец (S2) - консорциум молочнокислых и пропионовокислых

бактерий *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20 и *Propionibacterium freudenreichii* P-8. Определение содержания летучих соединений у консорциумов бактерий проводили методом твердофазной микроэкстракции (SPME) и последующей газовой хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ–МС).

Результаты качественного и количественного определения летучих соединений показали наличие 22 противомикробных соединений в обоих вариантах консорциумов (таблица 1), среди которых обнаружены органических кислоты и их ангидриды, хинолины, насыщенные коротко- и среднецепочечные жирные кислоты, жирные спирты, эфиры, кетоны, алканы и каротиноиды. При этом учитывались все соединения с вероятностью идентификации выше 60%. Контрольный образец (среда MPC) содержал: диоксид углерода; 1,4:3,6-диангидро- α -D-глюкопиранозу; гептиловый эфир бензойной кислоты и гексадекановую кислоту.

Таблица 1 – Спектр летучих соединений, образуемых консорциумами отобранных бактерий, обладающих антибактериальными и антифунгальными свойствами

Летучие соединения, %		Время удерживания, с	Вероятность идентификации, %	Образец (консорциум), %	
Сокращенное название	Химическое название			S1 МКБ	S2 МКБ+ПКБ
1	2	3	4	5	6
FA	Уксусная кислота, ангидрид с муравьиной кислотой (формацетат)	1,75	81	71,17±2,15	65,08±0,04
DHIMBM	3,4-дигидроизохинолин, 1-[3-метоксибензил]-6-метокси-	6,55	71	6,59±0,15	6,8±0,19
PA	Пропановая кислота	11,20	78	nd	1,86±0,03
PAM	Пропановая кислота, 2-метил-	11,47	82	nd	1,97±0,09
DHIBM	3,4-Дигидроизохинолин-7, 1-бензил-6-метокси-	11,88	61	0,70±0,03	nd
BA	Бутановая кислота	12,23	76	nd	1,61±0,05
BAM	Бутановая кислота, 3-метил-	12,44	81	nd	1,68±0,05
NN	2-нонанон	13,72	68	0,64±0,04	0,7±0,06
MNE	Метилловый нониловый эфир	18,83	70	0,98±0,15	1,1±0,11
UDN	2-ундеканол	19,18	70	1,34±0,04	0,7±0,04
PDN	Пентадекан	22,53	66	nd	0,3±0,01
CDN	Циклодеканол	24,33	73	nd	3,9±0,03
TDN	2-тридеканон	24,64	82	1,30±0,08	1,1±0,09
CPDN	Циклопентадеканон	29,19	70	1,67±0,05	1,0±0,07
TDNA	Тетрадекановая кислота	30,97	66	1,40±0,10	1,2±0,09
PDNA	Пентадекановая кислота	33,03	62	1,61±0,07	nd
PhAHIBE	Фталевая кислота, гепт-4-ил изобутиловый эфир	34,89	72	nd	0,5±0,02
HDNA	Гексадекановая кислота	35,02	90	8,36±0,12	7,6±0,11

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6
PhABMHE	Фталевая кислота, 6-метилгепт-2-ил бутиловый эфир	37,00	78	0,62±0,02	nd
PhABTE	Фталевая кислота, тридец-2-ин-1-ил бутиловый эфир	37,01	68	nd	0,7±0,03
ODNA	Октадекановая кислота	38,79	74	2,23±0,06	1,2±0,05
SQ	Сквален	48,80	72	1,40±0,03	1,0±0,04

Большинство летучих соединений, 19 из 22-х, продуцирует созданный нами консорциум молочнокислых и пропионовокислых бактерий (образец S2), немногим меньше, 14 из 22-х соединений образует консорциум, состоящий только из молочнокислых бактерий (образец S1) (рисунок 1).

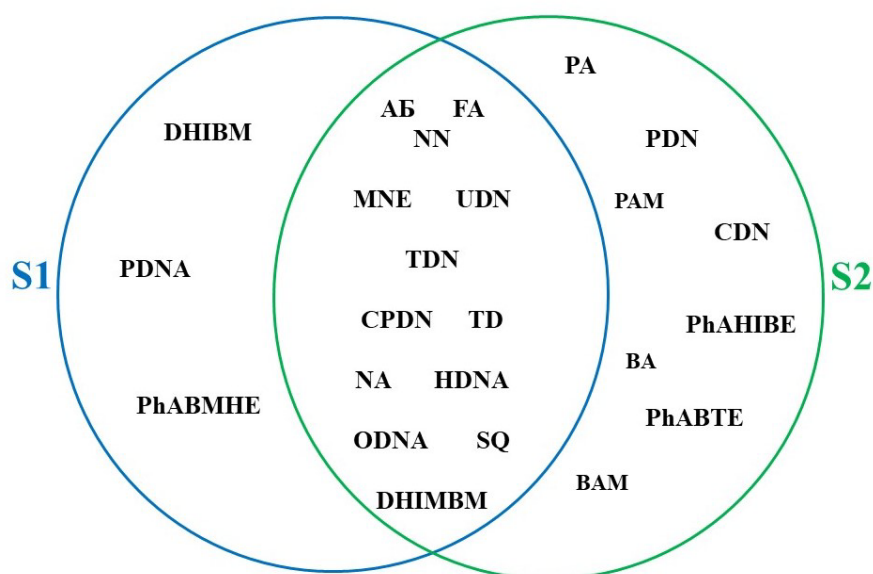


Рисунок 1 – Содержание летучих веществ в образцах консорциумов S1 и S2. Аббревиатуру соединений см. в таблице 1

Обнаруженные летучие соединения присутствовали либо в значительных, либо в умеренных, либо в низких концентрациях, как показано на рисунке 2, соответственно.

Три наиболее распространенных соединения – смешанный ангидрид уксусной и муравьиной кислот; хинолин (2,3-бензопиридин) и пальмитиновая (рисунок 2) в образце S1 составили в сумме 86,12%, а в образце S2 – 79,48% от общего количества всех обнаруженных противомикробных летучих соединений.

Их количество варьировало в зависимости от штаммового состава исследуемого консорциума и колебалось от 65,08% до 72,2 % для уксусной кислоты (acetic acid, anhydride with formic acid); от 6,59 до 6,8% - для хинолина 3,4-Dihydroisoquinoline, 1-[3-methoxybenzyl]-6-methoxy-; от 7,6 до 8,36% - для среднецепочечной гексадекановой кислоты (рисунок 2А). Тринадцать других органических летучих соединений присутствовали в промежуточных умеренных количествах и составляли 1,0–3,9% от общего количества противомикробных соединений (рисунок 2В). Наконец, 6 соединений из групп алканов, кетонов и эфиров присутствовали в более низких концентрациях (рисунок 2С).

В целом, как показано на рисунке 2, среднецепочечные жирные насыщенные кислоты содержались в более высоких концентрациях в культуральной жидкости консорциума S1, состоящем только из молочнокислых бактерий (МКБ). При этом, пентадекановая кислота

была обнаружена только в образце S1 (1,61%). А вот короткоцепочечные жирные кислоты – пропионовая кислота или пропионат (1,8%), изомасляная кислота (1,97%), масляная кислота или бутират (1,61%), изовалериановая кислота (1,68%), присутствовали только в образце S2 (консорциум МКБ и пропионовокислых бактерий). Содержание жирных спиртов также различалось в зависимости от рассматриваемого консорциума. Так, 2-Undecanol был определен в культуральных жидкостях обоих консорциумов, однако, его количество в образце S1 было в 2 раза выше, чем в образце S2. Тогда как, Cyclododecanol присутствовал только в образце S2, причем в довольно значимом количестве - 3,9% (рисунок 1, рисунок 2B). Только в образце S2 был найден и алкан пентадекан (PDN).

Различаются образцы S1, S2 и по содержанию сложных эфиров фталевой кислоты: в образце S1 определены фталевая кислота, 6-метилгепт-2-ил бутиловый эфир; а в образце S2 - фталевая кислота, гепт-4-ил изобутиловый эфир и фталевая кислота, тридец-2-ин-1-ил бутиловый эфир (рисунок 1). Следует отметить, что количество этих эфиров очень мало и примерно одинаковое в обоих консорциумах – 0,5-0,7% (рисунок 2 C), что могло бы быть связано с погрешностью методики (загрязнения от крышек виал). Однако, учитывая достаточно высокую вероятность их идентификации (68-78%), отсутствие их в контроле и низкое стандартное отклонение, эти эфиры было решено учесть в исследовании.

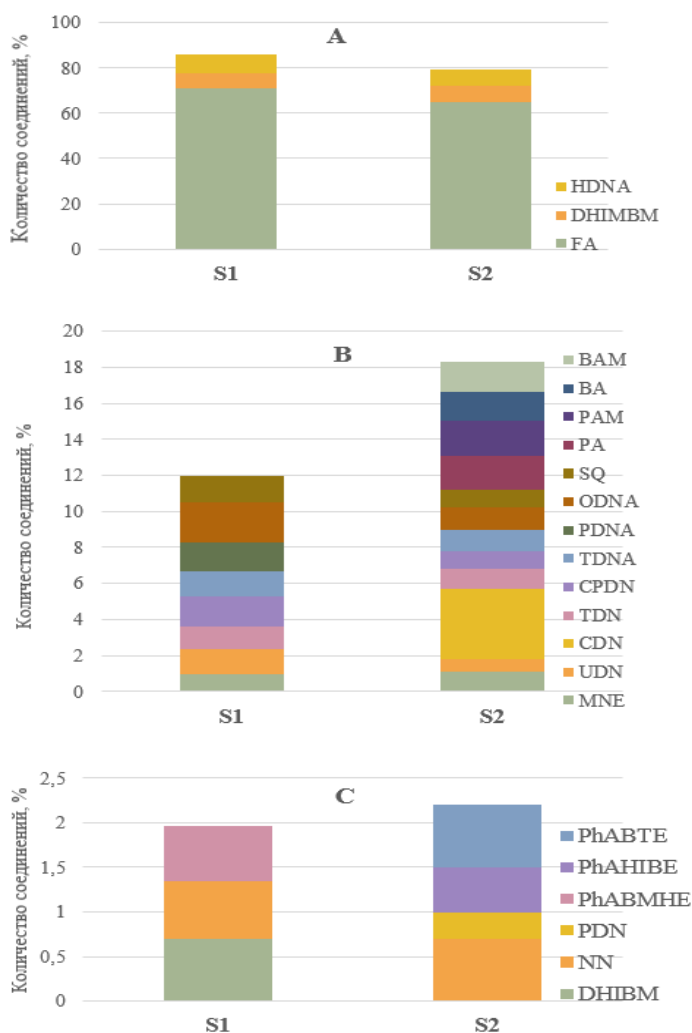


Рисунок 2 – Средние концентрации органических летучих соединений в %, образуемые консорциумами S1 и S2 в высоких концентрациях – больше 6% по меньшей мере для одного соединения в образце (A), в средних – от 1 до 4 % по меньшей мере для одного соединения в образце (B), в низких - менее 1% по меньшей мере для одного соединения в образце (C).

Сокращения приведены в таблице 1.

Метил-кетоны 2-Nonanone (NN), 2-Tridecanone (TDN) и cyclopentadecanone (CPDN), а также сквален (SQ) присутствуют в обоих образцах в умеренном количестве – 0,64-1,67% (рисунок 2).

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что отобранный нами консорциум молочнокислых и пропионовокислых бактерий продуцирует более широкий спектр антимикробных метаболитов, по сравнению с консорциумом, состоящем только из лактобацилл, и может обоснованно служить основой для создания пробиотического препарата для ценных видов рыб в аквакультуре.

Литература:

1 Hughes DT Sperandio V Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts *Nat Rev Microbiol* 2008 6 11120 (doi:10.1038/nrmicro1836)

2 Surette MG Davies J Winans SC Bassler BL A new look at secondary metabolites *Chemical Communication Among Bacteria* 2008 Washington, DC ASM Press 30722 (https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083244464)

3 Schulz S Dickschat JS Bacterial volatiles: the smell of small organisms *Nat Prod Rep* 2007(doi: 10.1039/b507392h)

4 Kai M Haustein M Molina Fet al. Bacterial volatiles and their action potential *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 81,2009, 1001–1012 (https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-008-1760-3)

5 Lemfack MC Nickel J Dunkel Met al. mVOC: a database of microbial volatiles *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue D1, 1 January 2014, Pages D744–D748, (https://doi.org/10.1093/nar/gkt1250)

6 Kai M Piechulla B Impact of volatiles of the rhizobacteria *Serratia odorifera* on the moss *Physcomitrella patens* *Plant Signal Behav.* 2010 Apr;5(4):444-6. (doi: 10.4161/psb.5.4.11340)

7 Ratiu IA, Ligor T, Bocos-Bintintan V, Buszewski B. Mass spectrometric techniques for the analysis of volatile organic compounds emitted from bacteria. *Bioanalysis.* 2017;9(14):1069–1092. (doi: 10.4155/bio-2017-0051).

8 Bos LD, Sterk PJ, Schultz MJ. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003311. doi: 10.1371/journal.ppat.1003311.

9 Schulz S, Dickschat JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep.* 2007;24(4):814–842.(doi: 10.1039/b507392h).

10 O'Hara M, Mayhew CA. A preliminary comparison of volatile organic compounds in the headspace of cultures of *Staphylococcus aureus* grown in nutrient, dextrose and brain heart bovine broths measured using a proton transfer reaction mass spectrometer. *J Breath Res.* 2009;3(2):027001.(doi: 10.1088/1752-7155/3/2/027001).

11 Liebeke M, Dorries K, Meyer H, Lalk M. Metabolome analysis of gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* by GC-MS and LC-MS. *Methods Mol Biol.* 2012;815:377–398. (doi: 10.1007/978-1-61779-424-7_28).

11 Tait E, Perry JD, Stanforth SP, Dean JR. Bacteria detection based on the evolution of enzyme-generated volatile organic compounds: determination of *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Anal Chim Acta.* 2014;848:80–87. (doi: 10.1016/j.aca.2014.07.029).

А.В. ЧИЖАЕВА¹, М.Б. АЛИМЖАНОВА¹, Қ. АШИМУЛЫ¹, А.К. САДАНОВ¹,
А.Ж. АЛЫБАЕВА^{1*}, Ж.Н. ЕРМЕКБАЙ^{1,2}, А.А. АМАНГЕЛДІ^{1,2}, М.Е. ЕЛУБАЕВА¹

¹Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: aigul_alybaeva@mail.ru

АКВАКУЛЬТУРАДАҒЫ БАЛЫҚТАРҒА АРНАЛҒАН ПРОБИОТИКАЛЫҚ КОНСОРЦИУМНЫҢ ҰШҚЫШ ҚОСЫЛЫСТАРЫНЫҢ СПЕКТРЫ

Түйін

Ұшқыш органикалық қосылыстар көптеген салаларда қызығушылық тудырады. Оларға тағам мен ароматизаторларды талдау, қоршаған орта мен атмосфераны зерттеулер, өнеркәсіптік қолданбалар, қауіпсіздік немесе медицина және өмір туралы ғылымдар кіреді. Бұл қосылыстардың сипаттамасы бірінші кезекте алтын стандарт ретінде масс-спектрометриямен біріктірілген газ хроматографиясын пайдалана отырып, алаңнан тыс сынамаларды алу және талдау арқылы орындалды. *Lactaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-28 және *Propionibacterium freudenreichii* P-8, антагонистік белсенді микроорганизмдер консорциумының метаболиттерінің химиялық табиғатын анықтау үшін. консорциумның ұшқыш қосылыстары масс-спектрометриялық анықтаумен газ хроматографиясын қолдану арқылы зерттелді. Антибактериалды және зенге қарсы белсенділігі бар метаболиттер табылды - органикалық қышқылдар, хош иісті қышқылдар (префен қышқылы, гидроксифениллактат, пирролидонкарбон қышқылы және полилакт қышқылы), сірке қышқылы және басқа ұшқыш заттар, атап айтқанда диацетил, ацетон және т.б.

Кілтті сөздер: ұшқыш органикалық қосылыстар, метаболиттер, газ хроматографиясы, масс-спектрометрия.

IRSTI: 31.27.19, 31.27.22

A.V. CHIZHAEVA¹, M.B. ALIMZHANOVA¹, K. ASHIMULY¹, A.K. SADANOV¹,
A.Zh. ALYBAYEVA^{1*}, Zh.N. ERMЕКБАЙ^{1,2}, A.A. AMANGELDI^{1,2}, M.Y. YELUBAYEVA¹

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²Al-Farabi Kazakh National University,

*e-mail: aigul_alybaeva@mail.ru

SPECTRUM OF VOLATILE COMPOUNDS OF THE PROBIOTIC CONSORTIUM FOR FISH IN AQUACULTURE

doi:10.53729/MV-AS.2023.02.08

Abstract

Volatile organic compounds are of interest in many fields. These include food and flavor analysis, environmental and atmospheric research, industrial applications, safety or medicine, and life sciences. The characterization of these compounds was primarily performed by off-site sampling and analysis using gas chromatography combined with mass spectrometry as the gold standard. In order to determine the chemical nature of the metabolites of the consortium of antagonistically active microorganisms *Lactaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lacticaseibacillus casei* Wf-10, *Lacticaseibacillus paracasei* Wf-20 and *Propionibacterium freudenreichii* P-8, the spectrum of volatile compounds of the consortium was studied using gas chromatography with mass spectrometric detection. Metabolites with antibacterial and antifungal activity were found - organic acids, aromatic acids (prephenic acid, hydroxyphenyl lactate, pyrrolidonecarboxylic acid and polylactic acid), acetic acid and other volatile substances, namely diacetyl, acetoin, etc.

Keywords: volatile organic compounds, metabolites, gas chromatography, mass spectrometry.

Currently, the development and use of probiotic products in aquaculture is essential to the health and well-being of many aquaculture animals. Probiotic bacteria are non-toxic and can be used as a supplement for fish growth and development, and as an alternative source of antibiotics to improve feed utilization, improve stress tolerance, immunity and disease resistance, and improve water quality.

Most bacteria live in active communities and produce a wide variety of secondary metabolites. These metabolites serve as signals potentially involved in competition, which allows microorganisms to adapt to various stresses [1,2]. Molecules released by bacteria with low molecular weight (<300 Da) and high vapor pressure (0.01 kPa at 20°C) can easily evaporate and permeate through heterogeneous mixtures of liquids, gases, and solids [3]. To date, more than 1000 bacterial volatile compounds are known, but this may be a gross underestimation of the diversity of volatile organic and inorganic compounds produced by bacteria [4,5]. The detection and quantification of volatile organic compounds (VOC) as attractive or repulsive odors and flavors is of great interest to food and cosmetic bioprocesses, VOC also contribute to the ability of bacteria to interact with their own environment [6].

Detection of VOC of microbial origin is an alternative approach that has the potential to become a reliable, fast and relatively inexpensive method for differentiating and identifying microorganisms. Various analytical methods make it possible to detect and identify volatile organic compounds [7]. There is a growing body of knowledge about the presence and composition of volatile metabolites released by bacteria and other microbes [8]. In the modern world, spectrometric methods are used to detect VOC.

Currently, the metabolic pathways of bacteria are being studied in detail [9]. Basically, the appearance of VOCs must be associated with a known metabolic pathway. However, the production of VOCs by bacteria is affected by their growth conditions [10]. Our knowledge of the pathways of bacterial metabolism and hence the production of VOCs under various conditions in the human body is still very limited.

Gas chromatography combined with mass spectrometry (GC-MS) is the gold standard for VOC detection [7]. GC-MS has large databases for substance identification and the ability to separate and uniquely identify compounds. The results obtained in the field of determination of bacterial VOC using GC-MS showed its applicability for this purpose. However, chemical identification of unknown VOC is impossible [11].

Materials and methods

Determination of the content of volatile compounds of the consortium of lactic acid and propionic acid bacteria was carried out by the method of solid phase microextraction (SPME) and subsequent gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS). For SPME, 10 ml of consortium culture broth was placed in a 20 ml screw cap vial (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and kept at 30° C. for 30 minutes to reach equilibrium. Headspace volatiles were adsorbed onto SPME fiber coated with 85 mm carboxene/polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Gas chromatographic analysis was performed using a 7890 gas chromatograph connected to a 5977A MSD mass spectrometer (Agilent, Santa Clara, USA). A DBWAXetr column (30 m×0.25 mm, film thickness 0.25 µm, J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) was used, and the mobile phase (carrier gas) was helium (>99.995%, Orenburg-Tekhgaz, Russia) with a flow rate of 1.0 ml/min. The injection volume was 0.5 µl at a 10:1 mixing ratio and the solvent retention was 1.5 minutes. The temperature of the GC oven was increased from an initial temperature of 40°C to 200°C at a rate of 10°C/min. The injector and transfer line temperatures were 250 and 280 °C, respectively. MS was detected at 70 eV with a scan mass range m/z of 34-550 amu. An Agilent MSD ChemStation (version 1701EA) was used to control the instrument and process the results. Data processing included determination of retention times, peak areas, and identification of peaks using their mass spectra. Mass spectra were identified using the Wiley 7th edition and NIST'02 libraries. Culture supernatants were analyzed in triplicate. Blank experiments were performed in

three different modes: fiber preparation, empty vial preparation, and culture medium preparation without bacteria (MRS broth (TM Media, India)). Calibration for determining the content of acetic acid in milk was built in the range from 2 mg/ml to 50 mg/ml. The correlation coefficient was 0.93. The MRS liquid medium was used as a blank sample.

All results were the average of three independent experiments with three parallel repetitions (n=9). The results were evaluated using standard statistical methods in Excel (Microsoft® Office 2010) using Student's t-test. Differences were considered significant at $p \leq 0.05$.

Results and discussion

The study of the spectrum of volatile compounds was carried out in two variants of the consortium: 1 sample (S1) - a consortium of only lactic acid bacteria *Lactocaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lactocaseibacillus casei* Wf-10, *Lactocaseibacillus paracasei* Wf-20; 2 sample (S2) - a consortium of lactic and propionic acid bacteria *Lactocaseibacillus paracasei* Wf-2, *Limosilactobacillus pontis* Wf-6, *Lactocaseibacillus casei* Wf-10, *Lactocaseibacillus paracasei* Wf-20 and *Propionibacterium freudenreichii* P-8. The content of volatile compounds in bacterial consortiums was determined by solid phase microextraction (SPME) and subsequent gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS).

The results of qualitative and quantitative determination of volatile compounds using showed the presence of 22 antimicrobial compounds in both variants of consortiums (Table 1), among which organic acids and their anhydrides, quinolines, saturated short- and medium-chain fatty acids, fatty alcohols, esters, ketones, alkanes were found and carotenoids. In this case, all compounds with a probability of identification above 60% were taken into account. The control sample (MPC medium) contained: carbon dioxide; 1,4:3,6-dianhydro- α -D-glucopyranose, benzoic acid heptyl ester and hexadecanoic acid.

Table 1 - Spectrum of volatile compounds formed by consortiums of selected bacteria with antibacterial and antifungal properties

Volatile compounds, %		Retention time, s	Probability of identification, %	Sample (consortium), %	
Abbreviation	Chemical name			S1 LAB	S2 LAB+PAB
1	2	3	4	5	6
FA	Acetic acid, anhydride with formic acid (Formyl acetate)	1,75	81	71,17±2,15	65,08±0,04
DHIMBM	3,4-Dihydroisoquinoline, 1-[3-methoxybenzyl]-6-methoxy-	6,55	71	6,59±0,15	6,8±0,19
PA	Propanoic acid	11,20	78	nd	1,86±0,03
PAM	Propanoic acid, 2-methyl-	11,47	82	nd	1,97±0,09
DHIBM	3,4-Dihydroisoquinolin-7-ol, 1-benzyl-6-methoxy-	11,88	61	0,70±0,03	nd
BA	Butanoic acid	12,23	76	nd	1,61±0,05
BAM	Butanoic acid, 3-methyl-	12,44	81	nd	1,68±0,05
NN	2-Nonanone	13,72	68	0,64±0,04	0,7±0,06
MNE	Methyl nonyl ether	18,83	70	0,98±0,15	1,1±0,11
UDN	2-Undecanol	19,18	70	1,34±0,04	0,7±0,04
PDN	Pentadecane	22,53	66	nd	0,3±0,01
CDN	Cyclodecanol	24,33	73	nd	3,9±0,03
TDN	2-Tridecanone	24,64	82	1,30±0,08	1,1±0,09
CPDN	Cyclopentadecanone	29,19	70	1,67±0,05	1,0±0,07
TDNA	Tetradecanoic acid	30,97	66	1,40±0,10	1,2±0,09

Table 1 continued

1	2	3	4	5	6
PDNA	Pentadecanoic acid	33,03	62	1,61±0,07	Nd
PhAHIBE	Phthalic acid, hept-4-yl isobutyl ester	34,89	72	nd	0,5±0,02
HDNA	Hexadecanoic acid	35,02	90	8,36±0,12	7,6±0,11
PhABMHE	Phthalic acid, butyl 6-methylhept-2-yl ester	37,00	78	0,62±0,02	nd
PhABTE	Phthalic acid, butyl tridec-2-yn-1-yl ester	37,01	68	nd	0,7±0,03
ODNA	Octadecanoic acid	38,79	74	2,23±0,06	1,2±0,05
SQ	Squalene	48,80	72	1,40±0,03	1,0±0,04

Most of the volatile compounds, 19 out of 22, are produced by the consortium of lactic acid and propionic acid bacteria we created (sample S2), a little less, 14 out of 22 compounds form a consortium consisting only of lactic acid bacteria (sample S1) (Figure 1).

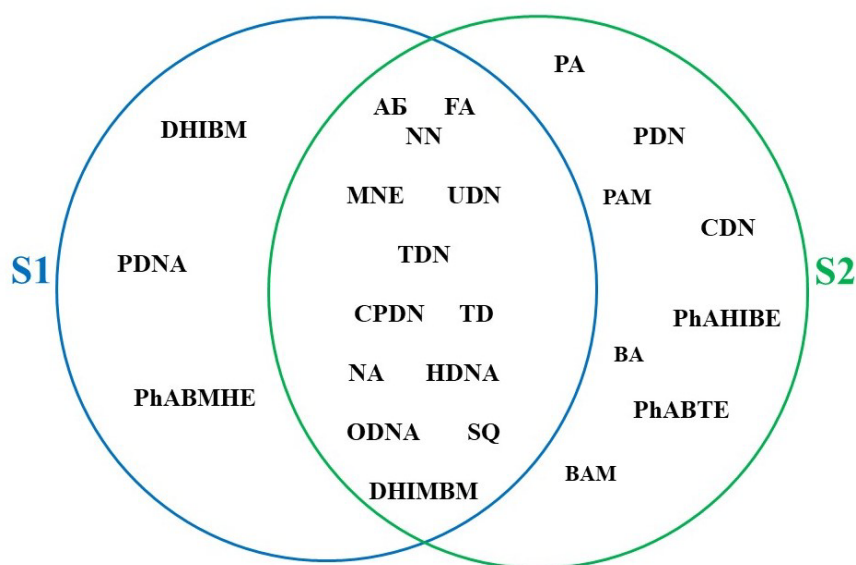


Figure 1 - The content of volatile substances in the samples of consortiums S1 and S2. See table 1 for compound abbreviation.

The detected volatile compounds were present in either significant or moderate or low concentrations, as shown in Figure 2, respectively.

The three most common compounds are mixed anhydride of acetic and formic acids; quinoline (2,3-benzopyridine) and palmitic (Figure 2) in sample S1 amounted to a total of 86.12%, and in sample S2 - 79.48% of the total amount of all detected antimicrobial volatile compounds. Their number varied depending on the strain composition of the studied consortium and ranged from 65.08% to 72.2% for acetic acid (acetic acid, anhydride with formic acid); 6.59 to 6.8% for quinoline 3,4-Dihydroisoquinoline, 1-[3-methoxybenzyl]-6-methoxy-; 7.6 to 8.36% for medium chain hexadecanoic acid (Figure 2A).

Thirteen other organic volatile compounds were present in intermediate moderate amounts and ranged from 1.0-3.9% of the total antimicrobial compounds (Figure 2B). Finally, 6 compounds from the groups of alkanes, ketones and ethers were present at lower concentrations (Figure 2C).

In general, as shown in Figure 2, medium chain saturated fatty acids were at higher concentrations in the culture broth of the consortium S1, consisting only of lactic acid bacteria(LAB). At the same time, pentadecanoic acid was found only in sample S1 (1.61%). But short-chain fatty acids - propionic acid or propionate (1.8%), isobutyric acid (1.97%), butyric acid

or butyrate (1.61%), isovaleric acid (1.68%) were present only in the sample S2 (consortium of LAB and propionic acid bacteria). The content of fatty alcohols also differed depending on the considered consortium. Thus, 2-Undecanol was determined in the culture liquids of both consortiums, however, its amount in sample S1 was 2 times higher than in sample S2. Whereas, Cyclodecanol was present only in sample S2, and in a rather significant amount - 3.9% (Figure 1, Figure 2B). The alkane pentadecane (PDN) was found only in sample S2.

Samples S1 and S2 also differ in the content of phthalic acid esters phthalic acid, butyl 6-methylhept-2-yl ester, was determined in sample S1; and in sample S2, phthalic acid, hept-4-yl isobutyl ester и phthalic acid, butyl tridec-2-yn-1-yl ester (Figure 1). It should be noted that the amount of these esters is very small and approximately the same in both consortiums - 0.5-0.7% (Figure 2 C), which could be due to the error of the method (contamination from vial caps). However, given the rather high probability of their identification (68-78%), their absence in the control and the low standard deviation, it was decided to take these ethers into account in the study.

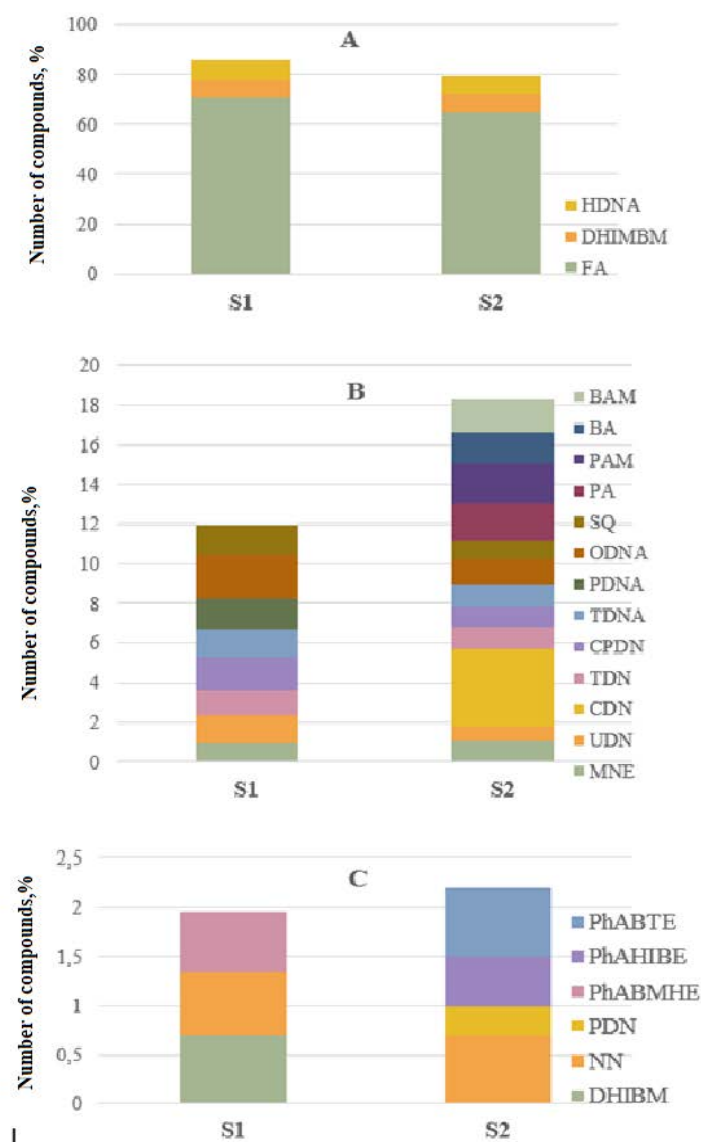


Figure 2 - Average concentrations of organic volatile compounds in%, formed by consortiums S1 and S2 in high concentrations - more than 6% for at least one compound in the sample (A), in average - from 1 to 4% for at least one compound in sample (B), in low - less than 1% for at least one compound in the sample (C). Abbreviations are given in Table 1.

The methyl ketones 2-Nonanone (NN), 2-Tridecanone (TDN) and cyclopentadecanone (CPDN), as well as squalene (SQ) are present in both samples in a moderate amount - 0.64-1.67% (Figure 2).

The presented experimental data indicate that the consortium of lactic acid and propionic acid bacteria selected by us produces a wider range of antimicrobial metabolites compared to the consortium consisting only of lactobacilli, and can reasonably serve as the basis for creating a probiotic preparation for valuable fish species in aquaculture.

References:

- 1 Hughes DT Sperandio V Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts *Nat Rev Microbiol* 2008 6 11120 (doi:10.1038/nrmicro1836)
- 2 Surette MG Davies J Winans SC Bassler BL A new look at secondary metabolites Chemical Communication Among Bacteria 2008 Washington, DC ASM Press 30722 (<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20083244464>)
- 3 Schulz S Dickschat JS Bacterial volatiles: the smell of small organisms *Nat Prod Rep* 2007(doi: 10.1039/b507392h)
- 4 Kai M Hauste M Molina Fet al. Bacterial volatiles and their action potential *Applied Microbiology and Biotechnology*, volume 81,2009, 1001–1012 (<https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-008-1760-3>)
- 5 Lemfack MC Nickel J Dunkel Met al. mVOC: a database of microbial volatiles *Nucleic Acids Research*, Volume 42, Issue D1, 1 January 2014, Pages D744–D748, (<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1250>)
- 6 Kai M Piechulla B Impact of volatiles of the rhizobacteria *Serratia odorifera* on the moss *Physcomitrella patens* *Plant Signal Behav.* 2010 Apr;5(4):444-6. (doi: 10.4161/psb.5.4.11340)
- 7 Ratiu IA, Ligor T, Bocos-Bintintan V, Buszewski B. Mass spectrometric techniques for the analysis of volatile organic compounds emitted from bacteria. *Bioanalysis.* 2017;9(14):1069–1092. (doi: 10.4155/bio-2017-0051).
- 8 Bos LD, Sterk PJ, Schultz MJ. Volatile metabolites of pathogens: a systematic review. *PLoS Pathog.* 2013;9(5):e1003311. doi: 10.1371/journal.ppat.1003311.
- 9 Schulz S, Dickschat JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep.* 2007;24(4):814–842.(doi: 10.1039/b507392h).
- 10 O'Hara M, Mayhew CA. A preliminary comparison of volatile organic compounds in the headspace of cultures of *Staphylococcus aureus* grown in nutrient, dextrose and brain heart bovine broths measured using a proton transfer reaction mass spectrometer. *J Breath Res.* 2009;3(2):027001.(doi: 10.1088/1752-7155/3/2/027001).
- 11 Liebeke M, Dorries K, Meyer H, Lalk M. Metabolome analysis of gram-positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* by GC-MS and LC-MS. *Methods Mol Biol.* 2012;815:377–398. (doi: 10.1007/978-1-61779-424-7_28).
- 11 Tait E, Perry JD, Stanforth SP, Dean JR. Bacteria detection based on the evolution of enzyme-generated volatile organic compounds: determination of *Listeria monocytogenes* in milk samples. *Anal Chim Acta.* 2014;848:80–87. (doi: 10.1016/j.aca.2014.07.029).