

УДК 54.061;577.19;577.2

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИПОПЕПТИДОВ ШТАММА *Bacillus subtilis* 26Д

© 2021 г. Е. А. Черепанова¹, И. В. Галяутдинов¹, Г. Ф. Бурханова¹, И. В. Максимов¹, *

¹Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, 450054 Россия

*e-mail: igor.mak2011@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.04.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 22.04.2021 г.

Бактерии рода *Bacillus* занимают особое место среди микроорганизмов, стимулирующих рост растений, поскольку способствуют защите растений от патогенов и вредителей. Показано, что защитные свойства бактериям придают вырабатываемые ими биологически активные вещества, секретируемые во внеклеточное пространство. Среди них большой интерес вызывают липопептиды. Из среды культивирования бактерий эндофитного штамма *Bacillus subtilis* 26Д, являющегося основой биопрепарата Фитоспорин-М, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрораспылительного масс-спектрометрического детектирования выделена липопептидная фракция, в которой идентифицировано два сурфактина (сурфактин С13 и сурфактин С15). Проведенный анализ генов липопептид-синтеза штамма бактерии *B. subtilis* 26Д выявил наличие гена сурфактин-синтеза (*Bssf*), отвечающего за синтез сурфактинов, но генов итурин- (*Bsiu*) и фенгицин- (*Bsfen*) синтеза не было обнаружено.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis* 26Д, липопептиды, сурфактин

DOI: 10.31857/S0555109921050032

Бактерии рода *Bacillus* (Cohn) являются одними из самых распространённых микроорганизмов, занимающих разные экологические ниши (вода, воздух, почва, ткани растений, животных и человека). На сегодняшний день наиболее известный и изученный вид этого рода – *Bacillus subtilis* Cohn. Препараты, содержащие в качестве действующего начала различные штаммы этого вида, активно используют в различных отраслях сельского хозяйства (растениеводстве, животноводстве, птицеводстве, рыбоводстве и ветеринарии), а также в медицине в качестве пробиотиков для нормализации микробиома кишечника, укрепления иммунитета и защиты от различных болезнетворных микроорганизмов.

Среди значимых для растениеводства штаммов *B. subtilis* особо следует остановиться на стимулирующих рост растений эндофитных штаммах, способных длительное время обитать в тканях растений, не причиняя им повреждений. Такие штаммы, образующие тесные мутуалистические взаимоотношения со своими хозяевами и антагонистичные к широкому спектру фитопатогенов, можно представить, как уникальный компонент микробиома, позволяющий им, эффективно колонизируя и присутствуя в тканях

растения, конкурировать с патогенами за нишу трофности.

Исследователи обращают внимание на способность эндофитных бактерий регулировать численность патогенной микрофлоры путем синтеза антибиотических веществ и антистрессовых соединений [1, 2]. Среди таких метаболитов бактерий привлекают внимание липопептиды (ЛП), особенностью которых является нерибосомальный синтез с помощью многофункциональных белковых комплексов, называемых нерибосомальными пептидными синтетазы (НРПС) или ЛП-синтетазы [3]. В зависимости от аминокислотной последовательности и состава жирных кислот, ЛП принято подразделять на три основных класса: сурфактины, итурины и фенгицины. Имеются сведения, что внутри данных групп ЛП могут различаться по длине и разветвленности жирнокислотной цепи, обеспечивая разнообразие изоформ [4].

В российском сегменте растениеводства широко применяется коммерческий фунгицидный биопрепарат Фитоспорин-М (“Башинком”, Россия), содержащий в качестве основы бактерии штамма *B. subtilis* 26Д, обладает как рост-стимулирующими, так и фунгицидными свойствами. Хотя известно, что ЛП-богатая фракция, в том

числе и у штамма *B. subtilis* 26Д, обладает высокой фунгицидной и рострегулирующей активностью, играет определенную роль в процессах защиты растений от различных патогенов [5, 6], до сих пор спектр ЛП у штамма *B. subtilis* 26Д и их физико-химические особенности не исследованы.

Основной целью этой работы является получение липопептид-богатой фракции метаболитов эндофитной бактерий *B. subtilis* 26Д и идентификация основных липопептидов, вырабатываемых этим штаммом.

Методика. Объектом исследования являлся штамм эндофитных бактерий *B. subtilis* 26Д (ВНИИСХМ, № 128), входящий в состав препарата Фитоспорин-М (НВП “Башинком”, Россия) и хранящийся в лаборатории биохимии иммунитета растений ИБГ УФИЦ РАН. Для культивирования *B. subtilis* 26Д использовали питательную среду Luria Bertani (LB) [4]. После приготовления питательную среду стерилизовали в автоклаве 2540 ML (“Tuttnauer”, Израиль) 25 мин при давлении 1.5 атм., $t = 121^\circ\text{C}$. Для приготовления суспензии бактерий в стерильных условиях в колбы с питательной средой LB вносили клетки *B. subtilis* 26Д и инкубировали 12 ч на шейкере Orbital Shaker-Incubator ES-20 (“BioSan”, Латвия) при 170 об./мин и $t = 37^\circ\text{C}$.

Отбор проб производили каждые 12 ч в течение 7 сут. В пробах гравиметрическим методом оценивались микробная биомасса и концентрация ЛП.

Получение фракции ЛП из среды культивирования *B. subtilis* 26Д. Выделение фракции ЛП проводили методом осаждения из культуральной жидкости бактериальной культуры, как описано [7]. Суспензию бактериальных клеток центрифугировали 45 мин при 1600 g на центрифуге Hettich Universal 320R (“Hettich”, Германия), осадок использовали для определения сухой биомассы, а из супернатанта извлекали фракцию, богатую ЛП. Надосадочную жидкость подкисляли 2 М HCl до pH 2.0 (pH-метр, “HANNA Instruments”, Германия) и оставляли на ночь при 4°C . Сформировавшийся осадок отделяли центрифугированием при 4000 g 30 мин, отмывали дистиллированной водой, подкисленной HCl до pH 2.0 и снова центрифугировали в тех же условиях. Полученный осадок суспензировали в небольшом количестве дистиллированной воды, доводя pH до 7.0 слабым раствором КОН, добавляя этанол до 80%. Через 1.5 ч периодического взбалтывания центрифугированием отделяли осадок, надосадочную жидкость пропускали через фильтр Amicon Ultracel – 3K (“Merck”, Германия). Фракцию, прошедшую через фильтр, с массой менее 3 кДа, собирали и высушивали в вакууме в вакуум-концентраторе Concentrator 5301 (“Eppendorf”, Германия) при 30°C .

Гравиметрическая оценка сухой биомассы клеточек. Осадок, полученный после центрифугирования бактериальной суспензии, для удаления солей питательной среды осторожно промывали 2 мл стерилизованной воды MilliQ. Образец снова центрифугировали (1600 g, 15 мин), супернатант удаляли и осадок суспензировали в 1.5 мл стерильной воды и переносили в предварительно взвешенные 1.5 мл пробирки Эппендорфа. Снова центрифугировали при тех же условиях, супернатант отбрасывали, а пробирки сушили при 30°C на Concentrator 5301 (“Eppendorf”, Германия) до постоянного веса. Для оценки высушенной биомассы пробирки взвешивали на весах SE224-C (“Сартогосм”, Россия) с последующим пересчетом на объем отобранного образца.

Гравиметрическая оценка концентрации ЛП. ЛП, синтезируемые бактериями *B. subtilis* 26Д, измеряли в ЛП-богатой фракции. Для этого 1.5 мл пластиковые пробирки взвешивали до внесения в них очищенной ЛП-фракции, растворенной в 80% этанола, и после ее высушивания при 30°C на Concentrator 5301 (“Eppendorf”, Германия) до постоянного веса. Пробирки взвешивали на весах SE224-C и вес пересчитывали на объем культуральной жидкости, из которого была получена ЛП-фракция.

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) ЛП-фракции проводили на пластинах с силикагелем Sorbfil (Imid Ltd., Россия) [8]. В качестве подвижной фазы использовали элюент хлороформ:метанол:вода в соотношении 65 : 25 : 4 [9]. Пластины после элюирования проявляли тремя способами: 3%-ным раствором ванилина в этиловом спирте, подкисленным раствором серной кислоты, 0.1%-ным раствором нингидрина и парами йода.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). ЛП, выделенные из культурального фильтрата бактерий *B. subtilis*, анализировали на хроматографе Agilent 1260 (фирма Agilent Technologies Inc., США) с масс-спектрометрическим детектированием (масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением AmazonX, “Bruker Daltonik GmbH”, Германия). Перед проведением ВЭЖХ высушенную фракцию ЛП растворяли в 20%-ном метаноле. В качестве элюента ЛП в колонке ReproSil-Pur 120 C18-AQ (125 × 4 мм, 5 μm) (“Dr. Maisch Phases”, Германия) в использовали раствор метанол:вода (70 : 30, об./об.) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Объем пробы 20 мкл. Регистрация масс-спектров проводилась в режиме положительных ионов в диапазоне m/z от 70 до 2700. Напряжение на капилляре распылителя составляло 3500 В. Для управления и сбора данных использовалось программное обеспечение TrapControl 7.0 (“Bruker Daltonik” GmbH, Германия).

Выделение геномной ДНК из клеток штамма *B. subtilis* 26Д. Часть бактериальной биомассы с

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности подобранных праймеров к генам *B. subtilis*, кодирующим липо-пептид-синтетазы

Название гена	NCBI	Праймеры	Последовательность, 5'-3'	Размер ампликона, п.н.	Ссылка
<i>Bssf</i>	EU882341	SfpF SfpR	atgaagatttacggaattta ttataaaagctcttcgtacg	675	[10]
<i>BsituD</i>	D21876	ituDF ituDR	atgaaaatttacggagtatatat ttataacagctcttcatacgtt	674	[11]
<i>BsfenD</i>	AJ011849	FenDF FenDR	tttggcagcaggagaagttt gctgtccgttctgctttttc	964	[10]
<i>BsBac</i>	NR102783	BacF BacR	accagaaagccacggctaaac ggcggaaaccccctaact	356	[12]

агаризованной среды переносили в пластиковые пробирки типа Eppendorf (“SSI”, США) и добавляли 250 мкл лизирующего буфера следующего состава (%): тритон X100 – 1.0, твин 20 – 1.0, смола Chelex 100 (“BioRad”, США) – 1.0, крезоловый красный – 0.005. Содержимое пробирок перемешивали, прогревали в твердотельном термостате Гном (ДНК-Технология, Россия) при температуре 95°C в течении 15 мин, после чего еще раз перемешивали и центрифугировали на препаративной центрифуге типа 5415R (“Eppendorf”, Германия) 3 мин при 12000 г. Для амплификации использовали 2 мкл супернатанта на одну реакцию. Подбор праймеров к ЛП-синтетазам осуществлялся на основе литературных данных (табл. 1).

Амплификацию полноразмерных генов *sfp*, *ituD* и *fenD* из генома штамма бактерий *B. subtilis* 26Д проводили в амплификаторе типа ТП4-ПЦР-01-Терцик (“ДНК-Технологии”, Россия) с использованием соответствующих праймеров (табл. 1).

Выделение тотальной РНК. Из культуры *B. subtilis* 26Д через 1 и 3 сут роста бактерий была выделена тотальная РНК с использованием реагента “Trizol” согласно протоколу фирмы-поставщика (“Sigma”, Германия). Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли на спектрофотометре Smart

Spec Plus (“Bio-Rad”, США). Для синтеза кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием M-MuLV обратной транскриптазы (“Синтол”, Россия).

Анализ экспрессии генов. Анализ ЛП-синтетаз проводили методом количественной ПЦР в режиме реального времени на приборе “iCycler CFX Connect Real-Time PCR Detection System” (“BioRad”, США) с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I (“Синтол”, Россия). Изменения в экспрессии интересующего гена определяли на основании вычисления уровня нормализованной экспрессии генов с помощью программного обеспечения поставщика прибора (“BioRad”, США).

Аналитический гель-электрофорез ДНК проводили в 1%-ном агарозном геле. Маркер – Mass-Ruler DNA Loading Dye (“Thermo Scientific”, США).

Все эксперименты проведены в 3 биологических и не менее 3 аналитических повторностях. При обработке результатов использовались программы Statistica 12.0 фирмы “Stat Soft”. На рисунках приведены средние значения биологических повторов и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения динамики накопления сухой массы бактерий и ЛП в зависимости от времени культивирования представлены на рис. 1. Как видно, концентрация ЛП достигала максимума через 60 ч культивирования. ТСХ обогащенной ЛП фракции показала, что в культуральном фильтрате штамма *B. subtilis* 26Д присутствовал ЛП с подвижностью R_f 0.65, окрашивающийся при проявлении раствором ванилина, нингидрином и парами йода (рис. 2). ЛП из культурального фильтрата бактерии штамма *B. subtilis* 26Д совпадал по подвижности с коммерческим сурфактантом (“Sigma”, США) по значению R_f . Таким образом, использование ТСХ позволило обнаружить

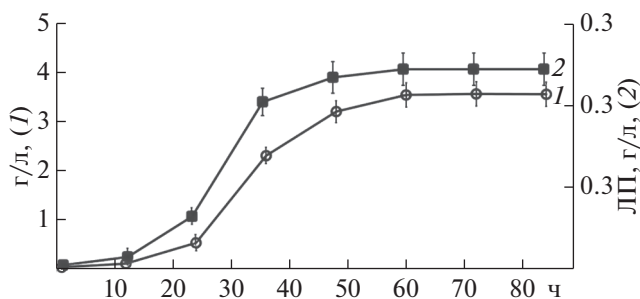


Рис. 1. Динамика накопления сухой массы бактерий (г/л, (1)) и липопептидов (ЛП, г/л, (2)) в зависимости от времени культивирования.

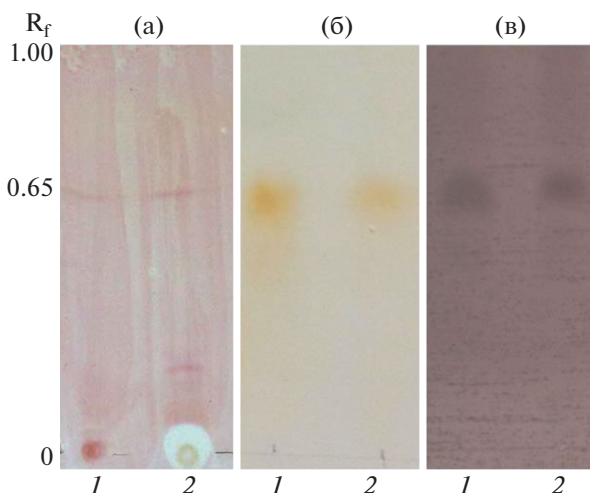


Рис. 2. Результаты окрашивания пластинок растворами ванилина (а), ninгидрина (б) и параами йода (в) после ТСХ коммерческого сурфактина (1) и фракции метаболитов *B. subtilis* 26Д (2), богатой липопептидами.

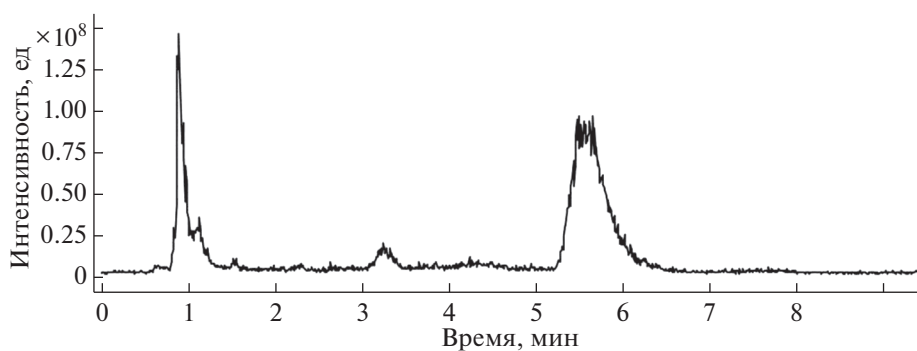


Рис. 3. ВЭЖХ–хроматограмма на колонке ReproSil-Pur 120 C18-AQ липопептидной фракции, выделенной из культурального фильтрата *Bacillus subtilis* 26Д.

присутствие сурфактина в культуральном фильтрате штамма *B. subtilis* 26Д.

В обогащенной ЛП фракции *B. subtilis* 26Д при проведении ВЭЖХ (рис. 3) с последующим масс-спектрометрическим детектированием идентифицировано два сурфактина с ацильной цепью C13 (3.3 мин) с m/z 1008.7 [M + H] и C15 с m/z 1036.7 [M + H] (5.5 мин) (рис. 4). Наряду с идентифицированными сурфактинами с ацильной цепью C13 и C15, масс-спектрометрический анализ выявил соединения с m/z 268.0, 358.2, 453.2, 471.3, 697.6, 794.2 и 810.7. Соединения с m/z 453.2 и 471.3 близки по молекулярным массам к поликетидам, описанным в литературе [13].

Для определения наличия или отсутствия генов, кодирующих ЛП-синтетазы применяется метод ПЦР с ДНК бактерий. Способность бактерий к синтезу ЛП можно оценить по экспрессии генов ЛП-синтетаз с использованием праймеров, нацеленных на консервативные участки [2, 10, 14]. В

результате ПЦР-анализа в геноме штамма *B. subtilis* 26Д обнаружен ген *Bssf*, кодирующий сурфактин-синтетазу (рис. 5а). Праймеры *BsituD* и *BsfenD*, использованные для детекции генов, кодирующих итурин- и фенгицин-синтетазы, соответственно, не формировали транскриптов на базе кДНК штамма *B. subtilis* 26Д. Соответственно, проведенный анализ наличия генов ЛП-синтетаз обнаружил в геноме штамма *B. subtilis* 26Д ген сурфактин-синтетазы, отвечающий за синтез сурфактина, и показал отсутствие генов итурин-синтетазы и фенгицин-синтетазы.

Для определения способности продуцировать сурфактин бактериями *B. subtilis* 26Д изучена экспрессия гена *Bssf* в культуральной среде штамма *B. subtilis* 26Д. Показано (рис. 5б), что на 1 и 3 сут роста бактерий в культуре активно накапливается мРНК *Bssf* *B. subtilis* 26Д. Таким образом, нами показано, что эндофитный штамм бактерии *B. sub-*

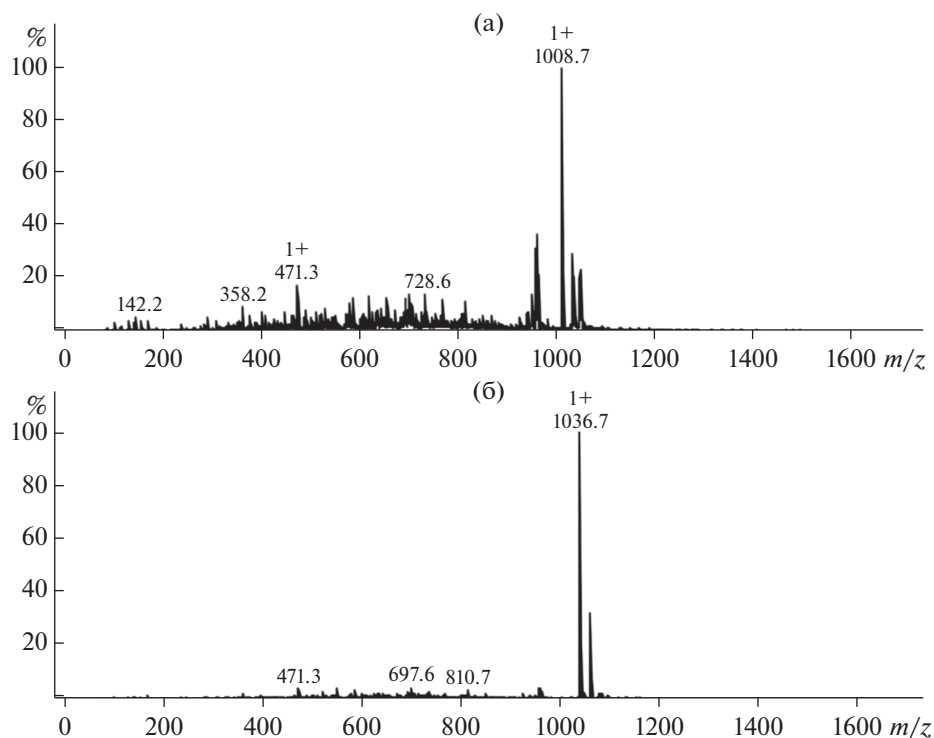


Рис. 4. Масс-спектр липопептидной фракции, продуцируемой *Bacillus subtilis* 26Д, отвечающий сурфактину С13 (а) и сурфактину С15 (б).

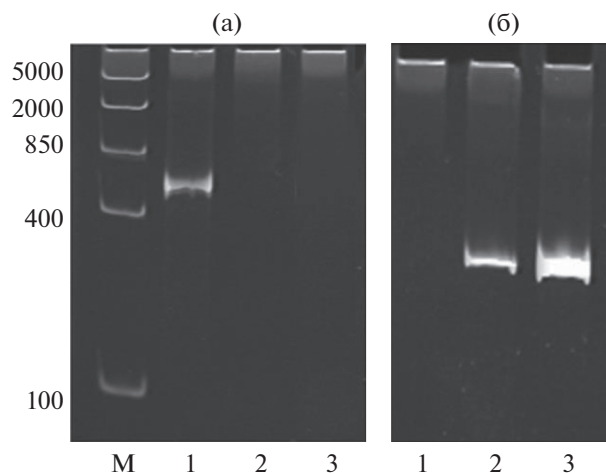


Рис. 5. Результаты ПЦР ДНК бактерий *B. subtilis* 26Д с праймерами к генам *Bssfj* (1), *BsituD* (2) и *BsfenD* (3) (а) и транскрипционной активности гена *Bssfj* (б) через 0 (1), 1 (2) и 3 (3) сут роста бактерий *B. subtilis* 26Д в культуре.

tilis 26Д эффективно экспрессирует ген сурфактин-синтетазы в культуре.

В современной литературе встречается много работ, посвященных продукции ЛП различными видами бактерий, в особенности различными штаммами *Bacillus* spp. Для выявления способности бактерий к синтезу ЛП часто идентифицируют

у них гены НРПС [2, 3, 10]. Среди генов, кодирующих НРПС, наиболее изучены семейства синтетаз сурфактина, фенгицина и итурина. Так, у штамма *Bacillus tequilensis* обнаружены гены, ответственные за синтез сурфактина, фенгицина, бациллибацина и бацилина [15]. В геноме штамма *B. velezensis* обнаружены нуклеотидные последовательности, коди-

рующие ЛП: фенгицин-б, итурин, сурфактин-а, бутирозин, плантазолин, киянимицин и др. [16]. В геноме штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* из здоровых тканей винограда *Vitis vinifera* определены гены, кодирующие белки, ответственные за синтез бациллаена, диацидина, микролактина, сурфактина и фенгицина [17]. Проведенный анализ нуклеотидных последовательностей ЛП-синтетаз штамма *B. subtilis* 26Д показал наличие только гена сурфактин-синтетазы *Bssfp*, отвечающего за синтез сурфактина, но не фенгицина и итурина. Также нами была впервые в клетках *B. subtilis* 26Д показана экспрессия этого гена.

Известно, что бактерии *Bacillus* spp. могут одновременно вырабатывать различные ЛП и их структурные аналоги (изоформы). Семейство сурфактина включает в себе молекулы различной структуры, но все они – гептапептиды, связанные с β-гидроксикислотой, образуют циклическую структуру лактонного кольца [18]. Так, среди метаболитов бактерий *Bacillus clausii* ДТМ1 обнаруживается до 12 сурфактиновых аналогов, различающихся характером пептидных остатков и/или длиной и разветвлением цепи жирных кислот [19]. Методом ТСХ в культуральном фильтрате штамма *B. subtilis* 26Д обнаружен ЛП с R_f 0.65, совпадающий по подвижности с коммерческим сурфактином. Ранее Клюге с соавт. [9] описали наличие сурфактина с R_f 0.65 у штамма *B. subtilis* АТСС 21332, а Джой с соавт. [20] – с R_f 0.72 и 0.55 у бактерий штамма *Bacillus licheniformis* SB2.

С использованием ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием позволило идентифицировать в ЛП-богатой фракции метаболитов *B. subtilis* 26Д две разновидности сурфактина – с длинами жирнокислотных цепей С13 и С15. Подобные изомеры сурфактина из культурального фильтрата штамма *B. licheniformis* HSN221 ранее были выделены и описаны [21]. Фариа с соавт. [22] получили масс-спектры ЛП штамма *Bacillus subtilis* LSFМ-05 с m/z 1022, 1036, 1044 и 1058 с длинами жирнокислотных цепей С13 и С14. Чен с соавт. [16] сообщили о присутствии у *B. licheniformis* MB01 изоформ сурфактина С12, С13, С14 и С15. Сходные с полученными в настоящей работе результатами были опубликованы в Фульпото с соавт. [23], где штамм *B. subtilis* 41651 А1 синтезировал изоформы сурфактина с жирнокислотными цепями С13 и С15.

Бактериальные ЛП имеют широкое практическое применение, которое связано в первую очередь с их биологической и избирательной биоцидной активностями, определяющими специфическими различиями в их действии в зависимости от их природы [24, 25]. Кроме того, интерес у исследователей вызывает синергический защитный эффект ЛП [26, 27]. Обнаружено, что совместно

сурфактин и фенгицин из *B. subtilis* GM5 подавляли развитие гриба *Fusarium oxysporum* [2]. Есть сведения об усилении антифунгальной активности при совместном воздействии фенгицина и микосубтилина [28].

Сурфактины, продуцируемые бактериями рода *Bacillus*, известны не только своей биосурфактантной активностью, а также проявлением гемолитических, противовирусных [29–31] антибактериальных и инсектицидных [19, 25, 32, 33] свойств.

В настоящее время наиболее актуальны исследования, связанные с созданием микроорганизмов с измененным для определенных целей геномом. Штамм, синтезирующий единственный вид ЛП с известным числом конкретных изомеров может быть удобен для создания генно-инженерных конструкций, регуляции синтеза данного ЛП и изменения некоторых его свойств. Так, у некоторых модифицированных сурфактинов наблюдалась пониженная гемолитическая активность, следовательно, они имели более низкую токсичность по отношению к эритроцитам, но при этом не теряли антибактериальную активность [34].

Проведенные исследования показали, что *B. subtilis* 26Д является источником двух изоформ сурфактина и может быть использован для создания генно-инженерных конструкций на основе данного штамма. Разработка методов очистки вторичных метаболитов из культурального фильтрата *B. subtilis* 26Д в дальнейшем может способствовать созданию технологий выделения сурфактинов, которые могут быть востребованы в различных отраслях промышленности – от фармацевтики до производства поверхностно активных сурфактантов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ офи_м 17-29-08014, по темам государственного задания АААА-А21-121011990120-7 и № АААА-А16-116020350033-8, с использованием оборудования ЦКП “Агидель” и уникальной научной установки “КОДИНК”. Идентификация ЛП проведена в ЦКП-САЦ ФИЦ КазНЦ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pusenkova L.I., Pyasova E.Yu., Lastochkina O.V., Maksimov I.V., Leonova S.A.* // Eurasian Soil Science. 2016. V. 49. № 10. P. 1136–1144. <https://doi.org/10.1134/S1064229316100112>
2. *Mardanov A.M., Hadiyeva G.F., Lutfullin M.T., Khilyas I.V., Minnullina L.F., Gilyazeva A.G., Bogomolnaya L.M., Sharipova M.R.* // Agricultural Sci. 2017. V. 8. № 1. P. 1–20. <https://doi.org/10.4236/as.2017.81001>
3. *Roongsawang N., Washio K., Morikawa M.* // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. P. 141–172. <https://doi.org/10.3390/ijms12010141>

4. *Paraszkiewicz K., Bernat P., Kuśnierska A., Chojniak J., Płaza G.* // J. Environ. Manage. 2018. V. 209. Art. 65. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.033>
5. *Нафикова А.Р., Сурина О.Б., Хайруллин Р.М., Максимов И.В.* // Агрохимия. 2018. № 5. С. 39–44. (rus). <https://doi.org/10.7868/S000218811805006X>
6. *Черепанова Е.А., Благова Д.К., Бурханова Г.Ф., Сарварова Е.С., Максимов И.В.* // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 3. С. 339–346. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-339-346>
7. *Vater J., Kablitz B., Wilde C., Franke P., Mehta N., Cameotra S.S.* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 12. P. 6210–6219. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.6210-6219.2002>
8. *Alajlani M., Shiekh A., Hasnain S., Brantner A.* // Chromatographia. 2016. V. 79. № 21. P. 1527–1532. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3164-3>
9. *Kluge B., Vater J., Salnikow J., Eckart K.* // FEBS Lett. 1988. V. 231. P. 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80712-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80712-9)
10. *Gond S.K., Bergen M.S., Torres M.S., White J.F.Jr.* // Microbiol. Res. 2015. V. 172. № 1. P. 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004>
11. *Zhao X., Zhou Zh., Han Y., Wang Zh., Fan J., Xiao H.* // Microbiol. Res. 2013. V. 168. № 9. P. 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.03.001>
12. *Kunst F., Ogasawara N., Moszer I., Albertini A.M. et al.* // Nature. 1997. V. 390. № 6657. P. 249–256. <https://doi.org/10.1038/36786>
13. *Wang T., Liang Y., Wu M., Chen Z., Lin J., Yang L.* // Chin. J. Chem. Eng., 2015. V. 23. P. 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.05.020>
14. *Afsharmanesh H., Perez-Garcia A., Zerrouh H., Ahmadzadeh M., Romero D.* // Food Control. 2018. V. 94. № 1. P. 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.002>
15. *Xu W.F., Ren H.S., Ou T., Lei T., Wei J.H., Huang C.S., Li T., Strobel G., Zhou Z.Y., Xie J.* // Microb. Ecol. 2019. V. 77. P. 651–663. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1247-4>
16. *Chen L., Heng J., Qin S., Bian K.* // PLoS One. 2018. V. 13. № 6. Art. e0198560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198560>
17. *Pinto C., Sousa S., Froufe H., Egas C., Clément C., Fontaine F., Gomes A.C.* // Stand. Genomic Sci. 2018. V. 13. Art. 30. <https://doi.org/10.1186/s40793-018-0327-x>
18. *Peypoux F., Bonmatin J.M., Wallach J.* Recent trends in the biochemistry of surfactin. Appl Microbiol Biotechnol. 1999. V. 51. № 5. P. 553–563. <https://doi.org/10.1007/s002530051432>
19. *Guo D.L., Wan B., Xiao S.J., Allen S., Gu Y.C., Ding L.S., Zhou Y.* // Natural Product Com. 2015. V. 10. № 12. P. 2151–2153. <https://doi.org/10.1177/1934578X1501001235>
20. *Joy S., Rahman P.K., Sharma S.* // Chem Eng J. 2017. V. 317. P. 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>
21. *Lee D.W., Kim B.S.* // Plant Pathol J. 2015. V. 31. № 1. P. 1–11. <https://doi.org/10.5423/PPJ.RW.08.2014.0074>
22. *Faria A.F., Teodoro-Martinez D.S., de Oliveira Barbosa G.N., Vaz B.G., Silva Í.S., Garcia J.S., Tótola M.R., Eberlin M.N., Grossman M., Alves O.L.* // Process Biochem. 2011. V. 46. P. 1951–1957. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2011.07.001>
23. *Phulpoto I.A., Yu Z., Hu B., Wang Y., Ndayisenga F., Li J., Liang H., Qazi M.A.* // Microb. Cell. Fact. 2020. V. 19. № 1. Art. 145. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01402-4>
24. *Grady E.N., MacDonald J., Ho M.T., Weselowski B., McDowell T., Solomon O., Renaud J., Yuan Z.C.* // BMC Microbiol. 2019. V. 19. № 1. Art. 5. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
25. *Maksimov I.V., Blagova D.K., Veselova S.V., Sorokan A.V., Burkhanova G.F., Cherepanova E.A., Sarvarova E.R., Rumyantsev S.D., Alekseev V.Yu., Khayrullin R.M.* // Biological Control. 2020. V. 144. Art. 104242. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104242>
26. *Falardeau J., Wise C., Novitsky L., Avis T.J.* // J. Chem. Ecol. 2013. V. 39. P. 869–878. <https://doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
27. *Khong N.G., Randoux B., Tayeh Ch., Coutte F., Bourdon N., Tisserant B., Laruelle F., Jacques P., Reignault P.* // Commun. Agric. Appl. Biol. Sci. 2012. V. 77. № 3. P. 39–51.
28. *Mihalache G., Balaes T., Gostin I., Stefan M., Coutte F., Krier F.* // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2018. V. 25. P. 29784–29793. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9162-7>
29. *Yuan L., Zhang S., Wang Y., Li Y., Wang X., Yang Q.* // J. Virol. 2018. V. 92. № 21. Art. e00809-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00809-18>
30. *Johnson B.A., Hage A., Kalveram B., Mears M., Planete J.A., Rodriguez S.E., Ding Z., Luo X., Bente D., Bradrick S.S., Freiberg A.N., Popov V., Rajsbaum R., Rossi S., Russell W.K., Menachery V.D.* // J. Virol. 2019. V. 93. № 22. Art. e01282-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01282-19>
31. *Ibrahim A., Odon V., Kormelink R.* // Front Plant Sci. 2019. V. 10. Art. 803. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00803>
32. *Rodríguez M., Marín A., Torres M., Béjar V., Campos M., Sampedro I.* // Front Microbiol. 2018. V. 9. Art. 3114. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03114>
33. *Sorokan A., Benkovskaya G., Blagova D., Maksimov I.* // AIP Conference Proceedings. 2063, 2019. Art. 020001. <https://doi.org/10.1063/1.5087308>
34. *Théâtre A., Cano-Prieto C., Bartolini M., Laurin Y., Deleu M., Niehren J., Fida T., Gerbinet S., Alanjary M., Medema M.H., Léonard A., Lins L., Arabolaza A., Gramajo H., Gross H., Jacques P.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. Art. 623701. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.623701>

Isolation and Identification of Lipopeptides of *Bacillus subtilis* 26D

E. A. Cherepanova^a, I. V. Galyautdinov^a, G. F. Burkhanova^a, and I. V. Maksimov^{a,*}

^a*Institute of Biochemistry and genetics of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia*

**e-mail: igor.mak2011@yandex.ru*

Among the wide range of biologically active substances secreted by endophytic bacteria, lipopeptides are of considerable interest. The presence of lipopeptide synthetase genes responsible for their synthesis in bacteria of the endophytic strain *Bacillus subtilis* 26D was analyzed. A lipopeptide-rich fraction was isolated from the culture medium of *B. subtilis* 26D. Analysis of the lipopeptide composition by thin-layer chromatography (TLC) revealed the presence of surfactin in the *B. subtilis* 26D strain, which is confirmed by the presence of the surfactin-synthetase gene in the genome of this bacterial strain. High-performance chromatography (HPLC) with mass spectrometric analysis showed the presence of two varieties of surfactin (C13 and C15).

Keywords: Bacillus subtilis 26D, lipopeptides, surfactin