

УДК: 582.282.23.045

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУКЦІЇ СИДЕРОФОРІВ ДЕЯКИМИ ШТАМАМИ PGPR ПСЕВДОМОНАД

Левченко В.В., Русакова М.Ю.

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
м. Одеса, Україна

Вступ. Сьогодні мікробіологічний синтез різних біологічних активних речовин (БАР) грає ключову роль в біотехнологічному виробництві. В даний час мікроорганізми продукують десятки видів сполук [2]. Одним з найбільш використовуваних БАР в біотехнології є сидерофори.

Сидерофори – низькомолекулярні речовини, що хелатують Fe^{3+} , які виділяються мікроорганізмами при дефіциті цих іонів у навколишньому середовищі. Основна функція сидерофорів полягає в переведенні заліза, зв'язаного з білками і водонерозчинними сполуками, в доступну для мікроорганізмів форму Fe^{3+} [1].

Сьогодні, згідно з особливостями структури, виділяють 3 основних типи сидерофорів. Один з них містить феноляти і катехолати (наприклад, ентеробактин, продуцентом якого являється *Escherichia coli*), що виконують роль зв'язуючих центрів. Інший тип – гідроксамові сполуки, зокрема феррихром *Ustilago sphaerogena*. Існує також третій тип – зі змішаними лігандами, до яких належить піовердин, що синтезується *Pseudomonas aeruginosa*. Константа зв'язування Fe^{3+} природними сидерофорами різних типів становить від 10^{13} до 10^{20} .

Наразі на біотехнологічних виробництвах все частіше використовують сидерофори змішаного типу бактерій роду *Pseudomonas*. Особливий інтерес викликають флуоресціюючі сидерофори-пігменти – піовердини, що є унікальними сполуками, які синтезуються, за рідкісним винятком, тільки бактеріями даного роду. Ці пігменти характеризуються надзвичайно високою хелатною Fe^{3+} -іоноздатністю. Константа зв'язування Fe^{3+} сидерофорами бактерій цього роду досягає 10^{25} при pH 7,0.

Сидерофори бактерій роду *Pseudomonas* сприяють виникненню у них антифунгальних і антибактеріальних властивостей. Більшість бактерій і грибів, у тому числі фітопатогенних, продукують власні сидерофори, проте на відміну від сидерофорів псевдомонад, вони менш ефективно зв'язуються з Fe^{3+} , в результаті чого ці бактерії виграють у конкурентній боротьбі за цей життєво важливий елемент. Таким чином, зв'язування іонів заліза сидерофорами бактерій роду *Pseudomonas* призводить до обмеження зростання фітопатогенів і поліпшення росту рослин [5].

Важливість ролі сидерофорів в антагоністичних взаєминах PGPR псевдомонад (PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, Ризобактерії, що сприяють росту рослин) з ґрунтовими фітопатогенами, а також в стимуляції росту рослин, неодноразово доведена при інокуляції рослин штамами, що продукують сидерофори, і їх мутантами, дефектними за їх синтезом. Тому на основі сидерофорів псевдомонад з групи PGPR вже було створено велику кількість біопрепаратів, які широко використовуються в агропромисловості і поєднують в собі рістстимулюючі та фунгіцидні властивості. Найвідомішими з таких препаратів є Планріз (*Pseudomonas fluorescens*), Бактофіт (*Pseudomonas putida*), BlightBan A506 (*P. fluorescens* A506), BioSave (*Pseudomonas syringae* ESC 6-10).

Також, успішно розвиваються дослідження антагоністичних взаємовідносин ризосферних псевдомонад з фітопатогенними нематодами, що викликають значні втрати врожаю [1].

Проводяться експерименти з перенесення в ризосферні псевдомонади бактеріальних генів інших таксономічних груп (наприклад, *Bacillus thuringiensis*), контролюючих такі незвичайні для них властивості, як, наприклад, здатність до синтезу токсинів, що викликають загибель деяких комах-шкідників рослин.

Окрім того, було встановлено можливість взаємодії піовердину, не лише з іонами заліза, але й з іонами інших металів. Результати багатьох експериментів свідчать про те, що даний сидерофор здатний утворювати комплекси з іонами одновалентних (Hg^+ , Cu^+ , Cs^+), двохвалентних (Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+}), трьохвалентних (Fe^{3+} , Al^{3+} , Cr^{3+}) та шестивалентних (Mo^{6+} , W^{6+}) металів. Таким чином, було показано можливість використання даної сполуки для індикації та зв'язування цих металів у різних середовищах з метою їх детоксикації. Отримані дані узгоджуються з такими щодо взаємодії інших пігментів псевдомонад з металами, зокрема Cr^{3+} з псевдобактерією *Pseudomonas sp.* B1 та Al^{3+} з піовердином *P. aeruginosa* PAO1 [3].

Таким чином, пропонується використання сидерофорів бактерій, що зв'язують у навколишньому середовищі катіони металів з утворенням малотоксичних метаболітів, для біоремедіації територій, забруднених ними.

Мета дослідження. Метою даної роботи була характеристика здатності та кількісне визначення сидерофорів, що продукуються штамми псевдомонад, які належать до PGPR-групи.

Методи дослідження. Мікроорганізми, серед яких було проведено визначення метаболітів належать до роду *Pseudomonas*: *Pseudomonas chlororaphis* (ONU 304, ONU 305, ONU 306) та *P. fluorescens* ONU 303.

Середовища, які було застосовано, містили всі необхідні поживні компоненти для розвитку бактерій та продукції ними вторинних метаболітів. Оптимальною температурою вирощування культур були 22 °C.

Продукцію сидерофорів вивчали з використанням хром азурола S [4]. Для цього готували CAS-агар, який містив CAS-реактив: розчини Fe^{3+} та ГДТМА (гексадецилтриметил бромід амонію). Культури, що утворювали сидерофори, були здатні змінювати колір CAS-агару з вихідного (темно-блакитного) на помаранчевий. Інкубацію *Pseudomonas spp.* на поверхні даного середовища проводили впродовж 5 діб.

Для визначення загальної кількості мікробних сидерофорів використовували рідке поживне середовище Кінга в двох варіантах з додаванням та без додавання розчину заліза.

Використовуючи отримані добові культури кожного штаму, готували суспензії клітин ($1,5 \cdot 10^8$ КУО/мл). Після інкубації досліджувані культури відбирали та клітини осаджували центрифугуванням при 1200 об/хв впродовж 25 хв. Для визначення вкладу окремих типів сидерофорів у загальну кількість подібних сполук було проведено спектрофотометричний аналіз супернатанту (спектрофотометр Spekord M40, довжина хвилі від 200 нм до 500 нм), де відбувалось вирощування досліджуваних штамів.

Для отримання достовірних результатів всі досліди проводили у 6 повторах. При порівняльному аналізі результатів досліджень використовувався t- критерій Ст'юдента. Достовірною вважалася різниця при показнику $p \leq 0,05$. Статистичне опрацювання результатів здійснювали, застосовуючи програму Excel-2010.

Основні результати. В роботі було досліджено здатність культур псевдомонад продукувати сидерофори з використанням CAS-агару. Утворення ними сидерофорів визначалось за перетворенням забарвлення середовища. Найбільш інтенсивна зміна кольору була зафіксована для *P. fluorescens*. Що стосується штамів *P. chlororaphis*, то утворення сидерофорів було менш інтенсивним.

Розвиток *Pseudomonas spp.* відбувався у рідкому поживному середовищі, склад якого був аналогічний такому у агара Кінга. На даний момент агар Кінга – середовище, яке використовується для ідентифікації та культивування представників родини *Pseudomonadaceae*, а також визначення у них здатності до синтезу пігментів [4].

В роботі було визначено, що використані штами мікроорганізмів впродовж зростання у середовищі Кінг виробляли сполуки, які характеризувались наявністю у спектрі поглинання максимуму при довжині хвилі 400-405 нм. При цьому в залежності, перш за все, від виду псевдомонад спостерігались розбіжності у інтенсивності поглинання, але довжина хвилі для всіх випадках залишалась незмінною.

За даними літератури всі вивчені сидерофори, що утворюються представниками роду *Pseudomonas*, є флуоресцентними пігментами та належать до класу піовердинів. Більшість з них представляють собою молекули, до складу яких входить короткий пептид, зв'язаний одним кінцем з діоксіхіноліновим ядром – 2,3-діаміно-6,7-діоксіхіноліновим похідним. У складі пептиду може варіювати почерговість амінокислот, кількість повторів деяких із них, а також наявність L-, D- чи OH-похідних форм [5]. Проте, діоксіхінолінове ядро піовердинових сидерофорів однакове у всіх відомих штамів роду *Pseudomonas*. Саме тому, спектри поглинання даних сполук подібні між собою та характеризуються максимумом поглинання у видимій області. Причому даний максимум обумовлений присутністю в молекулі саме діоксіхінолінового ядра відповідає 400 нм

Виходячи з отриманих даних, а також враховуючи зміни забарвлення CAS-агару під час культивування, було встановлено здатність досліджуваних псевдомонад утворювати та секретувати сидерофори, які належать до класу піовердинів [4].

Тому, для подальшого кількісного визначення сидерофорів досліджуваними штамми, за відсутності та наявності іонів Fe^{3+} , їх продукцію реєстрували при довжині хвилі 400 нм.

Досліджувані псевдомонади, що культивувались без додаткового внесення Fe^{3+} , за кількістю утворених сидерофорів можна розмістити в наступній послідовності: *P. fluorescens* ONU 303 > *P. chlororaphis* ONU 304 > *P. chlororaphis* ONU 305 > *P. chlororaphis* ONU 306.

Порівнюючи отримані значення оптичної густини з кількістю клітин у суспензії, можна припустити, що при обмеженому вмісті Fe^{3+} у поживному середовищі, концентрація виділених вторинних метаболітів прямо пропорційна кількості клітин бактерій різних штамів.

При додаванні іонів Fe^{3+} спостерігались певні зміни інтенсивності виділення сидерофорів досліджуваними штамми. Якщо у першому випадку показники були

досить високими, то при вмісті 30 мкг/мл Fe^{3+} утворення цих сполук пригнічувалось. Також необхідно відмітити, що у даному випадку порядок розміщення досліджуваних культур від найбільшого до найслабшого продуцента сидерофорів є наступним: *P. fluorescens* > *P. chlororaphis*.

При збільшенні вмісту Fe^{3+} до 1000 мкг/мл було визначено, що найвища кількість сидерофорів, продукується штамми *P. chlororaphis*, дещо менша – культурою *P. fluorescens*.

Отже, значне зниження кількості досліджуваних сполук відбулось, очевидно, через підвищення вмісту Fe^{3+} у поживному середовищі, яке спричинило репресію синтезу сидерофорів у псевдомонад через зв'язування з Fur-протеїном, який репресує транскрипцію генів, що кодують специфічні σ -фактори синтезу піовердинів.

Висновки. Культури *P. fluorescens* та *P. chlororaphis* продукували залізохелатуючі сполуки, які за спектрофотометричними властивостями належали до первинних сидерофорів піовердинового типу. Без додаткового внесення іонів Fe^{3+} у середовище культивування найбільш активна продукція сидерофорів спостерігалась у штаму *P. fluorescens*, яка після додавання 30 мкг/мл Fe^{3+} зменшилась на 30 % та 50 %, відповідно. Наявність 1000 мкг/мл Fe^{3+} у поживному середовищі спричинила практично повну зупинку вироблення даних сполук.

Список літератури.

1. Волова Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск: РАН, 2009. – 252с.
2. Завалин А. А. Биопрепараты, удобрения и урожай / А. А.Завалин. – Москва: ВНИИА, 2005. – 288с.
3. Khan A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator – Siderophore: A review / A. Khan, P. Singh, A. Srivastava // Microbiological Research. – 2018. – Vol. 212. – P.103–111.
4. Miethke M. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control / M. Miethke, M.A. Marahiel // Microbiology and Molecular Biology Rev. – 2007. – Vol. 71, № 3. – P.413–451.
5. Schalk I.J. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance / I.J. Schalk, M. Hannauer, A. Braud // Environmental Microbiology. – 2011. – V. 13, № 11. – P. 2844–2854.