

**І. Д. Жунько, Г. І. Жумінська**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,  
тел.: +38 (0482) 68 79 64; e-mail: zhunkinn@gmail.com

## СКРИНІНГ ПРОДУЦЕНТІВ СИДЕРОФОРІВ СЕРЕД ШТАМІВ *PANTOEA AGGLOMERANS*

**Метою** роботи було проведення скринінгу штамів-продуцентів сидерофорів серед бактерій *P. agglomerans*. **Методи.** Здатність до утворення сидерофорів штамми *P. agglomerans* досліджували за допомогою хромазуrol S (CAS)-аналізу. Як індикатор використовували трикомпонентний комплекс: хромазуrol S, залізо (III) та гексадецилтриметиламоній бромід (HDTMA). Продукцію сидерофорів визначали на підставі якісної оцінки утилізації заліза на CAS-агарі. Результати. Бактерії, які були здатні синтезувати сидерофори, поглинали йони заліза (III) з поживного середовища залежно від інтенсивності продукції даних метаболітів. В результаті скринінга, 63,2 % бактеріальних штамів показали високу здатність до продукції досліджуваних речовин. **Висновки.** Відібрані штами *P. agglomerans* можуть бути використані в подальших біотехнологічних дослідженнях.

**Ключові слова:** *Pantoea agglomerans*, скринінг, сидерофори, CAS-аналіз, Fe<sup>3+</sup>.

Майже 20 видів бактерій, представників родини *Enterobacteriaceae*, відносяться до роду *Pantoea*. Ізоляти цих бактерій з води та ґрунту використовуються для промислових цілей, фіксують азот та сприяють росту рослин, що може бути корисно для сільськогосподарського застосування [7]. Деякі ізоляти є продуцентами антибіотичних речовин і агентами біоконтролю збудників хвороб рослин [3, 7].

На сьогодні одним із найбільш перспективних є вид *P. agglomerans*, так як штами даного мікроорганізму можуть бути антагоністами фітопатогенів, мають антибактеріальну та антифунгальну активність, здатні до конкуренції при колонізації рослин [10], тому препарати на основі *P. agglomerans* застосовуються проти збудника бактеріального опіку яблуні та груші – *Erwinia amylovora*, та інших бактеріозів [1].

Вивчення антибактеріальних властивостей метаболітів *P. agglomerans* може суттєво сприяти у вирішенні актуальних проблем сільського господарства. Важливий механізм пригнічення фітопатогенів полягає в конкуренції за джерела живлення. Ефективним засобом в ній є бактеріальні сидерофори, низькомолекулярні речовини, які хелатують йони Fe<sup>3+</sup>, та транспортують їх в клітину. Сучасні дослідження дозволяють стверджувати, що залізо є універсальним фактором, що обмежує ріст мікроорганізмів. Тому в процесі еволю-



ції винайшли засоби отримання заліза в умовах його дефіциту в середовищі, що значно підвищило їх конкурентоспроможність у відносинах з іншими бактеріями [4, 11]. Таким чином, антибактеріальний ефект досягається завдяки зниженню вмісту доступного заліза, що обмежує здатність патогенів до розмноження [5, 9]. Відомо, що більшість аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів синтезують хоча б один сидерофор [4, 8].

Метою даної роботи було проведення скринінгу штамів-продуцентів сидерофорів серед бактерій *P. agglomerans*.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження слугували 19 штамів бактерій *P. agglomerans*, отримані з музею кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І. І. Мечникова (25(1)1, 1В В., 1О., 1, 1І, 1ІІ, 1ІV, 1V, 1VI, 9/7(O)2yellow, 9/7(O)2white, 4O white, 4Oyellow) та з колекції Інституту мікробіології і вірусології НАН України імені Д.К. Заболотного (9/7-2, g150white, g150yellow, g157, g157/RI, 28/2-1). «Yellow» в назві штаму означає, що бактеріальні колонії даного штаму набувають яскраво жовтого кольору при 3–5-добовому культивуванні при освітленні. «White» – означає, що колонії депігментовані. Як контроль на наявність сидерофорів використано виділений з рослин штам *Bacillus megaterium* ONU 484 (колекція ОНУ імені І. І. Мечникова) оскільки він є активним продуцентом даних метаболітів і успішно використовується в дослідженнях [2].

Всі штами зберігалися в середовищі Лурія-Бертані (LB) при 4 °С та -80 °С. Для вирощування бактерій використовували рідкі та агаризовані живильні середовища LB, г/л: триптон – 10, дріжджовий екстракт – 5, NaCl – 10. Агаризовані живильні середовища містили 1,5% та 0,7% агар-агару.

Добову культуру готували шляхом перенесення одиночної бактеріальної колонії *P. agglomerans* з чашки Петрі в 5 мл LB-середовища та інкубували при температурі 28 °С протягом 24 годин з інтенсивною аерацією з використанням шейкера-інкубатора New Brunswick Innova®43 (Німеччина).

Бактеріальні штами *P. agglomerans* перевіряли на здатність продукувати сидерофори за допомогою універсального CAS-аналізу [12]. Використовували набір реагентів фірми ACROS ORGANICS (Індія). Послідовно в скляних колбах готували наступні розчини: А: розчиняли 0,0605 г хромазурила S у 50 мл дистильованої H<sub>2</sub>O; Б: розчиняли 0,0027 г 1мМ FeCl<sub>3</sub>·x6 H<sub>2</sub>O у 10 мл 10 мМ HCl; В: розчиняли 0,073 г гексадецилтриметиламоній броміда у 40 мл дистильованої H<sub>2</sub>O.

Розчин А змішували з 10 мл розчину Б, потім отриману суміш додавали при постійному струшуванні до розчину В. Отриманий розчин (100 мл) синього кольору автоклавували при 0,5 атм протягом 30 хв, додавали до 900 мл автоклавованого середовища LB з рН 6,8 та розливали в стерильні чашки Петрі. Після цього додавали 5мл добової культури в центр чашки Петрі і залишали на 5–10 хв у ламінарному боксі для підсихання крапель. Культивування проводили при температурі 28 °С впродовж 5–7 діб [12].

Експеримент проводили у трьох повторях, результати обробляли статистично з використанням пакета програм Microsoft Excel 2010. Продукцію сиде-



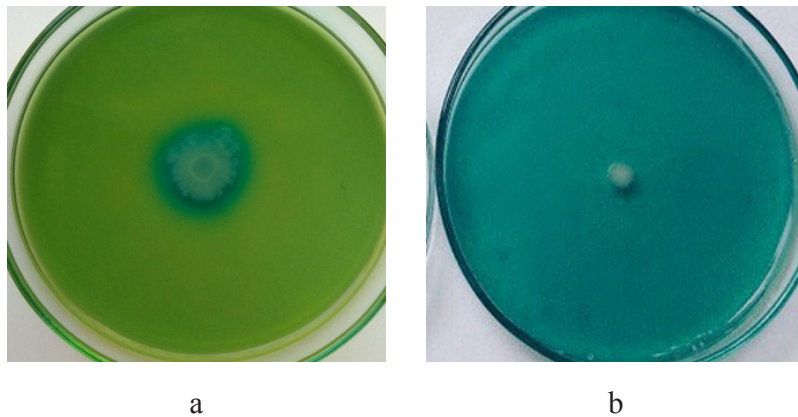
рофорів визначали на підставі якісної оцінки утилізації заліза на CAS-агарі.

Концентрацію клітин у суспензіях досліджуваних культур бактерій вимірювали за допомогою спектрофотометра Bio-Rad «Smart Spec™ Plus» (США) при довжині хвилі 600 нм.

### Результати та їх обговорення

Відомо, що бактерії *P. agglomerans* здатні продукувати широкий спектр метаболітів, у тому числі сидерофори, основна функція яких полягає в переведенні заліза, пов'язаного з білками або водонерозчинними сполуками, в доступну для мікроорганізмів йонну форму  $Fe^{3+}$  [6, 11]. У грамнегативних бактерій, в тому числі *P. agglomerans*, комплекс сидерофор- $Fe^{3+}$  повинен подолати зовнішню мембрану клітинної стінки і цитоплазматичну мембрану. Для перенесення цього комплексу через мембрану грамнегативні бактерії мають спеціалізовані білки-рецептори, що зв'язують комплекс сидерофор- $Fe^{3+}$  і здійснюють його активний транспорт в периплазматичний простір проти градієнта концентрації [4, 8].

Проаналізувавши літературні [11, 12] та одержані дані можна стверджувати, що бактерії, які здатні синтезувати сидерофори, поглинають йони заліза з живильного середовища та змінюють його колір з синього на жовтий (рис. 1) залежно від інтенсивності продукції даних метаболітів. Зміна кольору CAS-агару відбувається за рахунок зв'язування хелатувильними агентами йонів  $Fe^{3+}$ , що викликає перекомплексування та вивільнення хромазурулу S.



**Рис. 1. Колонії *P. agglomerans* на CAS-агарі**  
 а) штамп *P. agglomerans* I – зміна кольору CAS-агару за рахунок утилізації заліза бактеріями ; б) штамп *P. agglomerans* 9/7(O)2yellow – не продукує сидерофорів, колір CAS-агару не змінюється

**Fig. 1. *P. agglomerans* bacteria colonies on CAS-agar:**  
 а) Strain *P. agglomerans* I – color change of CAS-agar due to the iron utilization by bacteria; б) Strain *P. agglomerans* 9/7(O)2yellow – does not produce siderophores (the color of CAS-agar is not changed)

Колонії штаму *B. megaterium* ONU 484, який було використано як позитивний контроль, змінювали колір CAS-агару за рахунок продукції сидеро-



форів і утилізації заліза. Контрольний зразок з CAS середовищем мав яскраво синє забарвлення.

Перші ознаки наявності сидерофорів в середовищі спостерігалися вже на третю добу від початку експерименту. З даних, наведених в таблиці 1, видно, що здатність штамів *P. agglomerans* продукувати ці метаболіти варіює. Концентрації клітин становили  $1,22 \times 10^9 \pm 0,32$  –  $2,00 \times 10^9 \pm 0,01$  кл/мл (табл. 1).

Таблиця 1

Якісна оцінка продукування сидерофорів штамми *P. agglomerans* за допомогою CAS-аналізу

Table 1

Qualitative estimation of siderophore production of *P. agglomerans* strains by CAS-assay

Штам <i>P. agglomerans</i>	Концентрація клітин, $\times 10^9$ /мл	Результати CAS-тесту
9/7-2	1,62±0,07	++
g150white	1,41±0,27	++
g150yellow	1,49±0,26	+++
g157	1,54±0,28	++
g157/RI	1,22±0,32	++
28/2-1	1,94±0,06	+++
25(1)1	1,48±0,18	+
1O	1,93±0,08	+++
IB B.	1,61±0,13	+++
4Owhite	2,00±0,01	+++
4Oyellow	1,65±0,15	+++
9/7(O)2yellow	1,37±0,11	–
9/7(O)2white	1,94±0,09	+++
I	1,48±0,11	+++
II	1,41±0,04	+++
III	1,51±0,34	++
IV	1,50±0,29	+++
V	1,65±0,01	+++
VI	1,72±0,18	+++

Примітка: Дані представлені середнім значенням  $\pm$  стандартне відхилення, n=3. Висока продукція сидерофорів (+++), середня продукція сидерофорів (++) , низька продукція сидерофорів (+), відсутність продукції сидерофорів (-).

Note: Data are represented by the mean  $\pm$  standard deviation, n=3. High siderophore production (+++), medium siderophore production (++) , low siderophore production(+), no siderophore production (-).

В процесі дослідження визначено, що максимальну здатність до виробництва сидерофорів показали 63,2% штамів *P. agglomerans* (рис. 1a), 26,3% штамів синтезували дані сполуки на середньому рівні та лише у штаму *P. agglomerans* 25(1)1, спостерігався низький рівень продукції сидерофорів



(табл.1). Бактерії штаму *P. agglomerans* 9/7(O)2yellow виявилися взагалі нездатним до синтезу сидерофорів (рис. 2b)/

Слід зазначити, що здатність до синтезу сидерофорів бактеріями *P. agglomerans* значно підвищує їх конкурентоспроможність у відносинах з іншими мікроорганізмами. Зв'язування заліза сидерофорами *P. agglomerans* призводить до дефіциту заліза, що в свою чергу, обмежує чисельність та пригнічує ріст патогенів рослин. Отже можна припустити, що дані сполуки здатні сприяти прояву антагоністичних властивостей цих бактерій. Застосування штамів даних мікроорганізмів може бути найбільш ефективним у періоди активного поширення інфекції бактеріального опіку плодівих – під час цвітіння і при появі на уражених частинах рослин ексудату. Так можна знизити поширення збудника, а також зменшити ураження зав'язі, що позитивно вплине на врожайність [10].

Використання *P. agglomerans* зростає завдяки виявленню нових штамів даних бактерій, які є все більш ефективними в боротьбі з патогенними мікроорганізмами. З літератури відомо про штам *P. agglomerans* lma2, бактерії якого є активними продуцентами сидерофорів та низки інших речовин, і який успішно застосовується в аграрній сфері [13]. Таким чином, в результаті скринінгових досліджень показано, що штами *P. agglomerans* (g150yellow, 28/2-1, 10., ІВ В., 4Owhite, 4Oyellow, 9/7(O)2white, I, II, IV, V, VI) з високою здатністю до синтезу сидерофорів, можуть бути перспективними для подальших досліджень з розробки біопрепаратів біологічного контролю фітопатогенних бактерій.

**И. Д. Жунько, А. И. Жуминская**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одеса, 65082, Украина,  
тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: zhunkinn@gmail.com

## СКРИНИНГ ПРОДУЦЕНТОВ СИДЕРОФОРОВ СРЕДИ ШТАММОВ *PANTOEA AGGLOMERANS*

### Реферат

*Целью работы было проведение скрининга штаммов-продуцентов сидерофоров среди бактерий *P. agglomerans*. Методы. Способность к образованию сидерофоров штаммами *P. agglomerans* исследовали с помощью хромазурол S (CAS)-анализа. В качестве индикатора использовали трехкомпонентный комплекс: хромазурол S, железо (III) и гексадецилтриметиламмоний бромид (НДТМА). Продукцию сидерофоров определяли на основании качественной оценки утилизации железа в CAS-агаре. Результаты. Бактерии, которые были способны синтезировать сидерофоры, поглощали ионы железа (III) с питательной среды в зависимости от интенсивности продукции данных метаболитов. В результате скрининга 63,2% бактериальных штаммов показали высокую способность к продукции данных веществ. Выводы. Отобранные штаммы могут быть использованы в дальнейших биотехнологических исследованиях.*

*Ключевые слова: *Pantoea agglomerans*, скрининг, сидерофоры, CAS-анализ, Fe<sup>3+</sup>.*



**I. D. Zhunko, G. I. Zhuminska**

Odessa I. I. Mechnikov National University,  
2, Dvoryanska str., Odessa, 65082, Ukraine,  
tel.: +38 (0482) 68 79 64; e-mail: zhunkinn@gmail.com

## SCREENING OF SIDEROPHORE PRODUCERS AMONG *PANTOEA AGGLOMERANS* STRAINS

### Summary

**Aim.** Screening of siderophore-producing strains of *P. agglomerans*. **Methods.** The siderophore-producing ability of *P. agglomerans* strains have been investigated by using of chrome azurol S (CAS) assay. The ternary complex of chrome azurol S, iron(III), hexadecyltrimethyl-ammonium bromide (HDTMA) was used as an indicator. Siderophore production was determined by qualitative estimation of iron utilization in CAS-agar. **Results.** Bacteria able to synthesize siderophores uptook iron ions (III) from the nutrient medium depending on the intensity production of these metabolites. As a result of screening, 63.2% of the bacterial strains showed high ability to synthesize of these substances. **Conclusions.** Selected strains can be used in further biotechnological research.

*Key words:* *Pantoea agglomerans*, screening, siderophores, CAS assay,  $Fe^{3+}$ .

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Булигіна Т. В., Варбанець Л. Д., Пасічник Л. А., Житкевич Н. В. Резистентність до антимікробних препаратів бактерій *Pantoea agglomerans* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2016. – № 1. – С. 68–75.
2. Защинська О. С. Мікробні сидерофори як можливі фактори антагонізму бактерій *Bacillus megaterium* щодо патогенних *Agrobacterium spp.* // Збірка матеріалів наукового товариства студентів, аспірантів і молодих учених. – Одеса: Репозитарій наукової бібліотеки ОНУ імені І. І. Мечникова, 2019. – С. 17–18.
3. Іваниця Т. В., Страшнова І. В., Смальчук Д. С. Загальна характеристика бактерій роду *Pantoea* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2018. – № 3. – С. 6–25.
4. Леонов В. В., Миронов, А. Ю., Ананьїна І. В., Рубальская Е. Е., Сентюрлова Л. Г. Микробные сидерофоры: строение, свойства и функции // Астраханский медицинский журнал. – 2016. – Т. 11, № 4. – С. 24–37.
5. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia L. M. Plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents // Genet. Mol. Biol. – 2012. – V. 35. – P. 1044–1051.
6. Berner I., Konetschny-Rapp S., Jung G., Winkelmann G. Characterization of ferrioxamine E as the principal siderophore of *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*) // Biology of Metals. 1988 – V. 1, № 1. – P. 51–56.
7. Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Kinga Lemieszek M., Golec M., Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants // Annals of Agricultural and Environmental Medicine. – 2016. – V. 23, № 2. – P. 197–205.
8. Neilands J. B. Siderophores: Structure and function of microbial iron



- transport compounds // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270, № 45. – P. 26723–26726.
9. Parmar H. Y., Chakraborty H. Effect of siderophore on plant growth promotion // *Int. J. Appl. Pure. Sci. Agric.* – 2016. – V. 2, № 3. – P. 60–68.
10. Poppe L., Vanhoutte S., Hofte M. Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA – 2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits // *European Journal of Plant Pathology.* – 2003. – V. 109, N 9. – P. 963–973.
11. Raymond K. N., Allred B. E., Sia A. K. Coordination chemistry of microbial iron transport // *Acc. Chem. Res.* – 2015. – V. 48. – P. 2496–2505.
12. Schwyn B., Neilands J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore // *Analytical Biochemistry* – 1987. – V. 160. – P. 47–56.
13. Silini-Cherif H, Silini A, Ghoul M, Yadav S. Isolation and characterization of Plant Growth Promoting traits of a Rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* lma2. *Pakistan Journal of Biological Sciences* – 2012. – V. 15. – P. 267–276.

### References

1. Bulyhina TV, Varbanets LD, Pasichnyk LA, Zhitkevych NV. Antibiotic resistance of *Pantoea agglomerans* // *Microbiology and Biotechnology.* 2016;(1):68–75. Ukrainian.
2. Zashchynska OS. Microbial siderophores as possible antagonism factors of *Bacillus megaterium* bacteria against pathogenic *Agrobacterium* spp. In: *Proceedings of Scientific Society of students, PhD students and young scientists, Odessa: Repository of ONU I.I. Mechnikov, 2019:17–18.* Ukrainian.
3. Ivanytsia TV, Strashnova IV, Smalchuk DS. Characteristics of bacterial genus *Pantoea* // *Microbiology and Biotechnology.* 2018;(3):6–25. Ukrainian.
4. Leonov VV, Mironov AYu, Anan'ina IV, Rubalskaya EE, Sentyurova LG. Siderophores of microbes: structure, properties and functions // *Astrakhan Medical Journal.* 2016;11(4):24–37. Russian.
5. Beneduzi A, Ambrosini A, Passaglia LM. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents // *Genet Mol Biol.* 2012;(35):1044–1051.
6. Berner I, Konetschny-Rapp S, Jung G, Winkelmann G. Characterization of ferrioxamine E as the principal siderophore of *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*) // *Biology of Metals.* 1988;1(1):51–56.
7. Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Kinga Lemieszek M, Golec M, Milanowski J. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 2016;23(2):197–205.
8. Neilands JB. Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds // *J Biol Chem.* 1995;270(45):26723–26726.
9. Parmar HY, Chakraborty H. Effect of siderophore on plant growth promotion // *Int J Appl Pure Sci Agric.* 2016;2(3):60–68.
10. Poppe L, Vanhoutte S, Hofte M. Modes of action of *Pantoea agglomerans* CPA – 2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits // *European Journal of Plant Pathology.* 2003;109(9):963–973.
11. Raymond KN, Allred BE, Sia AK. Coordination chemistry of microbial



iron transport // *Acc Chem Res.* 2015;(48):2496–2505.

12. Schwyn B, Neilands J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore // *Analytical Biochemistry.* 1987;(160):47–56.

13. Silini-Cherif H, Silini A, Ghoul M, Yadav S. Isolation and characterization of Plant Growth Promoting traits of a Rhizobacteria: *Pantoea agglomerans* lma2. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2012;(15): 267–276.

Стаття надійшла до редакції 11.07.2019 р.

