

ПРОДУКЦІЯ СИДЕРОФОРІВ БАКТЕРІЯМИ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Мета. Вивчення рівня синтезу сидерофорів бактеріями роду *Pseudomonas* та впливу на нього іонів заліза (III). **Методи.** Здатність до утворення сидерофорів у штамів *P. aeruginosa* (ONU 300, ONU 301, ONU 302), *P. fluorescens* ONU 303 та *P. aureofaciens* (ONU 304, ONU 305, ONU 306) вивчали з використанням CAS-азару. Інтенсивність росту та продукції півердинових біохелаторів досліджуваних культур у рідкому варіанті середовища Кінга визначали, відповідно, при довжинах хвиль 660 нм та 400 нм з використанням хром-азурола S. **Результати.** За інтенсивністю накопичення сидерофорів різні штами одного виду відрізнялися один від одного. Найбільш активна продукція сидерофорів спостерігалася у представників *P. aeruginosa* та *P. fluorescens*. Додаткове внесення іонів заліза (III) супроводжувалося змінами кількості клітин та інтенсивності накопичення ними сидерофорів. Додавання заліза у середовище культивування псевдомонад призвело до підвищення кількості клітин у суспензії. Проте, концентрація сидерофорів, що утворювались даними мікроорганізмами, за присутності 30 мкг/мл іонів заліза (III) зменшилась у 2–7 разів, а при 1000 мкг/мл – синтез досліджуваних сполук більшістю штамів псевдомонад практично повністю припинився. **Висновок.** Присутність у поживному середовищі іонів заліза (III) у концентрації 30 та 1000 мкг/мл гальмує накопичення сидерофорів бактеріями роду *Pseudomonas*.

Ключові слова: сидерофори, *Pseudomonas* spp., півердини, Fe³⁺.

За присутності кисню у доквіллі доступність вільного заліза значно обмежена через низьку розчинність його гідроксидів. Але бактерії та гриби змогли створити специфічну систему, що дозволяє ефективно вилучати іони даного металу з навколишнього середовища и транспортувати їх усередину клітини. Основою даної системи є залізохелатуючі агенти – сидерофори. Це низькомолекулярні сполуки (як правило, менше 1 кДа), які діють як ентросорбенти з високим ступенем спорідненості до Fe (III). Доведено, що за структурою та властивостями сидерофори є досить різноманітними речовинами. Єдиним для всіх подібних сполук є той факт, що індукція їхньої продукції мікроорганізмами відбувається при зменшенні внутрішньоклітинного вмісту заліза до 10⁻⁶ М, яке використовується як кофактор ферментів [10, 13].

Бактерії роду *Pseudomonas*, які вже давно привертають увагу як продуценти широкого спектра біологічно активних речовин, синтезують понад 100 різних видів сидерофорів, серед яких є первинні флуоресцентні сидерофори, т.зв. півердинові похідні. Більшість з них представляють собою молекули, до складу



яких входить короткий пептид, зв'язаний одним кінцем з діоксіхіноліновим ядром – 2,3-діаміно-6,7-діоксіхоліном [12]. Вони є унікальними сполуками з надзвичайно високою хелатною іоноздатністю (константа зв'язування Fe^{3+} у цих комплексах досягає 10^{25} при рН 7,0), що утворюються тільки даними мікроорганізмами [4].

Значну кількість випадків антагоністичних взаємовідносин, у яких беруть участь *Pseudomonas spp.*, визначає продукція саме піовердинових сидерофорів: за цим шляхом, наприклад, відбувається пригнічення ризосферними псевдомонадами ґрунтових фітопатогенів [3, 14]. На даний час розроблено технологію отримання деяких біопрепаратів, до складу яких входять сидерофори, що застосовуються у сільському господарстві [11].

Показано, що сидерофори бактерій роду *Pseudomonas* здатні утворювати комплекси з іонами одно- (Hg^+ , Cu^+ , Cs^+), дво- (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+}), трьох- (Al^{3+} , Cr^{3+}) та шестивалентних (Mo^{6+} , W^{6+}) металів. Отже, існує можливість їх використання не тільки у агробіотехнологічному комплексі, а й для біоремедіації різних середовищ [7].

Метою даної роботи було вивчення рівня синтезу сидерофорів представниками роду *Pseudomonas* та впливу на нього іонів заліза (III).

Матеріали та методи

У роботі використовували штами бактерій роду *Pseudomonas*: *Pseudomonas aureofaciens* (ONU 304, ONU 305, ONU 306), *P. fluorescens* ONU 303, ізольовані з ризосфери рослин, та *P. aeruginosa* (ONU 300 = ATCC 15692, ONU 301 = ATCC 27853, ONU 302 = ATCC 10145), отримані з музею культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова.

Визначення сидерофорів проводили з використанням добових культур досліджуваних мікроорганізмів, які отримували згідно з [1]. Бактерії *P. aureofaciens* та *P. fluorescens* вирощували за температури 22 °С, *P. aeruginosa* – за 37 °С.

Якісне визначення сидерофорів здійснювали за допомогою хром-азурола S, на основі якого готували CAS-агар (chrome azurol S-blue agar) [6]. Бактерії, що виробляли сидерофори, змінювали колір CAS-агару.

Для визначення кількості сидерофорів, що утворюються досліджуваними бактеріями, вихідні суспензії клітин їх стандартизували до концентрації 10^{11} кл/мл та 0,01 мл відповідної суспензії вносили у 0,99 мл середовища Кінга із різними вмістами іонів заліза, перемішували та культивували до початку стаціонарної фази росту бактерій у стерильних полістиролових планшетах. Після того осаджували центрифугуванням при 322 g впродовж 25 хв. Визначення концентрації сидерофорів проводили у супернатанті поживного середовища кожного з обраних штамів псевдомонад через 48 год культивування за [9]. Концентрацію клітин у суспензіях досліджуваних культур бактерій визначали спектрофотометрично («Spekol-10», Німеччина) [1].

Усі дослідження проводили у 6 повторах. При порівняльному аналізі результатів досліджень використовувався t-критерій Стьюдента. Достовірною вважалася різниця при показнику $p \leq 0,05$.



Результати та їх обговорення

Використання у роботі CAS-агару – «блакитного агару», який змінює забарвлення через зв'язування хелатуючими агентами іонів заліза у його складі, дозволило визначити здатність різних досліджуваних псевдомонад утворювати сидерофори. Хром-азурол S є сполукою, що утворює специфічний комплекс блакитного кольору із залізом, яке входить до складу цього середовища. Мікроорганізми, продукуючи сидерофори (більш специфічні хелатори Fe^{3+}), викликають перекомплексування та вивільнення хром-азуролу S, що супроводжується зміною забарвлення середовища з блакитного на жовто-гарячковий.

Найбільш інтенсивне пожовтіння середовища було зафіксовано для штамів, що належать до виду *P. aeruginosa* (ONU 300, ONU 301, ONU 302), та представників ризосферних мікроорганізмів *P. aureofaciens* ONU 304 та *P. fluorescens* ONU 303.

З даних літератури відомо, що найбільш інтенсивна продукція різних вторинних метаболітів, зокрема сидерофорів, відбувається у культурах, які переходять у стаціонарну фазу росту [1]. Отже, на наступному етапі досліджень було проведено спостереження за ростом культур у рідкому середовищі Кінга, аналог якого використовується для ідентифікації, культивування та визначення здатності до синтезу пігментів у представників родини *Pseudomonadaceae* [10] (рис. 1).

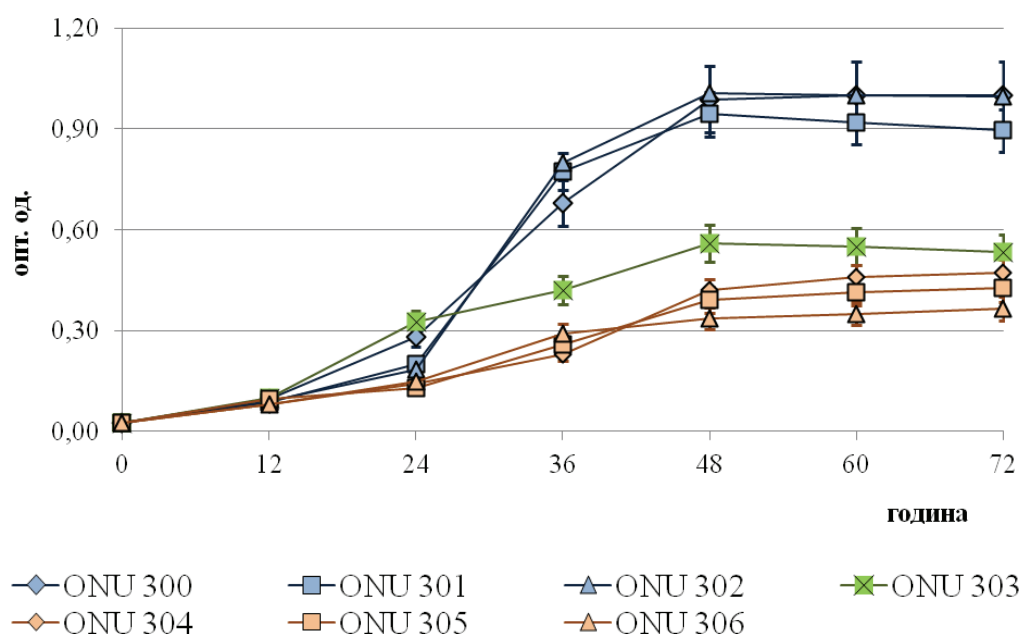


Рис. 1. Динаміка росту *Pseudomonas spp.* у рідкому поживному середовищі

Fig. 1. Dynamics of *Pseudomonas spp.* growth in liquid nutrient medium



В роботі було зафіксовано, що між 48 та 60 годинами рівень оптичної щільності суспензій практично не змінювався, що свідчить про уповільнення процесу розмноження мікроорганізмів та настання стаціонарної фази росту цих культур у використаному середовищі.

Визначення вмісту сидерофорів, які утворюються бактеріями у стаціонарній фазі росту, у подальшому проводили через 48 годин культивування мікроорганізмів.

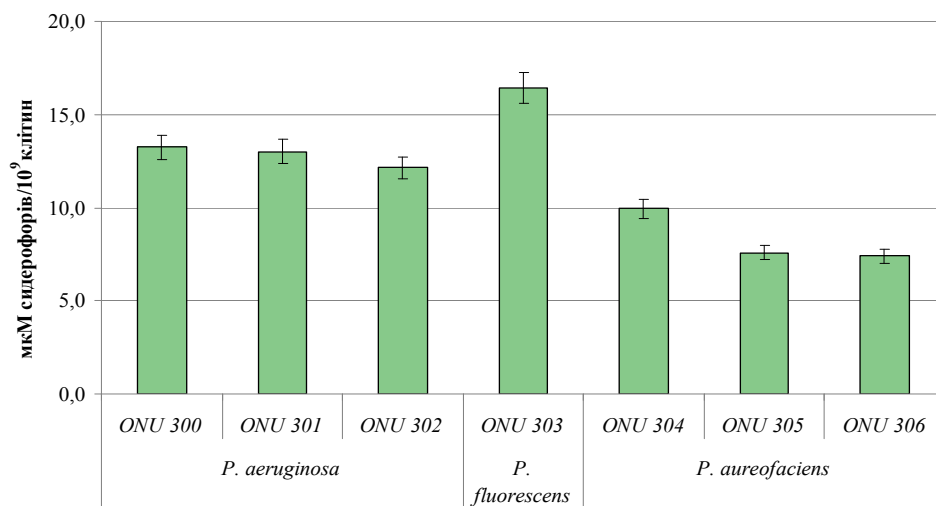


Рис. 2. Вихідний рівень продукції сидерофорів досліджуваними штамми псевдомонад

Fig. 2. The basic siderophore production by the studied *Pseudomonas* strains

Встановлено, що через 48 год. культивування найбільше первинних сидерофорів синтезує штам *P. fluorescens* ONU 303 – до 16,5 мкМ / 10⁹ кл. Дещо менше (на 2,5–4,5 мкМ / 10⁹ кл) досліджуваних сполук виявлено для представників виду *P. aeruginosa*. Серед *P. aureofaciens* найбільшу кількість сидерофорів продукував штам ONU 304 (10,0 мкМ / 10⁹ кл), тоді як два інших – лише 7,4–7,6 мкМ / 10⁹ кл у суспензії. Отже, за інтенсивністю накопичення первинних сидерофорів представники різних видів псевдомонад суттєво відрізнялись один від одного.

Створення біопрепаратів з використанням ризосферних мікроорганізмів починається з визначення їх синтетичного потенціалу, зокрема продукції сидерофорів, за різних умов культивування. Це дозволяє оцінити перспективність їх використання у ґрунтах різних типів та з різним вмістом заліза, тобто встановити «універсальність» майбутнього мікробіологічного препарату [8].

В роботі було проведено визначення впливу двох концентрацій Fe³⁺ (30 мкг/мл, що відповідає вмісту заліза у чорноземі, та 1000 мкг/мл – гранично допустима концентрація сполук даного елемента [2]) на ріст досліджуваних культур та синтез ними сидерофорів (табл.).

Синтез сидерофорів досліджуваними штамами псевдомонад за присутності іонів заліза (III)

Siderophore synthesis by the studied *Pseudomonas* strains in the iron ion (III) presence

Штам	Контроль без Fe(III)		30 мкг Fe(III)/мл		1000 мкг Fe(III)/мл	
	Концентрація клітин, $\cdot 10^9$ /мл	Сидерофори, мкМ / 10^9 кл	Концентрація клітин, $\cdot 10^9$ /мл	Сидерофори, мкМ / 10^9 кл	Концентрація клітин, $\cdot 10^9$ /мл	Сидерофори, мкМ / 10^9 кл
<i>P. aeruginosa</i> ONU 300	4,5±0,2	13,2±0,4	5,9±0,2*	8,2±0,3**	12,6±0,4 [#]	0,0 ^{##}
<i>P. aeruginosa</i> ONU 301	4,3±0,3	13,0±0,4	7,7±0,3*	4,3±0,2**	12,0±0,4 [#]	0,0 ^{##}
<i>P. aeruginosa</i> ONU 302	4,8±0,2	12,1±0,2	10,0±0,3*	4,2±0,1**	12,2±0,3 [#]	0,1±0,02 ^{##}
<i>P. fluorescens</i> ONU 303	2,6±0,2	16,5±0,3	9,0±0,3*	1,2±0,1**	12,2±0,4 [#]	0,1±0,01 ^{##}
<i>P. aureofaciens</i> ONU 304	1,5±0,1	9,9±0,1	4,2±0,1*	2,0±0,2**	7,3±0,1 [#]	0,3±0,1 ^{##}
<i>P. aureofaciens</i> ONU 305	1,8±0,1	7,6±0,2	5,1±0,2*	1,7±0,1**	8,0±0,2 [#]	0,2±0,01 ^{##}
<i>P. aureofaciens</i> ONU 306	1,5±0,1	7,4±0,2	5,0±0,1*	2,1±0,2**	7,7±0,3 [#]	0,2±0,01 ^{##}

Примітка: * або ** – різниця вірогідна у порівнянні з відповідними значеннями, отриманими у поживному середовищі без внесення сполук заліза (при $P < 0,05$); [#] або ^{##} – різниця вірогідна у порівнянні зі значеннями, отриманими у середовищі з 30 мкг/мл Fe^{3+} (при $P < 0,05$).

Наявність іонів заліза (III) виявляли на зміни як кількості клітин, так й інтенсивності утворення ними сидерофорів.

Встановлено, що присутність в середовищі Fe^{3+} у 1,3–5,0 разів збільшує концентрацію досліджуваних бактерій. Найбільший стимулюючий вплив тривалентне заліза здійснювало у концентрації 1000 мкг/мл на штами *P. fluorescens* та *P. aureofaciens*. Очевидно, залізо, приймаючи участь у значній кількості внутрішньоклітинних процесів (наприклад, транспорті кисню, синтезі АТФ [5]) та входячи до складу такого ферменту, як рибонуклетид редуктаза, що є ключовим у синтезі ДНК, та цитохромів у системі переносу електронів, активізує ріст бактерій роду *Pseudomonas*.

Для продукції сидерофорів спостерігалась зворотна тенденція – додаткове внесення у поживне середовище Fe^{3+} викликало пригнічення продукції цих сполук. При цьому, за присутності 30 мкг/мл іонів заліза (III) концентрація сидерофорів, що утворювались даними мікроорганізмами, зменшилась у 2–7 разів. Найбільшу різницю (у більш ніж 10 разів, порівнюючи з вихідним рівнем продукції сидерофорів) було зафіксовано для штаму *P. fluorescens* ONU 303.



Порядок розміщення досліджуваних культур від найбільшого до найслабшого продуцента сидерофорів виявився наступним: *P. aeruginosa* ONU 300 > *P. aeruginosa* ONU 301 > *P. aeruginosa* ONU 302 > *P. aureofaciens* ONU 306 > *P. aureofaciens* ONU 304 > *P. aureofaciens* ONU 305 > *P. fluorescens* ONU 303.

При збільшенні вмісту заліза (III) у середовищі, де відбувалось культивування псевдомонад, до 1000 мкг/мл встановлено повне припинення синтезу сидерофорів. Для штамів *P. aeruginosa* ONU 300 та ONU 301 взагалі не було виявлено досліджуваних сполук. Найвища кількість сидерофорів за цієї концентрації Fe^{3+} , продукувалася штамми *P. aureofaciens*, дещо менша – культурою *P. fluorescens*.

Отже, значне зниження кількості досліджуваних сполук відбулось, очевидно, через підвищення вмісту заліза (III) у поживному середовищі, яке спричинило, очевидно, пригнічення синтезу сидерофорів у псевдомонад через зв'язування з Fur-протеїном, який репресує транскрипцію генів, що кодують специфічні σ -фактори синтезу піовердинів [8].

Таким чином, порівнюючи ріст бактеріальних культур та накопичення ними піовердинових сидерофорів, було визначено, що на тлі підвищення біомаси досліджуваних мікроорганізмів їхня здатність продукувати біохелатори, які забезпечують використання у метаболічних процесах клітин іонів заліза (III), суттєво пригнічується під час зростання його концентрації у навколишньому середовищі. Отже, при подальшому дослідженні продукції сидерофорів серед мікроорганізмів роду *Pseudomonas* необхідно враховувати специфічність даного процесу, що дозволить визначати можливість використання окремих штамів для створення біологічних препаратів.

**М.Ю. Русакова, Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова, В.В. Ивах,
А.А. Титлянов**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

ПРОДУКЦІЯ СИДЕРОФОРІВ БАКТЕРІЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*

Реферат

Цель. Исследование уровня синтеза сидерофоров бактериями рода *Pseudomonas*.

Методы. Способность к образованию сидерофоров среди штаммов *P. aeruginosa* (ONU 300, ONU 301, ONU 302), *P. fluorescens* ONU 303 и *P. aureofaciens* (ONU 304, ONU 305, ONU 306) изучали с использованием CAS-агара. Интенсивность роста и продукции пиовердиновых биохелаторов исследуемых культур в жидком варианте среды Кинга определяли соответственно при длинах волн 660 нм и 400 нм с использованием хром-азурола S. **Результаты.** По интенсивности накопления сидерофоров представители разных штаммов одного вида отличались один от другого. Наиболее активная продукция сидерофоров наблюдалась среди культур *P. aeruginosa* и *P. fluorescens*. Дополнительно внесенные ионы железа



(III) определили изменения количества клеток и интенсивности образования ими сидерофоров. Внесение железа в среду, в которой происходило культивирование псевдомонад, привело к повышению количества клеток в суспензии. Однако, концентрация сидерофоров, которые синтезируются данными микроорганизмами, в присутствии 30 мкг/мл ионов железа (III) уменьшилась в 2–7 раз, а при 1000 мкг/мл – синтез исследуемых соединений большинством штаммов псевдомонад практически полностью прекратился. **Выводы.** Присутствие в питательной среде ионов железа (III) в концентрации 30 и 1000 мкг/мл тормозит накопление сидерофоров бактериями рода *Pseudomonas*.

Ключевые слова: сидерофоры, *Pseudomonas spp.*, пиовердины, Fe^{3+} .

M.Yu. Rusakova, B.M. Galkin, T.O. Filipova, V.V. Ivah, O.O. Titlianov

I.I. Mechnykov Odesa National University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: rusamariya@onu.edu.ua

THE SIDEROPHORE PRODUCTION BY *PSEUDOMONAS* BACTERIA

Summary

Aim. The study of the siderophore synthesis by *Pseudomonas* genus bacteria. **Methods.** The siderophore production ability of *P. aeruginosa* (ONU 300, ONU 301, ONU 302), *P. fluorescens* ONU 303 and *P. aureofaciens* (ONU 304, ONU 305, ONU 306) strains was studied by using of CAS-agar. The intensity of growth and pyoverdin biochelator production of the studied cultures in liquid King medium variant was determined, respectively, at the wavelengths of 660 nm and 400 nm with using of chrome-azurols. **Results.** According to the intensity of siderophore accumulation by the representatives of different strains the same species distinguished from each other. The most active siderophore production was observed among *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* cultures. The iron ions (III) that were additionally added resulted the changes both the cell quantity and siderophore synthesis intensity. Adding iron to the medium in which *Pseudomonas* cultured, was resulting in increased cell number in suspension. However, concentration of siderophores, which are synthesized by these microorganisms, in the presence of 30 $\mu\text{g/ml}$ of iron (III) decreased by 2–7 fold, and at 1000 $\mu\text{g/ml}$ – synthesis of tested compounds by most *Pseudomonas* strains practically completely ceased. **Conclusions.** Presence of iron ions (III) in nutrient medium at concentration 30 and 1000 $\mu\text{g/ml}$ slowed down the accumulation of siderophores by bacteria of *Pseudomonas* genus.

Key words: siderophores, *Pseudomonas spp.*, pyoverdins, Fe^{3+} .

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Идентификация и характеристика пиовердина Pm – нового антирадикального соединения, синтезируемого бактериями *Pseudomonas putida* КМБУ4308 / Кулешова Ю.М., Максимова Н.П., Блажевич О.В., Семак И.В. // Труды Белорусского государственного университета. – 2006. – № 1. – С. 89–97.



2. *Методика* визначення розмірів шкоди, зумовленої забрудненням і засміченням земельних ресурсів через порушення природоохоронного законодавства (Із змінами, внесеними згідно з Наказом Міністерства охорони навколишнього природного середовища N 149 (z0422-07) від 04.04.2007).

3. *Мошинець О.В., Косаківська І.В.* Фітосфера як екологічна ніша рослинно-мікробних взаємовідносин. Функціональна активність мікроорганізмів та їхній вплив на рослини // Вісник харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2010. – № 3. – С. 6–22.

4. *Demange P.* *Pseudomonas* siderofores: Structure and physicochemical properties of pyoverdins and related peptides // Second Forum on Peptides. – 2009. – V. 174. – № 1. – P. 95–98.

5. *Microbial* iron transport via a siderophore shuttle: a membrane ion transport paradigm / Stintzi A., Carmen B., Jide X., Kenneth N.R. // J. Chem. – 2009. – V. 344, № 6. – P. 379–383.

6. *Neilands J.B.* Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 45. – P. 26723–26726.

7. *Siderophores* in environmental research: roles and applications / Ahmed E., Holmstrom S. J. M. // Microbial Biotechnology. – 2014. – V. 7. – P. 196–208.

8. *Siderophores* in Plant Iron Acquisition: Geochemical Aspects / Kraemer C., Crowley D., Kretzschmar R. // Advances in Agronomy. – 2006. – V. 91. – P. 1–46.

9. *Siderotyping* of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method / Meyer J.M., Gruffaz C., Raharinosy V., Bezverbnaya I., Schäfer M., Budzikiewicz H. // Biometals. – 2008. – V. 25. – P. 259–271.

10. *Structure*, properties and transport mechanism of iron(III) complex of mugineic acid, a possible phytosiderophore / Sugiura Y., Tanaka H., Mino Y., Ishida T., Ota N., Nomoto K., Yosioka H., Takemoto T. // J. Am. Chem. Soc. – 2011. – V. 64. – P. 6979–6982.

11. *Utilisation* of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. / Raaijmakers J.M., Van der Sluis L., Koster M., Bakker P.M., Weisbeek P.J., Schippers B. // Can. J. Microbiol. – 2005. – V. 42. – P. 126–135.

12. *Varma A., Chincholkar S.* Microbial siderophores // J. Microbiol. – 2007. – V. 12. – P. 43–61.

13. *Visca P., Imperi F., Lamont I.L.* Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance // Trends Microbiol. – 2007. – V. 103. – P. 22–30.

14. *Weller D.M.* *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30years // Phytopathology. – 2007. – V. 97. – P. 250–256.

Стаття надійшла до редакції 08.09.2014 р.

