

СИНТЕЗ ПИРРОЛНИТРИНА БАКТЕРИЯМИ *PSEUDOMONAS AURANTIACA*

И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение

У бактерий рода *Pseudomonas* обнаружено более 300 различных антимикробных соединений, более 100 из которых – антибиотики ароматического строения. Интерес к этим соединениям связан с их способностью подавлять развитие различных патогенов животных и человека (в частности, бактерий *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Trichophyton* и *Mycobacterium*, а также некоторых вирусов), возбудителей болезней растений бактериальной и грибной этиологии, фитопатогенных нематод.

Значительный интерес в этом плане представляет пирролнитрин – ([3-хлоро-4-(2'-нитро-3-хлорофенил)пиррол]) – антибиотик широкого спектра действия, продуцируемый бактериями *Pseudomonas* и *Burkholderia* [1-3]. Активность пирролнитрина обусловлена нарушением работы электрон-транспортной цепи вследствие блока передачи электронов на участке между дегидрогеназой и цитохромом c_1 , что приводит к нарушению клеточного дыхания, и, как следствие, угнетению роста микроорганизмов [4].

В настоящее время пирролнитрин признан одним из самых эффективных антибиотиков по способности подавлять вегетативную и генеративную функции патогенных грибов: на различные грибы-дерматофиты он действует в концентрации 0,07-10 мкг/мл [5-7]. В отношении бактерий действие пирролнитрина является менее выраженным: бактерицидная доза колеблется в пределах 25-100 мкг/мл [6].

Цель работы – выделение и идентификация антибиотика пирролнитрина, а также изучение особенностей его синтеза бактериями *P. aurantiaca* В-162.

Методы исследования

Объектом исследований служил штамм *P. aurantiaca* В-162 из коллекции микроорганизмов Белорусского государственного университета (КМБУ). В качестве тест-систем использовано штаммы фитопатогенных бактерий родов *Erwinia* и *Pseudomonas* и патогенные культуры грибов *Fusarium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botrytis*, *Phytophthora* и *Sclerotinia* из коллекции КМБУ.

При изучении синтеза пирролнитрина бактерии *P. aurantiaca* выращивали в течение 4 сут в среде следующего состава (г/л): пептон – 1, дрожжевой экстракт – 3, NaCl – 0,5, содержащей глюкозу – 5 или глицерин – 30, вода дистиллированная, pH 6,5–7,0.

Фитопатогенные грибы родов *Fusarium*, *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botrytis* и *Sclerotinia* выращивали в течение 7 сут на агаризованной картофельной среде, содержащей глюкозу (0,4%), штаммы *Phytophthora* выращивали в течение 10 сут на овсяной среде, содержащей глюкозу (0,4%). Фитопатогенные бактерии родов *Pseudomonas* и *Erwinia* выращивали в течение 2 сут на агаризованной среде на основе гидролизата кильки.

Выделение пирролнитрина осуществляли по схеме, предложенной K.D. Burkhead [8]. Клетки *P. aurantiaca* В-162 осаждали путем центрифугирования в течение 1 мин (13 000 g) и проводили экстракцию ацетоном, после чего удаляли излишки растворителя с помощью роторного испарителя RV 05-ST (“IKA-Werke” Germany) и осадок растворяли в метаноле. Разделение антимикробных соединений осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии на пластинках Silica Gel 60 F₂₅₄, в качестве подвижной фазы использовали трихлорметан–ацетон (9:1). Идентификацию пирролнитрина осуществляли путем

обработки хроматографических пластинок 1%-ным *n*-диметиламинобензальдегидом в растворе, содержащем 50 мл 36%-ной HCl и 50 мл этанола.

Идентификацию пирролнитрина осуществляли с помощью жидкостного хроматографа с масс-спектрометрическим детектором LCMS-QP8000α (“Shimadzu” Japan). Аликвоту образца объемом 20 мкл наносили на обратнофазную колонку Restec Allure C18 (150×4.6 мм; 5 мкм; 60 Å). Элюцию осуществляли со скоростью 0,75 мл/мин при 40°C мобильной фазой, содержащей ацетонитрил и 0,1%-ную уксусную кислоту. В течение первых 20 мин выдерживался линейный градиент с 20 до 50% ацетонитрила, затем 10 минут от 50 до 100%. Масс-спектрометрический анализ проводили, используя электроспрей-интерфейс, настроенный на отрицательную ионизацию. Напряжение капилляра электроспрея при анализе равнялось -4.5 кВ. Скорость тока азота, применявшегося в качестве распыляющего газа, составляла 4,5 л/мин. Регистрация ионов велась в сканирующем режиме с соотношением масса/заряд в диапазоне 200-300.

Определение биологической активности антибиотиков проводили способом серийных разведений [9].

Результаты и их обсуждение

Анализ метаболитов, накапливаемых клетками *P. aurantiaca* В-162, проведенный с использованием ТСХ, показал наличие пирролнитрина. Идентификацию антибиотика проводили по появлению специфической окраски после обработки пластин соответствующим реагентом [1], а также путем сопоставления подвижности элементов. Появление малиновой окраски элемента со значением *Rf* равным 0,48, доказывает наличие искомого антибиотика в среде, в качестве контрольного варианта использовался пирролнитрин, любезно предоставленный д.б.н. В.Н. Бурдем (Гродненский государственный университет).

Проведенный далее масс-спектрометрический анализ очищенного препарата антибиотика, показал наличие иона с массой 258 (M⁺) (таким образом, истинная молекулярная масса вещества – 257) (C₁₀H₆Cl₂N₂O₂), максимумом поглощения (249 нм) и временем удерживания (31,7 мин) (рис. 1), что соответствует пирролнитрину.

Серия экспериментов была направлена на определение параметров (время культивирования, источник углерода и энергии), обеспечивающих повышение выхода пирролнитрина при культивировании *P. aurantiaca* В-162. Установлено, что антибиотик начинает накапливаться в середине культивирования через 24 ч, а максимальное количество пирролнитрина обнаруживается на третьи-четвертые сутки культивирования бактерий. Сходные данные были ранее получены и для *Burkholderia cepacia* [10].

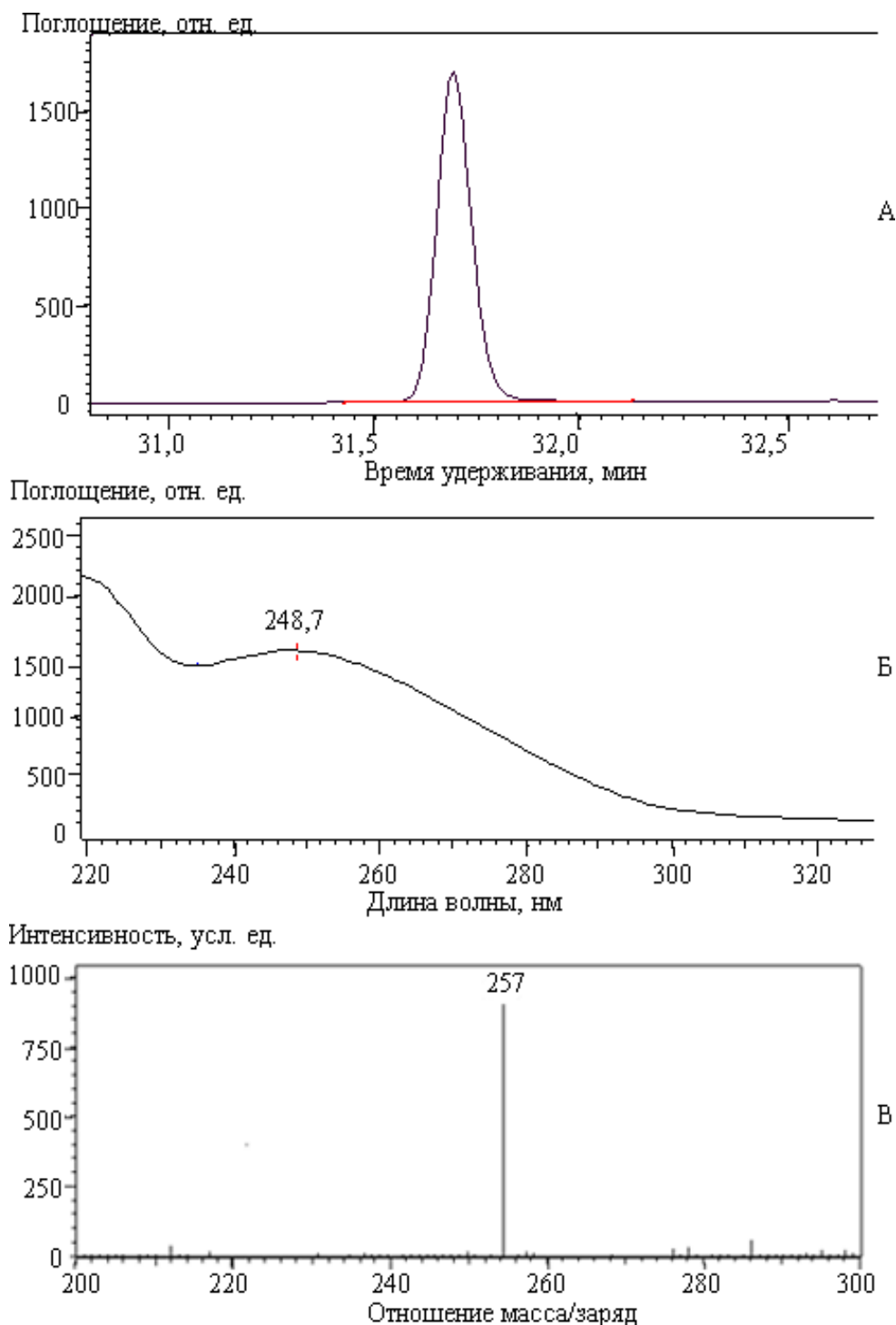


Рисунок 1 – Профиль элюции (А), спектр поглощения (Б) и масс-спектр (В) пирролнитрина

Установлено, что при культивировании бактерий *P. aurantiaca* В-162 на среде, предложенной К.-Н. van Ree [11], наибольшая продукция антибиотика регистрируется при внесении в ростовую среду ионов Fe^{3+} (конечная концентрация 1 ммоль/л) (рис. 2); ионы Cu^{2+} вызывают незначительное снижение уровня образования пирролнитрина, тогда как ионы других металлов выраженного влияния не оказывают. Сопоставить полученные данные с таковыми для других микроорганизмов не представляется возможным вследствие отсутствия сведений о влиянии ионов металлов на продукцию пирролнитрина.

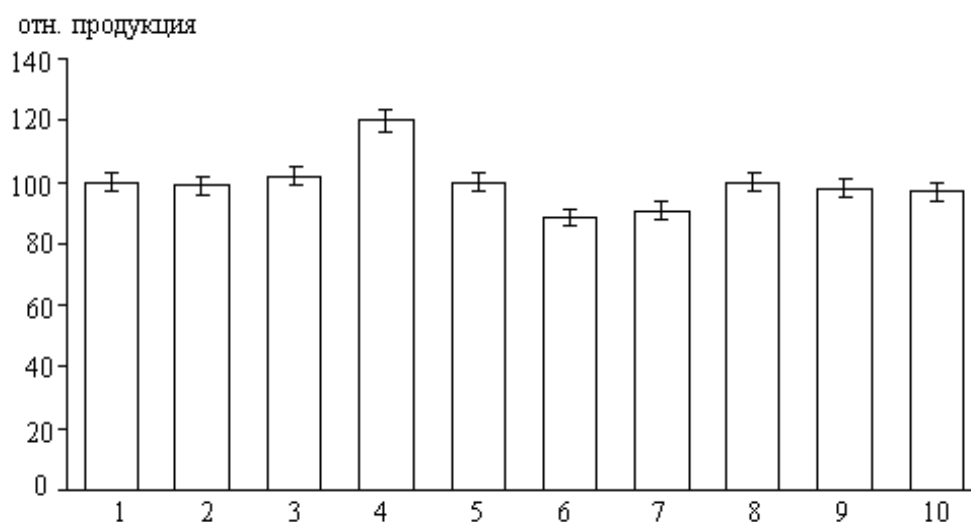


Рисунок 2 – Влияние ионов металлов на продукцию пирролнитрина бактериями *P. aurantiaca*

1 – без добавления ионов металлов; 2 – $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 3 – $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 4 – $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 – CaCl_2 ;

6 – $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 7 – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 8 – $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 9 – $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 – $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Ранее нами было показано, что ионы Fe^{3+} вызывают повышение активности анранилат-синтазы – ключевого фермента биосинтеза триптофана, служащего предшественником пирролнитрина, что, по-видимому, приводит, в конечном итоге, к общему повышению уровня синтеза антибиотика [13].

Известно, что синтез антибиотиков во многом определяется составом питательной среды, и основное значение в этом отношении имеет источник углерода. Эксперименты, проведенные с использованием в качестве источника углерода различных органических соединений, показали, что максимальная продукция пирролнитрина наблюдается при росте бактерий *P. aurantiaca* В-162 на среде, содержащей глицерин, фруктозу, маннозу или сахарозу в концентрации 1% (табл. 1).

Таблица 1 – Образование пирролнитрина бактериями *P. aurantiaca* В-162 при росте на различных источниках углерода

Источник углерода	Концентрация пирролнитрина, мг/л	Источник углерода	Концентрация пирролнитрина, мг/л
сахароза	3,84±0,07	этанол	0,51±0,03
глюкоза	2,13±0,05	триптофан	4,23±0,07
фруктоза	4,24±0,04	анранилат	1,65±0,06

лактоза	1,61±0,07	серин	0,84±0,09
арабиноза	2,08±0,05	цитрат	0,0
манноза	3,86±0,10	малонат	0,0
мальтоза	2,43±0,04	сукцинат	0,18±0,02
маннит	1,33±0,05	<i>n</i> -аминобензоат	0,23±0,03
глицерин	5,64±0,07	<i>n</i> -оксибензоат	0,23±0,02

Положительный эффект сахарозы и фруктозы на продукцию феназиновых антибиотиков был описан N. El-Banna и G. Winkelmann для бактерий *B. ceracia* [5], а отдельно фруктозы – для бактерий *P. fluorescens* [12].

Высокий уровень продукции антибиотика у бактерий *P. aurantiaca* В-162 отмечался также при внесении в среду триптофана (1%). Известно, что данная ароматическая аминокислота является биосинтетическим предшественником пирролнитрина [14-16] и, следовательно, экзогенное ее внесение может вызывать повышение выхода данного антибиотика.

Интересно отметить, что уровень синтеза пирролнитрина при использовании глюкозы в качестве источника углерода оказался не высоким – 2.13±0.05 мг/л. Логично предположить наличие у бактерий *P. aurantiaca* В-162 катаболитной репрессии синтеза пирролнитрина [12].

С целью изучения антимикробной активности пирролнитрина, синтезируемого *P. aurantiaca* В-162, нами был получен химически чистый препарат антибиотика. Как видно данных, приведенных в табл. 2, пирролнитрин обладает широким спектром действия в отношении фитопатогенных микроорганизмов даже в относительно низких концентрациях.

Наиболее выраженный фунгицидный эффект наблюдался в отношении *A. alternata*, а также представителей рода *Fusarium* (подавление роста зарегистрировано при внесении антибиотика в концентрации 2,5-5 мкг/мл). Бактерии рода *Pseudomonas* и *Erwinia* оказались менее чувствительными к действию пирролнитрина (бактерицидная доза составляла 7,5-12,5 мкг/мл).

Таблица 2 – Бактерицидные и фунгицидные дозы пирролнитрина, синтезируемого бактериями *P. aurantiaca* В-162

Штамм	Бактерицидная доза, мкг/мл	Штамм	Фунгицидная доза, мкг/мл
<i>E. aroideae</i> 291-1	12,5	<i>A. alternata</i>	2,5
<i>E. aroideae</i> 348-1	12,5	<i>Ascochyta</i> sp.	5
<i>E. carotovora</i> 330	7,5	<i>F. avenaceum</i> 6(9)	5
<i>E. carotovora</i> 8526	12,5	<i>F. avenaceum</i> 04-7	5
<i>P. syringae</i> S-10	12,5	<i>F. culmorum</i> 1(8)	3,5
<i>P. atrofaciens</i> 7967	12,5	<i>F. culmorum</i> 005	3,5
<i>P. glycinea</i> 8541	12,5	<i>F. culmorum</i> 1(17)	3,5

<i>P. lachrymans</i> 7595	12,5	<i>F. oxysporum</i> 6(14)	5
<i>P. lupini</i> 8532	7,5	<i>F. sambucinum</i>	3,5
<i>P. pisi</i> 7152	7,5	<i>F. semitectum</i>	3,5
<i>P. syringae</i> 345	7,5	<i>P. infenstans</i> 3/2	3,5
<i>P. vignae</i> 1025	7,5	<i>P. infenstans</i> 3/032	3,5
<i>P. xanthochlora</i> 3416	12,5	<i>P. infenstans</i> 3/033	3,5

Полученные результаты соответствуют данным других исследователей, из которых следует, что бактерицидная доза этого антибиотика колеблется от 0,19 до 6,25 мкг/мл, а для фитопатогенных грибов она составляет 0,07-10 мкг/мл [5-7].

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что бактерии *P. aurantiaca* В-162 синтезируют антибиотик ароматической природы пирролнитрин, максимальная продукция которого (5,6 мг/л) наблюдается при культивировании бактерий в течение 3-4-х сут и внесении в ростовую среду глицерина, триптофана или фруктозы (1%), а также ионов Fe³⁺ (1 ммоль/л). Наибольшая антимикробная активность пирролнитрина проявляется в отношении фитопатогенных грибов *A. alternata* и *F. culmorum* (фунгицидная доза составляет 2,5-3,5 мкг/мл), тогда как бактерицидная доза в отношении фитопатогенных бактерий *Pseudomonas* и *Erwinia* в 3,5 раза выше (7,5-12,5 мкг/мл).

Следует отметить, что бактерицидные и фунгицидные дозы пирролнитрина в отношении изучаемых фитопатогенных микроорганизмов в 2-5 раз ниже, чем уровень синтеза этих соединений при культивировании бактерий *P. aurantiaca* В-162 в оптимизированных условиях, что свидетельствует об их высоком «антимикробном потенциале». Кроме того, определенный вклад в антимикробную активность *P. aurantiaca* В-162 вносят, по-видимому, комплекс антибиотиков феназинового ряда, 2,4-диацетилфлороглюцинол и пиолотеорин, наличие которых у данных бактерий было продемонстрировано нами ранее [13].

Литература

1. Hammer P.E., Burd W., Hill D.S., Ligon J.M., van Pee K.-H. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains // FEMS Microbiol. Lett. 1999. V. 180. № 1. P. 39–44.
2. Kirner S., Krauss S., Sury G., Lam S.T., Ligon J.M., van Pee K.-H. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens* // Microbiol. 1996. V. 142. № 8. P. 2128–2135.
3. van Pee K.-H., Salcher O., Lingens F. Formation of pyrrolnitrin and 3-(2-amino-3-chlorophenyl)pyrrole from 7-chlorotryptophan // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1980. V. 19. P. 828–832.
4. van Pee K.-H., Ligon J.M. Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenylpyrrole derivatives by bacteria // Nat. Prod. Rep. 2000. V. 17. № 1. P. 157–164.
5. El-Banna N, Winkelmann G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes // J. Appl. Microbiol. 1998. V. 85. № 1. P. 69–78.
6. Смирнов В.В., Киприянова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990. 264 с.
7. Hashimoto M., Hattori K. A new menabolite from *Pseudomonas pyrrolnitrica* // Ibid. 1968. V. 16. № 6. P. 1144.

8. Burkhead K.D., Schisler D.A., Slininger P.J. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. № 6. P. 2031–2039.
9. Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности. М.: Высш. шк., 1965. 212 с.
10. van Pee K.-H. Biosynthesis of halogenated metabolites by bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 1996. V. 50. № 1. P. 375–399.
11. van Pee K.-H., Salcher O., Fischer P., Bokel M., Lingens F. The biosynthesis of brominated pyrrolnitrin derivatives by *Pseudomonas aureofaciens* // J. Antibiotics. 1983. V. XXXVI. № 12. P. 1735–1741.
12. Duffy B., Defago G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 6. P. 2429–2438.
13. Феклистова И.Н. Синтез антибиотиков ароматической природы у бактерий *Pseudomonas aurantiaca* B-162. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Минск: Белорусский государственный университет, 2006. 26 с.
14. Бурдь В.Н., ван Пе К.-Х. Клонирование и секвенирование гена триптофан-7-галогеназы из штамма *Pseudomonas fluorescens* СНА0 // Биохимия. 2004. Т. 69. Вып. 6. С. 828–831.
15. Kirner S., Hammer P.E., Hill D.S., Altmann A., Fischer I., Weislo L.J., Lanahan M., van Pee K.-H., Ligon J.M. Functions encoded by pyrrolnitrin biosynthetic genes from *Pseudomonas fluorescens* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. № 7. P. 1939–1943.
16. van Pee K.-H. Microbial biosynthesis of halometabolites // Arch. Microbiol. 2001. V. 175. № 4. P. 250–258.

**SYNTHESIS OF PYRROLNITRIN BY
PSEUDOMONAS AURANTIACA BACTERIA**

I.N. Feklistova, N.P. Maximova

Belarusian State University, Minsk, Belarus

By using TLC and HPLC it was established that *P. aurantiaca* B-162 bacteria synthesize antibiotic pyrrolnitrin which maximal production (5,6 mkg/l) is being observed by bacteria cultivation in 3-4 days, entering glycerin, tryptophane or fructose (1%) and Fe²⁺ ions (1 mmol/l) to the medium growth. The greatest antimicrobial activity of pyrrolnitrin is being shown against phytopathogenic fungi *A. alternata* and *F. culmorum* - fungicidal doze is 2,5-3,5 mkg/ml, and bactericidal doze against phytopathogenic bacteria *Pseudomonas* and *Erwinia* is in 3,5 times above (7,5-12,5 mkg/ml).