

WYMIENIALNOŚĆ SIDEROFORÓW PRZEZ BAKTERIE RODZAJU *Pseudomonas*

Urszula JANKIEWICZ, Joanna KUDELSKA

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Rolnictwa i Biologii, Katedra Biochemii

Słowa kluczowe: piowerdyna, Pseudomonas, siderofor, wymienialność sideroforów

Streszczenie

Ze względu na swoje potencjalne zastosowanie w medycynie i różnych gałęziach przemysłu siderofory syntetyzowane przez bakterie cieszą się w ostatnich latach bardzo dużym zainteresowaniem badaczy. Głównym sideroforem wytwarzanym przez bakterie z rodzaju *Pseudomonas* w warunkach niedoboru żelaza jest piowerdyna. W niniejszej pracy wyizolowano i oczyszczono, metodą chromatografii chelatującej, piowerdyny trzech szczepów bakterii *P. fluorescens* – 5N, G i D oraz piowerdynę szczepu *P. putida* A. Zbadano wymienialność sideroforów między tymi szczepami. Krzyżową wymienialność piowerdyn zaobserwowano między szczepami 5N i D, D i G oraz 5N i A. Po porównaniu profili elektroforetycznych białek zewnętrznej błony komórkowej wykazano, że bakterie w warunkach niedoboru żelaza wytwarzają dodatkowe białka, których synteza może być indukowana niedoborem żelaza w podłożu.

WSTĘP

Bakterie wykształciły dwa systemy asymilacji żelaza, uruchamiane w zależności od warunków środowiska, w którym bytują. Pierwszy, tzw. system niskiego powinowactwa jest uruchamiany, gdy w otoczeniu jest zapewniona względna obfitość żelaza, tj. gdy jego stężenie wynosi przynajmniej 10^{-5} mol·dm⁻³. Mechanizm ten opiera się na swobodnej dyfuzji jonów żelaza przez błony komórkowe. Drugi, tzw. system wysokiego powinowactwa, działa w warunkach stresu, powodowanego niedoborem żelaza w otoczeniu i polega na aktywnym transporcie jonów tego

pierwiastka do wnętrza komórki bakterii z wykorzystaniem sideroforów. Wydzielanie sideroforów przez bakterie jest zjawiskiem powszechnym, co wiąże się z małą dostępnością żelaza dla drobnoustrojów w środowisku ich bytowania [NEILANDS, 1995].

W skorupie ziemskiej występuje obfitość żelaza, jednak – gdy odczyn gleby jest bliski obojętnemu – ulega ono szybkiej oksydacji i tworzy nierozpuszczalne kompleksy w postaci polimerów wodorotlenku żelaza $\text{Fe}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. Żelazo występuje również w formie związanej z fosforanami i koloidami. Taka reaktywność żelaza powoduje, że stężenie jego dostępnej formy wynosi zwykle od 10^{-9} do 10^{-18} $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ i jest zbyt małe dla mikroorganizmów glebowych [RAYMOND i in., 2003].

Bakterie *Pseudomonas* wydzielają kilka typów sideroforów, z których najlepiej poznano piowerdyny [BUDZIKIEWICZ, 1997; 2004]. Te charakterystyczne dla fluoryzujących szczepów *Pseudomonas* siderofory są w ostatnich latach intensywnie badane. Jest to związane z ich ogromną rolą w komórkowych procesach fizjologicznych, jak również z możliwością ich praktycznego zastosowania w rolnictwie oraz medycynie. Pomimo dużej wiedzy na temat budowy piowerdyn i ich właściwości wciąż trwają badania nad mechanizmem ich transportu do komórek bakterii. Relatywnie mało poznany zjawiskiem jest specyficzne rozpoznawanie przez białka receptorowe użelazonej piowerdyny (ferripiowerdyny) podczas jej pobierania ze środowiska zewnętrznego. Wiadomo, że sekwencja łańcucha peptydowego wchodzącego w skład cząsteczki piowerdyny ma ogromne znaczenie podczas rozpoznawania sideroforów przez receptory. Łańcuch peptydowy piowerdyny jest specyficzny dla danego szczepu bakterii *Pseudomonas* [BUDZIKIEWICZ, 2004; HOHNADDEL, MEYER, 1988].

Celem pracy było określenie, czy i w jakim stopniu bakterie z rodzaju *Pseudomonas* mogą wykorzystywać do pobierania żelaza piowerdynę syntetyzowaną przez inne szczepy bakterii tego rodzaju.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał doświadczalny stanowiły szczepy bakterii glebowych z rodzaju *Pseudomonas*, charakteryzujące się intensywnym wydzielaniem piowerdyny. Identyfikację gatunkową drobnoustrojów przeprowadzono na podstawie klasycznych testów biochemicznych (kataliza, oksydaza) oraz Microgen (UK), obejmujących 24 cechy biochemiczne, a także za pomocą analizy mikroskopowej. Izolaty glebowe oznaczono jako:

- szczep *Pseudomonas putida* – A,
- szczep *Pseudomonas fluorescens* 1 – 5N,
- szczep *Pseudomonas fluorescens* 2 – D,
- szczep *Pseudomonas fluorescens* 3 – G.

Rozróżnienie szczepów w obrębie gatunku przeprowadzono metodą MP PCR (ang. „Melting Point PCR”) [JANKIEWICZ, KUZAWIŃSKA, 2009].

Czyste kultury bakterii przechowywano z dodatkiem 15% glicerolu w temperaturze -80°C i uaktywniano przez dwukrotne pasażowanie w podłożu King B [KING i in., 1954].

W celu pozyskania piowerdyny bakterie hodowano na płynnej pożywce SSM o składzie:

- K_2HPO_4 – $6,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$,
- KH_2PO_4 – $3,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$,
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – $1,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$,
- MgSO_4 – $0,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$,
- kwas bursztynowy – $4,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Przed sterylizacją pożywki jej pH doprowadzano do 6,8 za pomocą NaOH o stężeniu $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Detekcja i oznaczanie ilościowe piowerdyny. Detekcję piowerdyn w poszczególnych hodowlach bakterii prowadzono fotometrycznie, przy długości fali 400 nm. Stężenie piowerdyn obliczano korzystając z molowego współczynnika absorpcji [MEYER, ABDALLAH, 1978].

Oczyszczanie piowerdyny. Izolację piowerdyn syntetyzowanych przez poszczególne szczepy bakterii przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez JANKIEWICZ i KUZAWIŃSKĄ [2009]. Uzyskane po odwirowaniu komórek bakterii supernatanty z hodowli bakterii zawierające piowerdynę poddawano oczyszczaniu na złożu chelatującym. Na kolumnę nanoszono po $4,0 \text{ cm}^3$ zagęszczonych preparatów odpowiednich piowerdyn. Po rozdzielach chromatograficznych detekcję piowerdyny w frakcjach o objętości $1,0 \text{ cm}^3$ prowadzono fotometrycznie. Zebrane frakcje, o najwyższej absorpcji przy długości fali 400 nm, wykorzystywano w dalszych doświadczeniach. Oczyszczone roztwory piowerdyn przechowywano w temperaturze -20°C do czasu dalszych analiz.

Badanie wymienialności piowerdyn. Wybrane do badań szczepy bakterii szczepiono na stałym podłożu King B z dodatkiem chelatora żelaza – 1,10-fenantroliny. Stężenie fenantroliny ustalono doświadczalnie na podstawie obserwacji wzrostu bakterii na podłożach zawierających różne stężenia chelatora: 0,25, 0,5, 0,75 i $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Do dalszych badań wybrano podłoża zawierające 1,10-fenantrolinę o stężeniu $1,0 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, ponieważ w tych warunkach nie obserwowano już wzrostu bakterii. Na tak przygotowane podłoże wysiewano powierzchniowo inokulum bakterii, następnie po kilku godzinach na powierzchni podłoża umieszczano krążki bibułowe nasączone oczyszczoną i przesączoną przez filtr antybakteryjny (o średnicy $0,22 \mu\text{m}$) piowerdyną. Zielonożółte zabarwienie wokół krążków bibuły świadczyło o wzroście bakterii i jednoczesnej intensywnej syntezie piowerdyny nowo namnożonych komórek bakterii. Do pierwotnego namnażania w warunkach doświadczenia były zdolne komórki bakterii, które mogły pobrać ze śro-

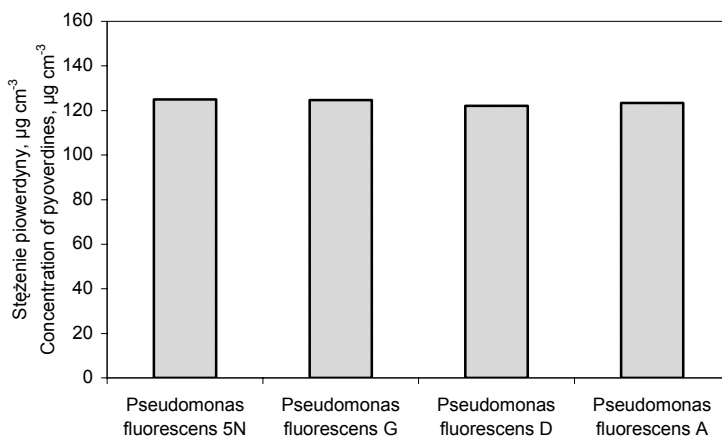
dowiska piowerdynę skompleksowaną z żelazem. Wzrost bakterii obserwowano po 72 h inkubacji w temperaturze 28°C.

Kontrolę stanowiły hodowle bakterii, w których krążki nasączono sterylną wodą dejonizowaną. Kontrolnie nanoszono także krążki z piowerdyną na niezaszczepione bakteriami podłoże hodowlane. W obu przypadkach nie zaobserwowano wzrostu bakterii.

Izolacja i rozdział elektroforetyczny białek membrany zewnętrznej (OM). Bakterie namnażano na pożywce płynnej SSM oraz pożywce płynnej SSM z dodatkiem 100 mmol·dm⁻³ FeCl₃. Hodowlę prowadzono przez 72 h w temperaturze 28°C, z wytrząsaniem z prędkością 120 obrotów na minutę. Następnie hodowlę bakterii odwirowywano (12 000·g, 4°C, 20 min), supernatant usuwano, a pozostały osad komórek bakterii wykorzystywano do izolacji błon komórkowych wg procedury CHARTA i TRUSTA [1983]. Rozdział elektroforetyczny wyizolowanych białek membrany zewnętrznej w warunkach denaturujących przeprowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym [LAEMMLI, 1970]. Prążki białkowe obserwowano po wybarwieniu żelu w Coomassie blue.

WYNIKI BADAŃ

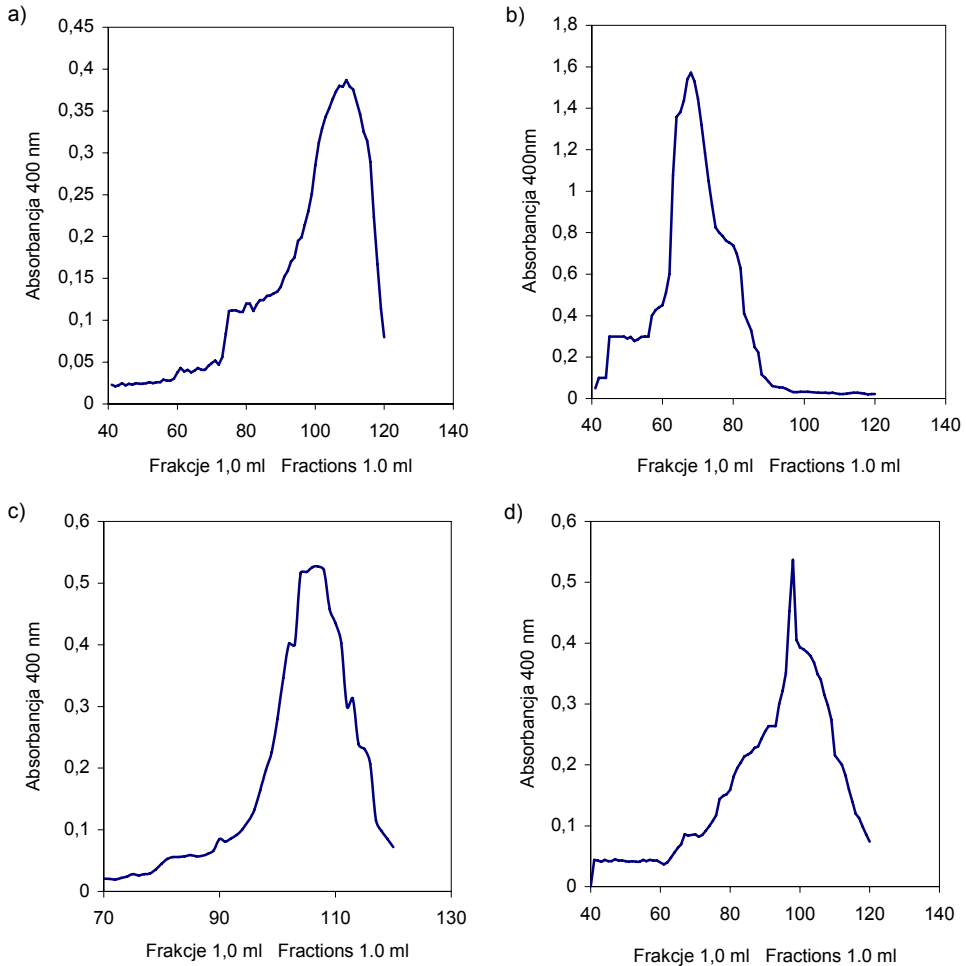
Badane szczepy bakterii podczas hodowli na podłożu ubogim w żelazo intensywnie syntetyzowały piowerdynę. Poszczególne izolaty bakterii wydzielały zbliżone ilości sideroforu (rys. 1).



Rys. 1. Stężenie piowerdyny ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) w płynach pohodowlanych badanych szczepów bakterii *Pseudomonas*

Fig. 1. Concentration of pyoverdine ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$) in culture media of analysed strains of *Pseudomonas*

Pojedyncze piki na wykresach rozdziału chromatograficznego świadczą o tym, że badane bakterie wydzielają jedną formę piowerdyny (rys. 2).



Rys. 2. Rozdział chromatograficzny piowerdyny syntetyzowanej przez szczepy: a) *P. fluorescens* 5N, b) *P. fluorescens* G, c) *P. fluorescens* D, d) *P. putida* A

Fig. 2. Chromatographic fractionation of pyoverdine synthesized by the strains: a) *P. fluorescens* 5N, b) *P. fluorescens* G, c) *P. fluorescens* D, d) *P. putida* A

Zauważono, że wszystkie szczepy były zdolne do pobierania własnej piowerdyny (tab. 1). Bakterie *P. fluorescens* 5N pobierały piowerdynę syntetyzowaną przez szczep G, natomiast szczep G nie wykazywał zdolności pobierania piowerdyny syntetyzowanej przez 5N. Podobnie było w przypadku szczepów G i A oraz A i D. W pierwszym przypadku szczep G pobierał piowerdynę *P. putida* A, ale

Tabela 1. Wymienialność piowerdyn syntetyzowanych przez poszczególne szczepy *Pseudomonas***Table 1.** Cross-reactivity of pyoverdines synthesized by particular strains of *Pseudomonas*

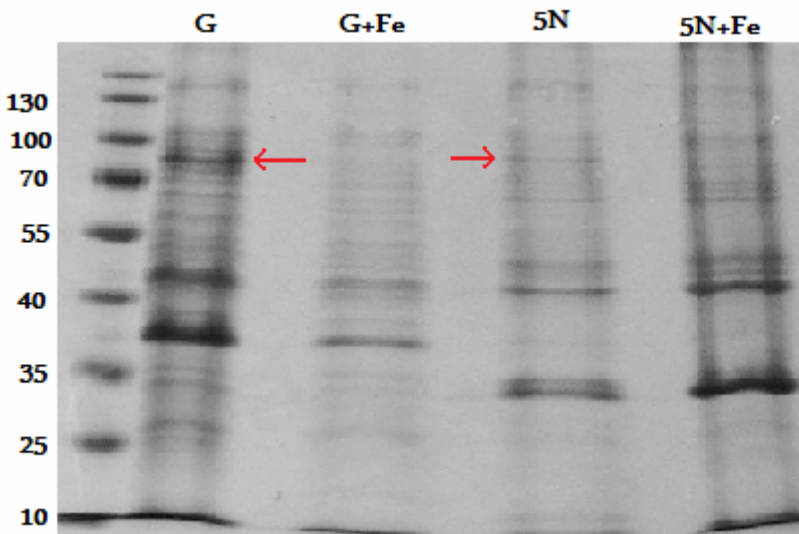
Szczep bakterii pobierający Acceptor strain	Szczep bakterii produkujący Donor strain			
	5N	G	D	A
5N	+	+	+	+
G	-	+	+	+
D	+	+	+	-
A	+	-	+	+
Kontrola Control	-	-	-	-

Objaśnienia: „+” – wzrost, „-” – brak wzrostu.

Explanations: „+” – increase, „-” – no increase.

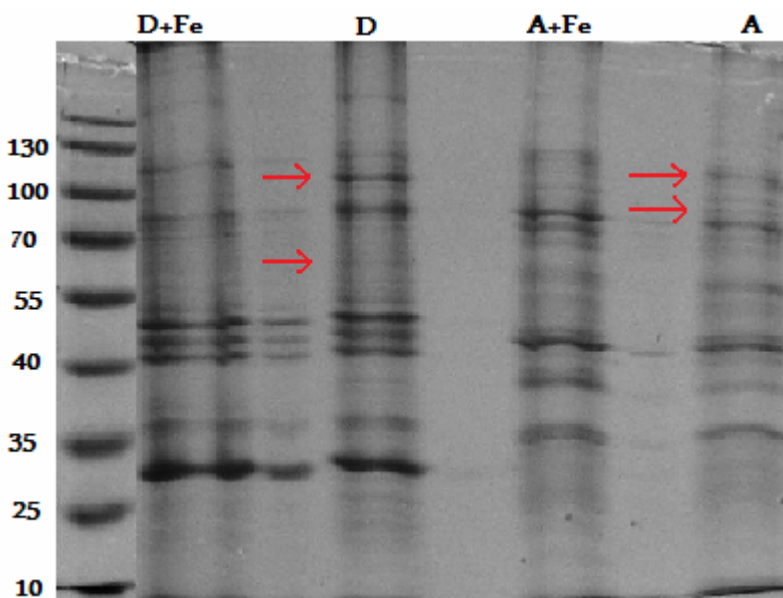
szczep A nie był zdolny do pobierania piowerdyny szczepu G. W drugim przypadku szczep A pobierał piowerdynę szczepu D, ale szczep D nie pobierał piowerdyny szczepu A. Krzyżową wymienialność piowerdyn zaobserwowano natomiast między szczepami: 5N i D, D i G oraz 5N i A.

Zaobserwowano różnice w profilu białkowym OM poszczególnych szczepów bakterii w zależności od składu podłoża hodowlanego (fot. 1, 2).



Fot. 1. Profil białek OM bakterii G i 5N namnażanych na pożywkach SSM bez żelaza (G, 5N) oraz z żelazem (G + Fe, 5N + Fe)

Photo 1. Profile of proteins OM of the bacterial strains G and 5N grown on medium SSM without (G, 5N) and with (G + Fe, 5N + Fe) iron



Fot. 2. Profil białek OM bakterii D i A namnażanych na pożywkach SSM z żelazem (D+Fe, A+Fe) oraz bez żelaza (D, A)

Photo 2. Profile of proteins OM of the bacterial strains D and A grown on medium SSM with (D+Fe, A+Fe) and without (D, A) iron

Szczepy bakterii, które były namnażane na pożywce SSM bez dodatku żelaza wytwarzały dodatkowe białka OM. Synteza tych białek może być indukowana niedoborem żelaza. Prawdopodobnie należą one do specyficznych receptorów białkowych, potrzebnych bakteriom w warunkach niedoboru żelaza do wychwytywania go ze środowiska zewnętrznego z udziałem sideroforów, w tym piowerdyny. Bakterie rosnące na pożywce zawierającej żelazo nie wytwarzały tych białek.

W profilu białek OM szczepu 5N hodowanych na pożywce bezżelazowej widoczny jest dodatkowy prążek białkowy o masie ok. 90 kDa. U szczepu G wykryto także jedno dodatkowe białko o podobnej masie cząsteczkowej. Z kolei profil białkowy OM szczepu D ukazuje dwa dodatkowe prążki białkowe o masie ok. 70 kDa i 110 kDa. Podobnie bakterie *P. putida* A hodowane na podłożu ubogim w żelazo wytworzyły dwa dodatkowe białka o masie ok. 90 i 110 kDa.

DYSKUSJA

W prezentowanej pracy oczyszczono 4 piowerdyny syntetyzowane przez szczepy: 5N, G, D i A. Wszystkie szczepy *Pseudomonas* użyte w doświadczeniach syntetyzują tylko jedną formę piowerdyny. XIAO i KISSALITA [1995] po oczysz-

czeniu piowerdyny syntetyzowanej przez *Pseudomonas fluorescens* 2-79 podobną techniką chromatograficzną otrzymali jej trzy izoformy: Pf-A, Pf-B i Pf-C.

O wykorzystywaniu przez dany szczep bakterii piowerdyny obcego pochodzenia świadczył wzrost bakterii na podłożu z dodatkiem chelatora żelaza w obecności oczyszczonej piowerdyny podanej egzogenicznie. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że wymienialność tego sideroforu nie jest zależna od gatunku bakterii.

Specyfika rozpoznawania i pobierania ferripiowerdyn przez bakterie *Pseudomonas* jest szeroko dyskutowana w literaturze. Istnieją teorie, że specyficzność pobierania żelaza zależy od tego, jakie receptory OM wytwarza dany szczep bakterii. Jeżeli receptory te są identyczne, wtedy bakterie mogą pobierać piowerdyny krzyżowo. Jeżeli receptory te różnią się od siebie, bakterie nie są zdolne do wymienialności krzyżowej sideroforów [KOSTER i in., 1994]. Jednakże w najnowszej literaturze coraz częściej można zauważyć, że odchodzi się od tej teorii, natomiast znaczącą rolę w tym procesie przypisuje się sekwencji łańcucha peptydowego piowerdyny [MEYER, 2000; MEYER i in., 2002; 2008]. Analizując wyniki uzyskane w prezentowanych badaniach potwierdzono słuszność hipotezy, że nie obecność specyficznych receptorów membrany zewnętrznej, ale budowa i skład aminokwasowy łańcucha peptydowego piowerdyn mogą mieć decydujący wpływ na zdolność bakterii *Pseudomonas* do rozpoznawania, pobierania i wykorzystywania piowerdyn obcego pochodzenia.

Zjawisko wymienialności piowerdyn poszczególnych szczepów może mieć ogromne znaczenie podczas konkurencji o niszę ekologiczną. Szczep bakterii zdolny do wykorzystywania poza własnymi także innych sideroforów będzie bardziej konkurencyjny niż pozostałe.

PODSUMOWANIE

1. Badane bakterie z rodzaju *Pseudomonas* w warunkach niedoboru żelaza intensywnie syntetyzują piowerdynę – wysoce specyficzny chelator żelaza.

2. Stosowane w badaniach bakterie były zdolne do pobierania w warunkach *in vitro* syntetyzowanej przez siebie piowerdyny, uprzednio wyizolowanej z hodowli tych bakterii. Nie obserwowano natomiast krzyżowego pobierania tego sideroforu przez wszystkie użyte w doświadczeniu bakterie.

3. Krzyżowe pobieranie piowerdyny nie zależało od zgodności gatunkowej bakterii *Pseudomonas*.

4. W warunkach doświadczeń badane bakterie *P. fluorescens* i *P. putida* wytwarzały dodatkowe białka membrany zewnętrznej, których synteza prawdopodobnie indukowana była niedoborem żelaza w podłożu hodowlanym. Białka te są najprawdopodobniej białkami receptorowymi, odpowiedzialnymi za pobieranie żelaza przez bakterie *Pseudomonas*.

LITERATURA

- BUDZIKIEWICZ H., 1997. Siderophores of Fluorescent *Pseudomonads*. Z. Naturforsch. 52c s. 713–720.
- BUDZIKIEWICZ H., 2004. Siderophores of the Pseudomonadaceae sensu stricto (fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas* spp.). Fortschr. Chem. Org. Naturst. 87, 81–237.
- CHART H., TRUST T.J., 1983. Acquisition of iron by *Aeromonas salmonicida*, J. Bacteriol., 156, 758–764.
- HOHNADL D., MEYER J.M., 1988. Specificity of pyoverdine-mediated iron uptake among fluorescent *Pseudomonas* strains. J. Bacteriol. 170 s. 4865–4873.
- JANKIEWICZ U., KUZAWIŃSKA O., 2009. Purification and partial characterization of pyoverdine synthesized by *Pseudomonas putida*. EJPAU, 12 (on line): <http://www.ejpau.media.pl/volume12/issue1>
- KING E., O., WARD M., K, RANEY D. E., 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab Clin Med. 44 s. 301–307.
- KOSTER M., VAN KLOMPENBURG W., BITTER W., LEONG J., WEISBEEK P., 1994. Role for the outer membrane ferric siderophore receptor PupB in signal transduction across the bacterial cell envelope. EMBO J. 13(12) s. 2805–2813.
- LAEMMLI U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T. 4. Nature 227 s. 680–685.
- MEYER J. M., 2000. Pyoverdines: pigments, Siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. Arch. Microbiol. 174 s. 135–142.
- MEYER J.M., ABDALLAH M. A., 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. J. Gen. Microbiol. 107 s. 319–328.
- MEYER J.M., GEOFFROY V.A., BAIDA N., GARDAN L., IZARD D., LEMANCEAU P., ACHOUAK W., PALLERONI N., 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and non-fluorescent *Pseudomonas*. Appl. Env. Microbiol. 68 s. 2745–2753.
- MEYER J.M., GRUFFAZ Ch., RAHARINOSY V., BEZVERBNAYA I., SCHÄFER M., BUDZIKIEWICZ H., 2008. Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. Biometals 21 s. 259–271.
- NEILANDS J.B., 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. J. Biol. Chem. 270, 45 s. 26723–26726.
- RAYMOND K.N., DERTZ E.A., KIM S.S., 2003 Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. Proc. Natl. Acad. Sci. 100 s. 3584–3588.
- XIAO R., KISAALITA W.S., 1995. Purification of pyoverdines of *pseudomonas fluorescens* 2–79 by Copper-Chelate chromatography. Appl. Env. Microbiol. 61 s. 3769–3774.

Urszula JANKIEWICZ, Joanna KUDELSKA

CROSS-REACTING OF SIDEROPHORES SYNTHESIZED BY *Pseudomonas*

Key words: cross-reactivity of siderophore, *Pseudomonas*, pyoverdine, siderophore

S u m m a r y

Interest in siderophores produced by bacteria seems to be increasing among researchers all over the world, mostly due to their potential applications in medicine and various branches of industry. Pyoverdine is a significant siderophore synthesized by bacteria under iron-deficient conditions. This

paper describes isolation and purification of pyoverdines from three strains of *Pseudomonas fluorescens* (5N, G and D) and pyoverdine from *P. putida* A strain. The copper-chelate chromatography method was employed. Cross-reacting among *Pseudomonas* strains was analysed. Cross-reactivity was observed between the following strains: 5N and D, D and G, 5N and A. Moreover, we isolated outer membrane proteins from bacterial culture. The comparison of electrophoretic profiles of these proteins showed that bacteria produced additional proteins whose synthesis is probably induced by iron deficiency.

Recenzenci:

dr Sławomir Orzechowski

prof. dr hab. Stefan Russel

Praca wpłynęła do Redakcji 23.10.2009 r.