

КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Институт фундаментальной медицины и биологии

Кафедра микробиологии

**МИКРОБНЫЕ СИДЕРОФОРЫ: КЛАССИФИКАЦИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ,
ДЕТЕКЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ**

Учебно-методическое пособие



Казань – 2015

Печатается по решению Учебно-методической комиссии

Института фундаментальной медицины и биологии «Казанского (Приволжского)
федерального университета»

Протокол № 13 от 23.06.2015

Научный редактор

докт.биол.наук, проф. Шарипова М.Р.

Рецензент

докт.биол.наук, проф. О.Н. Ильинская

Составители:

к.б.н. Хиляс И.В., м.н.с. Лайков А.В., д.б.н. Шарипова М.Р.,

к.б.н. Богомольная Л.М.

Микробные сидерофоры: классификация, применение, детекция и идентификация: учебно-методическое пособие к спецдисциплинам по микробиологии, биохимии, биотехнологии. – Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2015. – 21 с.

В пособии представлена классификация микробных сидерофоров. Рассмотрены примеры бактериальных и грибных сидерофоров, потенциальные области применения микробных сидерофоров, их роль в медицине и окружающей среде. Приведены методы исследования сидерофоров: микробиологические, биохимические, хроматографические.

Учебно-методическое пособие предназначено для бакалавров, магистров и аспирантов биологов высших учебных заведений, обучающихся по специальностям «Микробиология», «Биохимия», «Биотехнология».

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Условные обозначения и сокращения	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. Пептидные сидерофоры	5
2. Сидерофоры на основе ди- и триамино- алканов.	6
3. Сидерофоры на основе лимонной кислоты.	7
4. Смешанные сидерофоры.	7
5. Роль микробных сидерофоров в медицине.	7
6. Роль микробных сидерофоров в окружающей среде.	8
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	9
1. Детекция сидерофоров на агаризованной среде, содержащей краситель хром азурол S (CAS агар).	9
2. Калориметрическое определение различных типов сидерофоров в жидкой среде	10
2.1 Детекция сидерофоров катехолового типа - методом Арноу (Arnow, 1937).	10
Детекция сидерофоров гидроксаматового типа - методом	11
2.2 Аткина (Atkin et al, 1970).	
3. Получение сидерофоров	11
4. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) сидерофоров.	11
5. Уф-видимые спектры чистых фракций сидерофоров.	12
6. Масс-спектрометрия (LC/MS/MS) чистых фракций сидерофоров.	13
7. Высокоэффективная жидкостная хроматография сверхвысокого разрешения (ВЭЖХ - МС/МС).	14
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	17

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АК – аминокислоты,

БИП – 2.2-бипиридил,

ДГБ – 2.3-дигидроксибензоил,

2.3-ДГБК – 2.3-дигидроксибензойную кислоту,

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография,

ПО – программное обеспечение,

ТФУ – трифторуксусной кислотой,

CAS – хром азурол S,

НДТМА – гексадецил-триметил аммония,

Lys – лизин,

MS – масс-спектр,

MS/MS – масс-спектр дочерних ионов,

PIPES – пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота),

Ser – серин.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших микроэлементов является железо, которое принимает участие в транспорте электронов, ферментативных реакциях, метаболизме кислорода, синтезе ДНК и РНК микроорганизмов. Железо в окружающей среде можно обнаружить в составе различных минералов (в виде сульфидов, оксидов, гидроксидов, оксигидроксидов, комплексных соединений) (Jambor and Dutrizac, 1998). Растворимость Fe(III)-минералов составляет 10^{-38} , а концентрация Fe^{3+} в аэробных условиях и при нейтральных значениях pH достигает $10^{-17} - 10^{-18}$ М при условии отсутствия хелаторов в среде (Neilands et al., 1991). Таким образом, растворимость и биодоступность железа при таких условиях весьма ограничена, что является причиной для возникновения сложных адаптационных механизмов, обеспечивающих выживание клеток живых организмов, нуждающихся в микроэлементе. Микроорганизмы одними из первых адаптировались к выживанию в условиях дефицита железа. Примером выработанной стратегии связывания железа в аэробных условиях является синтез и экскреция низкомолекулярных хелаторов – сидерофоров (молекулярная масса 200-2000 Да) с высоким и специфичным сродством к Fe(III) (Ahmed and Holmstrom, 2014; Johnstone and Nolan, 2015).

Сидерофоры делятся на несколько типов в зависимости от наличия функциональных групп : 1) сидерофоры на основе пептидов, 2) сидерофоры на основе ди- и триамино- алканов, 3) сидерофоры на основе лимонной кислоты, 4) смешанные сидерофоры (Cornelis and Andrews, 2010).

1. Пептидные сидерофоры.

В состав пептидных сидерофоров обычно входят как D-, так и L-аминокислоты (АК), выступающие в качестве лигандов. На обоих концах пептидной цепи располагаются циклические молекулы, предотвращающие их деградацию протеолитическими ферментами. К таким молекулам относятся, например, непротеиногенные АК (гомосерин, орнитин, 2,4-диаминобутановая кислота) (Cornelis and Andrews, 2010). Лизин и орнитин могут входить в составе основной цепи через взаимодействие ϵ/δ – аминогруппами. Также, АК могут подвергаться модификации для формирования сайтов связывания. Наиболее известным представителем пептидных сидерофоров являются пиовердин и его производные, продуцируемые различными штаммами семейства *Pseudomonas* (Rabaey et al., 2005; Cornelis and Andrews, 2010).

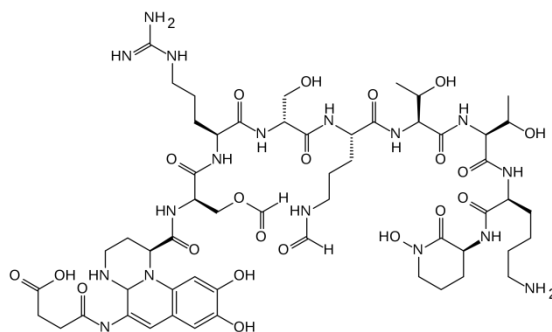


Рис.1. Химическая структура представителя пептидных сидерофоров – пиовердина.

Сидерофоры гидроксаматового типа продуцируют как бактериальные, так и представители микроскопических грибов. Например, экзохелин был идентифицирован у штаммов *Mycobacterium* и вицибактин – макроциклический трилактон (*Rhizobium*). Наибольшее разнообразие сидерофоров данного типа было обнаружено у грибных штаммов: фузаринины, включающие в состав ангидромевалоновую кислоту, могут иметь моно-, ди- и тримерную структуры; феррихромы, состоящие из циклогексапептидов; копрогены, характеризующиеся наличием дикетопиперазинового кольца, а также родоторуловая кислота, содержащая две ацильные группы (Winkelmann et al., 2002; Cornelis and Andrews, 2010).

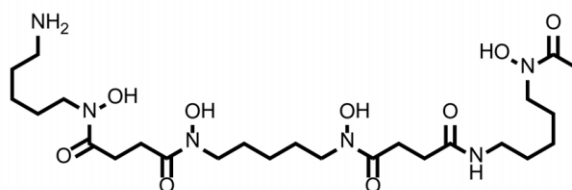


Рис.2. Химическая структура представителя пептидного сидерофора гидроксаматового типа – дефероксамина.

Сидерофоры катехолового типа представляют собой циклический трилактон N-2,3-дигидроксибензоил-L-серин (ДГБ-Ser) и его производные. Представителями данного типа сидерофоров являются энтеробактин (энтерохелин), продуцируемые представителями энтеробактерий (*Salmonella*, *E.coli*); коринебактин или бациллибактин, итоевая кислота (*Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis*); хризобактин (*Erwinia*, *Serratia marcescens*) (Winkelmann et al., 2002; Cornelis and Andrews, 2010).

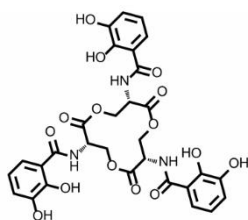


Рис.3. Химическая структура представителя пептидного сидерофора катехолового типа – энтеробактина.

Липопептидные сидерофоры содержат в составе остатки 3-гидрокси жирных кислот и путресцин, блокирующий С-терминальный конец цепи (Cornelis and Andrews, 2010). Сидерофоры данного типа были идентифицированы у представителей рода *Burkholderia* (орнибактин) и *Nocardia* (нокобактин, формобактин, амамистатины). Группа амфифильных сидерофоров была изолирована у штаммов морских бактерий *Marinobacter* (маринибактин), *Halomonas* (аквахелин) и *Vibrio* spp. (амфибактин) (Winkelmann et al., 2002; Cornelis and Andrews, 2010).

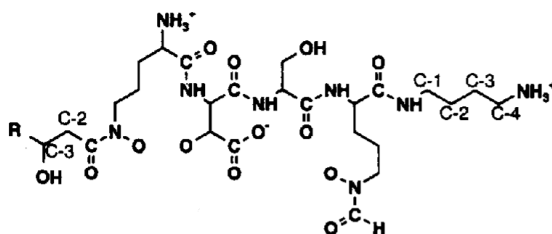


Рис.4. Химическая структура представителя пептидного сидерофора липопептидного типа – орнибактина.

2. Сидерофоры на основе ди- и триамино- алканов.

Сидерофоры на основе ди- и триамино-алканов, также как и пептидные, делятся на два подтипа: катехоловые или на основе гидроксамовой кислоты. Аминокислотой всех сидерофоров катехолового типа, как например, протохелина, азотохелина (бис-ДГБ-Lys) и аминохелина (моно-ДГБ кадаверин) является L-лизин, связанный с ДГБ. В случае связывания ДГБ с серином или треонином, происходит циклизация в ходе взаимодействия гидроксильной группы с карбонильной, ведущая к формированию оксазолинового кольца. Ко второму подтипу, относятся сидерофоры путребактин (*Shewanella putrefaciens*), алкалигин (*Alcaligenes denitrificans*) и десферриферриоксамины, продуцируемые актиномицетами (Cornelis and Andrews, 2010).

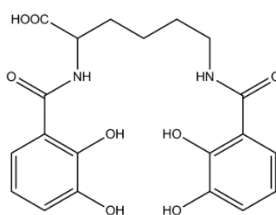


Рис.5. Химическая структура представителя сидерофора на основе ди- и триамино-алканов – азотохелина.

3. Сидерофоры на основе лимонной кислоты.

Сидерофоры на основе лимонной кислоты включают в себя соединения, в которых скелетом молекулы является лимонная кислота, которая через карбоксильную группу связана, например, с 1,3-диаминопропаном или аминогруппой лизина (шизокинин, артробактин, аэробактин). Если несущей конструкцией сидерофора является 2-оксоглутаровая кислота, тогда ее

карбоксильная группа соединяются с аминогруппами оксопролиновых структур (стафилоферрин В, ахромобактин) (Cornelis and Andrews, 2010).

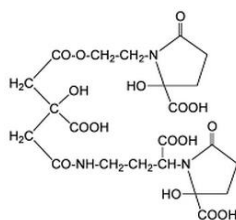


Рис.6. Химическая структура представителя сидерофора на основе лимонной кислоты – ахромобактина.

4. Смешанные сидерофоры.

В группу смешанных сидерофоров отнесены соединения, например, образуемые в результате конденсации продуктов салициловой кислоты с цистеином, ведущей к образованию триазилинового кольца. Типичным представителем данных сидерофоров является пиохелин, продуцируемый *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia* (Cornelis and Andrews, 2010).

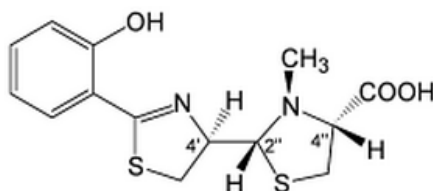


Рис.7. Химическая структура представителя смешанного типа сидерофоров – пиохелина.

Многие бактерии и микроскопические грибы способны продуцировать более чем один тип сидерофоров и/или обладают более чем одной системой для внутриклеточного транспорта различного типа сидерофоров (Neilands et al., 1981).

5. Роль микробных сидерофоров в медицине.

Клинические и стационарные лечебные отделения являются экстремальными нишами для роста и развития микроорганизмов. Однако даже в таких условиях адаптация патогенных бактерий приводит к развитию внутрибольничных инфекций. Одним из ограничивающих факторов роста микроорганизмов является низкая биодоступность ионов железа (Archibald et al., 1983).

В последнее время сидерофоры привлекают к себе внимание исследователей не только с точки зрения их вклада в обеспечение бактерий железом, но и как молекулы, которые можно использовать в качестве «троянского коня» для доставки antimicrobных препаратов внутрь бактериальной клетки (Foley and Simeonov, 2012).

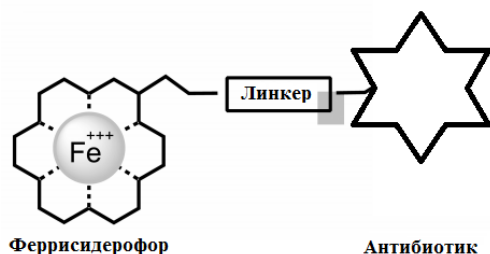


Рис.8. Схематическое изображение связывания сидерофора для доставки лекарственных препаратов внутрь клетки (Foley and Simeonov, 2012).

В современной медицине нашли широкое применение природные микробные сидерофоры, как, например, дефероксамин, продуцируемый *Streptomyces pilosu*, так и синтетические – циклопирокс, деферипрон, деферасирокс в качестве хелирующих агентов при лечении больных талассемией (Foley and Simeonov, 2012). Кроме того, сидерофоры, в частности, дефероксамин, показали свою эффективность в лечении больных рассеянным склерозом (Weigel et al, 2014). Синтетический сидерофор деферасирокс показал обнадеживающие результаты в лечении ряда онкологических заболеваний (Bedford et al, 2013). Токсикологические исследования данных сидерофор выявили их антимикробную активность в отношении патогенных микроорганизмов *Plasmodium*, *Pseudomonas* и *Staphylococcus* (Foley and Simeonov, 2012).

Сидерофоры циклопирокс и деферипрон используют в хелаторной терапии, а также было показано, что данные соединения обладают сильной антибактериальной и противогрибковой активностью *in vitro*. Циклопирокс обладает умеренной антифунгицидной активностью в отношении патогенного *Aspergillus fumigate* и дает синергический эффект с другими полезными антифунгицидными препаратами. Деферипрон используется для лечения грибковых заболеваний, вызванных *Rhizopus oryzae*, которыми часто страдают больные неконтролируемым сахарным диабетом с кетоацидозом (Foley and Simeonov, 2012).

6. Роль микробных сидерофоров в окружающей среде.

Роль микробных сидерофоров – получение труднодоступного железа из окружающей среды, его перевод в доступную форму и транспортировка внутрь клеток, только этим не ограничивается. Сидерофоры способны формировать комплексы с другими металлами (актиноидами и тяжелыми металлами), что является несомненным преимуществом для микроорганизмов, адаптированных к экстремальным условиям (Brainard et al., 1992; Ahmed and Holmstrom, 2014). Экстремальные экологические ниши широко распространены в окружающей среде. Характеризуются такие местообитания постоянно низкой концентрацией питательных веществ и высоким содержанием токсичных соединений природного или антропогенного происхождения, и являются непригодными для роста растений (Нетрусов, 2004).

Особо экстремальной нишей для живых организмов являются нефтезагрязненные территории и акватории, характеризующиеся низким содержанием кислорода, дефицитом железа, высоким содержанием углеводов, тяжелых металлов и радионуклеотидов. Однако микроорганизмы оказались более адаптированными к таким стрессовым условиям. Морской штамм нефтедеструктор *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, продуцирует сидерофор-петробактин, структура которого представляет собой две молекулы катехола, соединенные α -гидрокси кислотой (Barbeau et al., 2002). Морской штамм *Vibrio* spp., выделенный из нефтезагрязненного Мексиканского залива, характеризуется продукцией амфифильного сидерофора-охробактина-ОН, который является производным аэробактина (Gauglitz et al., 2012). Авторы предполагают, что сидерофоры штаммов-нефтедеструкторов вносят существенный вклад в процесс биоремедиации загрязненных территорий (Barbeau et al., 2002; Gauglitz et al., 2012).

Сидерофоры эффективно связывают и увеличивают подвижность широкого круга металлов, таких как Zn, Ni, Cu, Mn, Co, Mo, которые также вовлечены в клеточные процессы в Мм или μ М количествах (Schalk et al., 2011). Исследования показали, что сидерофоры (пиовердин и пиохелин), продуцируемые *Pseudomonas aeruginosa*, способны к хелатированию 16 различных металлов (Braud et al., 2009). Невысокие концентрации молибдена в среде (до 100 Мм) способствуют увеличению продукции сидерофора катехолового типа азохелина штаммом *Azotobacter vinelandii*, но при более высоких концентрациях продукция полностью подавляется (Schalk et al., 2011). Повышенная концентрация алюминия в условиях дефицита железа приводит к продукции сидерофоров гидроксаматового типа шизокинина и N-деоксишизокинина культурой *Bacillus megaterium* (Hu and Boyer, 1996). Пирен-деградирующие микроскопические грибы *Fusarium solani* и *Hypocrea lixii*, продуцирующие сидерофоры, способны также связывать и аккумулировать Cu и Zn (Hong et al., 2010).

Хелатирование металлов микробными сидерофорами особенно важный процесс, протекающий при колонизации минеральных поверхностей, в результате чего формируется микросреда, в которой микроорганизмам легче получать необходимые элементы (Ahmed and Holmstrom, 2014). Так, например, штаммы *Arthrobacter* и *Streptomyces* sp., продуцирующие сидерофоры катехолового типа, способны экстрагировать железо из минерала, представляющего собой алюмосиликат кальция, магния и железа (Kalinowski et al., 2000; Liermann et al., 2000).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Детекция сидерофоров на агаризованной среде, содержащей краситель хром азурол S (CAS агар).

Скрининг микроорганизмов на способность секретировать сидерофоры в условиях голодания по железу производится путем посева на специфическую среду, содержащую краситель хром азурол S (CAS агар) (Payne et al., 1994).

Предварительно вся стеклянная посуда должна быть обработана 6M HCl с последующим ополаскиванием дистиллированной водой.

Приготовление стоковых растворов:

Раствор А:

Состоит из трех отдельно приготовленных растворов:

Раствор I	Раствор II	Раствор III
Растворить 60 мг красителя хром азурол S в 50 мл дистиллированной воды. Раствор приобретет красную окраску.	Растворить 2,7 мг $FeCl_3 \times 7H_2O$ в 10 мл 10 mM HCl.	Растворить 73 мг НДТМА (гексадецил-триметил аммония) в 40 мл дистиллированной воды.

Для получения **Раствора А**, необходимо смешать 50 мл Раствора I с 9 мл Раствора II. Раствор приобретет темно-красную окраску. Полученную смесь растворов соединить с 40 мл Раствора III. Раствор приобретет насыщенную синюю окраску. Проавтоклавированный **Раствор А** хранить при комнатной температуре.

Раствор Б:

- Приготовить стоковую среду M9:
15 г KH_2PO_4 Растворить в 500 мл. Профильтровать через 0.45
25 г NaCl мкм фильтр.
50 г NH_4Cl
- Приготовить стоковый раствор 20% глюкозы.
- Приготовить 4.16 M стоковый раствор NaOH.
- Приготовить раствор казаминовых кислот:

Приготовить по отдельности 3% раствор казаминовых кислот и 3% раствор 8-гидроксихинолина в хлороформе. Полученные растворы смешать в равных пропорциях и инкубировать 15-20 мин. при комнатной температуре. Перенести верхнюю фазу с казаминовыми кислотами в новую посуду и профильтровать через 0.45 μm фильтр.

Раствор С (CAS агар):

- Смешать 100 мл концентрата M9 с 750 мл дистиллированной воды. Довести pH среды до 6,0.

- Внести в 850 мл среды М9 30.24 г PIPES (пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновая кислота). Довести рН среды до 6.7, избегая повышения рН выше 6.8. Приготовление среды производить на магнитной мешалке.

- В среду М9 с PIPES внести 15 г бакто агара, предварительно обработанного 3% раствором 8-гидроксихинолина в хлороформе. Вместо бакто агара допускается использование 10 г агарозы.

- Среду проавтоклавировать и охладить до 50⁰С.

- Внести к 850 мл охлажденной агаризованной среды М9:

30 мл раствора казаминовых кислот,

10 мл 20% глюкозы,

1 мл 1М раствора MgSO₄×7H₂O,

1 мл 100 мМ раствора CaCl₂,

100 мл **Раствора А** (Вносить медленно по стенке колбы с постоянным перемешиванием).

1. CAS агар разлить по чашкам Петри. Бактериальные культуры можно наносить различными способами: посев уколом, внесением пипеткой оптимального объема бактериальной суспензии на поверхность чашки, внесением бактериальной суспензии в предварительно подготовленные отверстия в агаризованной среде.

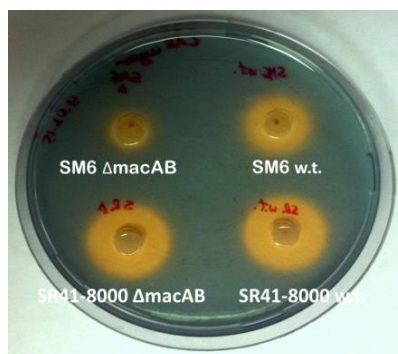


Рис. 9. Исследование продукции сидерофоров штаммами *S. marcescens* SM6 и SR41-8000 (дикий тип и $\Delta macAB$) на CAS агаре.

2. Калориметрическое определение различных типов сидерофоров в жидкой среде.

Для исследования микробных сидерофоров в жидкой среде М9 необходимо вносить 2.2-бипиридил (БИП) в конечной концентрации 50 мкМ в качестве хелатора железа.

2.1. Детекция сидерофоров катехолового типа - методом Арноу (Arnow, 1937).

Последовательность внесения растворов в лунку 96-луночного планшета (Corning^R Microplate):

Объем, мкл	Растворы
50	Отцентрифугированная культуральная жидкость (исследуемый образец) или калибровочный образец
50	0.5М HCl
50	10% смесь NaNO ₂ /Na ₂ MoO ₄
50	1М NaOH

При наличии сидерофоров катехолового типа в исследуемом образце образуется розовая окраска, которая стабильна в течение 1ч. Измерение производят при длине волны 512 нм на планшетном ридере (Tecan, Infinite 200 PRO series). Для определения концентрации сидерофоров катехолового типа в исследуемом образце (мг/л или мкМ) необходимо построить калибровочную кривую. Для построения калибровочной кривой используют 2.3-дигидроксibenзойную кислоту (2.3-ДГБК). Для приготовления стокового раствора 2.3-ДГБК растворяют в спирте. Разведения готовят в дистиллированной воде (1, 10, 25, 50, 100 мкМ). Один калибровочный образец должен вместо 2.3-ДГБК содержать эквивалентный объем воды (отрицательный контроль).

2.2. Детекция сидерофоров гидроксаматового типа - методом Аткина (Atkin et al, 1970).

Последовательность внесения растворов в лунку 96-луночного планшета (Corning^R Microplate):

Объем, мкл	Растворы
50	Отцентрифугированная культуральная жидкость (исследуемый образец)
250	5мМ раствор Fe(ClO ₄) _x nH ₂ O в 0.1М HClO ₄

При наличии сидерофоров гидроксаматового типа в исследуемом образце образуется желтая окраска. Измерение производят при длине волны 480 нм на планшетном ридере (Tecan, Infinite 200 PRO series). Для определения концентрации сидерофоров гидроксаматового типа в исследуемом образце (мг/л или мкМ) необходимо построить калибровочную кривую. Для построения калибровочной кривой используют дефероксамин. Для приготовления стокового раствора дефероксамин растворяют в воде. Разведения готовят в дистиллированной воде (1, 10, 25, 50, 100 мкМ). Один калибровочный образец должен вместо дефероксамина содержать эквивалентный объем воды (отрицательный контроль).

3. Получение сидерофоров.

Для получения большего количества сидерофоров необходимо оптимизировать условия роста исследуемых микроорганизмов и состав среды. После оптимизации необходимо получить большой объем культуральной жидкости (1 л) с максимальной концентрацией сидерофоров. Культуральную жидкость необходимо отцентрифугировать при 4600-6000 об./мин в течение 45 мин при комнатной температуре, полученный супернатант профильтровать через 0.22 μm фильтр. Подготовить C18 картридж (Supelco, PA, USA) путем пропускания через него 100% метанола.

Профильтрованный супернатант пропустить через C18 картридж (приблизительно 700 мг носителя картриджа на 1л супернатанта), после чего необходимо промыть картридж деионизированной водой и элюировать сидерофоры 100% метанолом для экстракции полярных соединений. После чего, можно произвести элюцию с картриджа 80% ацетонитрилом для экстракции менее полярных соединений. Нельзя оставлять носитель в картридже в сухом состоянии во время процедуры экстракции сидерофоров.

Полученный экстракт сидерофоров помещают в вакуумный испаритель (30⁰-45⁰С, 4-5 ч). Высушенный материал хранить при -20⁰С до использования. Для подавления продукции сидерофоров микроорганизмами в среду культивирования необходимо вносить FeCl₃ и подвергать тем же процедурам, что культуральные жидкости, содержащие сидерофоры (отрицательный контроль).

4. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) сидерофоров.

Высушенный материал (метанольная фракция) перерастворить в воде с 0.1% трифторуксусной кислотой (ТФУ).

Хроматограф: UHPLC UltiMate® 3000, оснащенный автоматическим пробоотборником, инжектором, диодным и флюоресцентным детектором.

Рекомендуемая колонка для хроматографического разделения: обращенно-фазовая Acclaim® PolarAdvantage II (PA2) C18, 5 μm , 250 x 4.6 мм.

Подвижная фаза: вода/ацетонитрил с 0.01% ТФУ (А=99.99% вода/0.01% ТФУ; В=80% ацетонитрил/19.99% вода/0.01% ТФУ).

Градиент:

Время, мин	Фаза	% соотношение
0-40	В	0-60
40-50	В	60-100
50-55	В	100

Скорость потока: 1 мл/мин.

Температура разделения: 22⁰С.

Детекция: при 220 нм, 260 нм, 435 нм, 650 нм, флюоресцентный детектор (возбуждение при 470 нм, эмиссия 530 нм).

Стандарты: в качестве представителя катехолового типа сидерофоров был выбран – энтеробактин (Sigma E3910), в качестве гидроксаматового типа сидерофоров был выбран – дефероксамин (Sigma E9533).

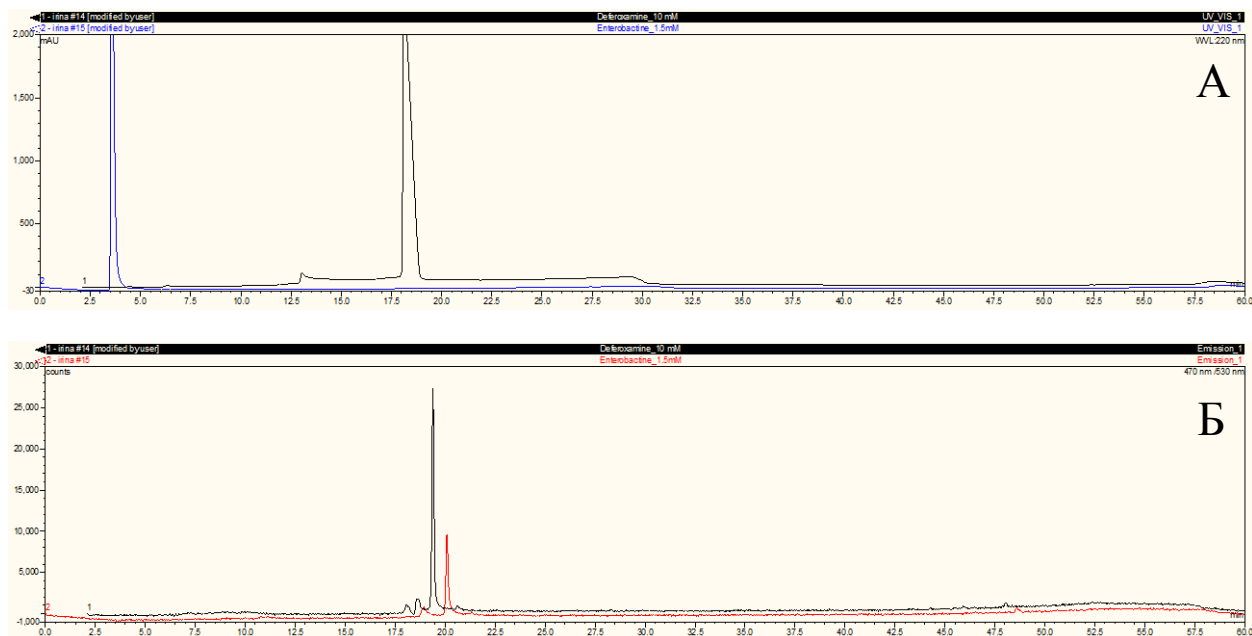
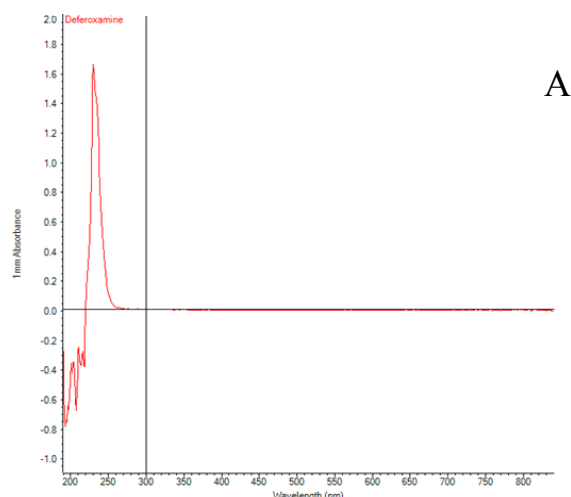


Рис. 10. ВЭЖХ хроматограмма стандартов сидерофоров (А) детектируемых при 220 нм (черная линия – дефероксамин; синяя линия – энтеробактин). (Б) детектируемых флюоресцентным детектором (черная линия – дефероксамин; красная линия – энтеробактин).

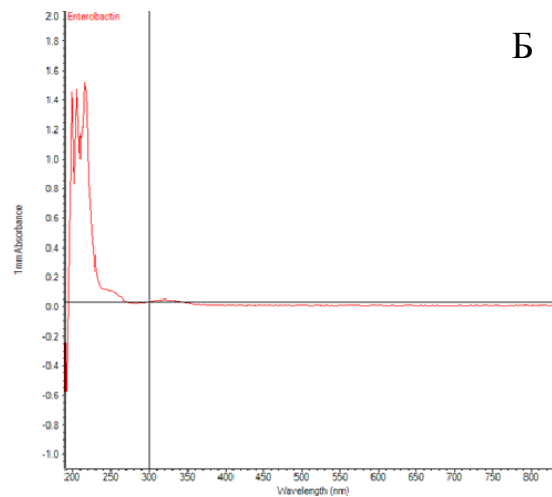
После ВЭЖХ разделения микробных сидерофоров производят фракционирование отдельных пиков для последующего анализа.

5. Уф-видимые спектры чистых фракций сидерофоров.

УФ-видимые спектры сидерофоров были получены на спектрофотометре NanoDrop 2000 при сканировании в диапазоне 200-800 нм.



А



Б

Рис. 11. УФ-видимые спектры (А) дефероксамина, (Б) энтеробактина.

6. Масс-спектрометрия (LC/MS/MS) чистых фракций сидерофоров.

Хроматограф: масс-спектрометр ABSciex QTRAP 6500, комбинированный с высокоэффективным жидкостным хроматографом Agilent 1290 Infinity (LC/MS/MS System).

Колонка: ZORBAX Eclipse Plus C18 RR HD 2.1x50 mm 1.8-Micron (Agilent).

Температура разделения: 40 °С.

Подвижная фаза: вода/ ацетонитрил/ муравьиная кислота (А=94,9% вода / 5% ацетонитрил / 0.1% муравьиная кислота; В=94,9%ацетонитрил / 5% вода / 0.1% муравьиная кислота).

Градиент:

Время, мин	Фаза	% соотношение
0-1	В	0-2
1-6	В	2-95
6-7	В	95
7-8	В	95-2
8-9	В	2

Скорость потока 400 мкл/мин.

Температура автосемплера 10 °С.

Спектры родительских (MS) и дочерних ионов (MS/MS) получают прямым заколом раствора чистых веществ в масс-спектрометр с помощью шприцевого насоса.

Скорость потока 7 мкл/мин, режим работы - тройной квадруполь, тип сканирования Q1 MS и Product Ion (MS/MS).

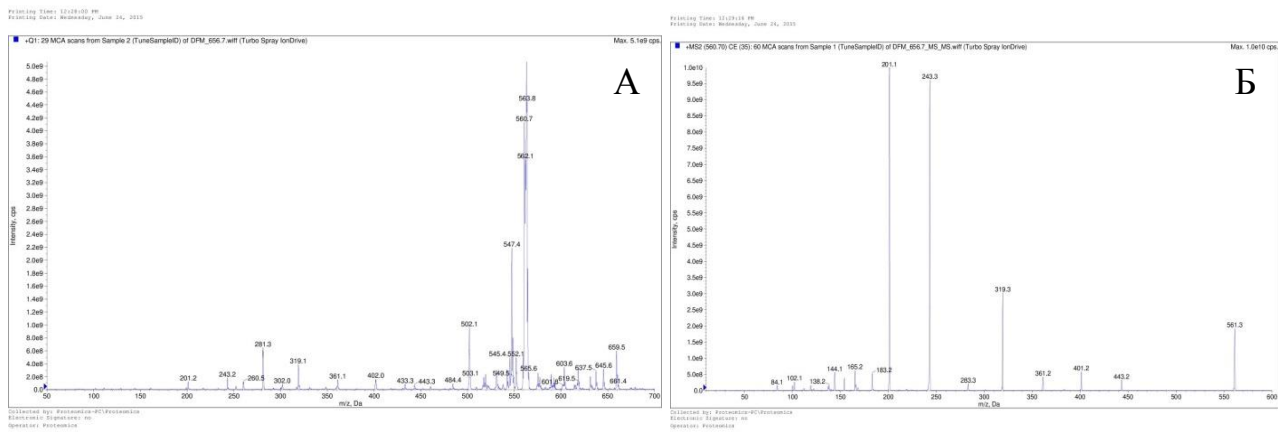


Рис. 12. (А) Масс-спектр дефероксамина (MS), (Б) масс-спектры дочерних ионов (MS/MS).

Количественное содержание сидерофор определяют методом мониторинга множественных реакций (MRM), позволяющим селективно оценивать отдельные соединения. На основании спектра дочерних ионов выбирают несколько MRM переходов сидерофор (Таблица 1).

Таблица 1. Данные фрагментационного анализа исходных и дочерних ионов десфероксамина и энтеробактина.

	Дефероксамин	Энтеробактин
Исходный ион m/z	659.5 (Дефероксамина мезилат) 561.3 (Дефероксамин)	692.21 (Энтеробактин +Na ⁺)
Дочерние ионы	84.1; 102.1; 144.1; 165.2; 183.2; 201.1; 243.3; 319.3; 361.2; 401.2; 443.2	556.13; 469.11; 333.07; 315.00; 426.04; 159.01

Образец, содержащий сидерофоры разделяют на хроматографе и вводят в масс-спектрометр.

Параметры масс-спектрометрии:

Тип сканирования MRM, детекция положительно-заряженных ионов,

Температура источника 500 °С,

Напряжение 5200 В,

Давление газа-завесы 35 psi, давление газа источника 1 - 60 psi, давление газа источника 2 - 60 psi,

Энергия ячейки соударений 35 эВ.

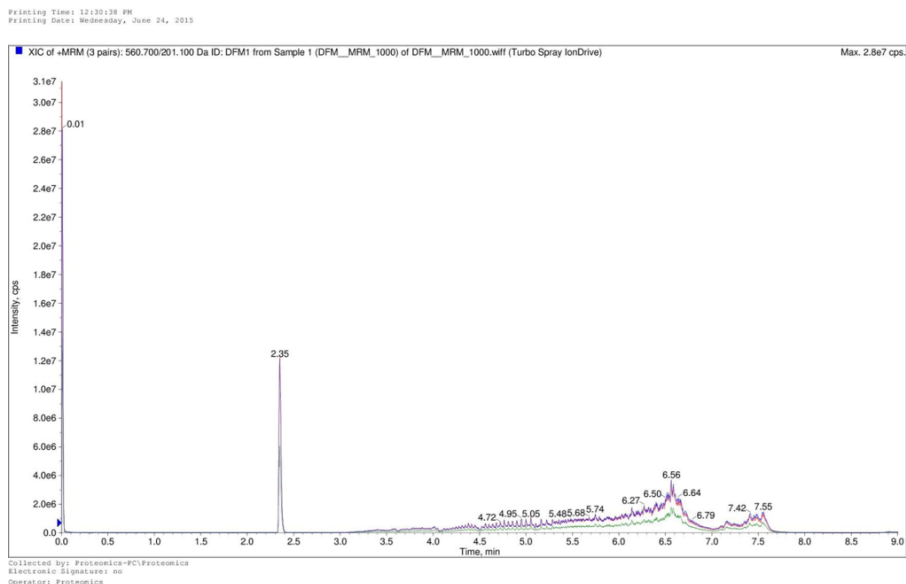


Рис. 13. Хроматограмма MRM переходов дефероксамина.

Получение и обработку спектров проводят в программе Analyst 1.6.2 (AB Sciex).

Содержание сидерофор определяют по площади пика каждого MRM перехода с помощью программы MultiQuant 3.0.2.

7. Высокоэффективная жидкостная хроматография сверхвысокого разрешения (ВЭЖХ - МС/МС).

Высушенный материал: (метанольная фракция) перерастворить в воде.

Хроматограф: Maxis impact квадрупольно-времяпролетный масс-спектрометр с ионизацией электроспреем (Captive Spray).

Рекомендуемая предколонка: Acclaim PepMap100, C18, 3 μm , 100 \AA , 75 μm x 2 см.

Рекомендуемая колонка: Acclaim PepMap RSLC, nanoViper, C18, 2 μm , 100 \AA , 75 μm x 15 см.

Подвижная фаза: вода/ацетонитрил с 0.1% ТФУ (A=94.9% вода /5% ацетонитрил / 0.1% ТФУ; B=94.9% ацетонитрил/5% вода/0.1% ТФУ).

Предварительно образец обессоливают в предколонке в течение 5 мин. 2% фазой В (скорость потока 5 мкл/мин.). Затем образец поступает в колонку и разделяется в соответствии с градиентом:

Время, мин	Фаза	% соотношение
0-5	В	0-2
5-20	В	2-50
20-21	В	50-90
20-28	В	90
28-30	В	90-2
30-35	В	2

Скорость потока: 0.3 $\mu\text{л}/\text{мин}$.
Температура разделения: 40 $^{\circ}\text{C}$.
Напряжение на источнике: 1600 В.
Частота снятия спектров: 2 Гц.
Режим: позитивная ионизация.
Диапазон сканирования масс: 50 до 2200 m/z .

Стандарты: в качестве представителя катехолового типа сидерофор был выбран – энтеробактин (Sigma E3910), в качестве гидроксаматового типа сидерофор был выбран – дефероксамин (Sigma E9533).

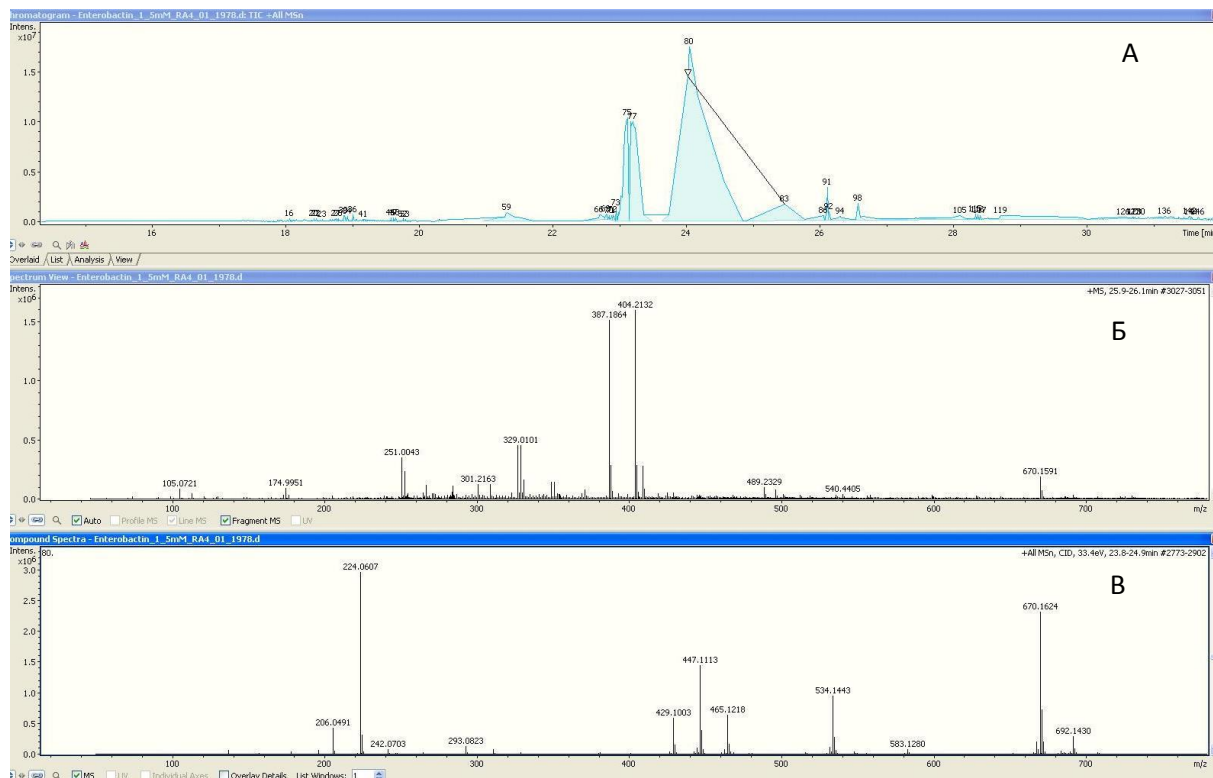


Рис. 14. (А) Хроматограмма энтеробактина, (Б) Масс-спектр энтеробактина (MS), (В) масс-спектр дочерних ионов (MS/MS) энтеробактина.

Обработку спектров осуществляют с помощью программного обеспечения PeakView $^{\circledR}$ Software (ABSciex), которое позволяет производить поиск и интерпретацию масс-спектральных данных. ПО позволяет выявить и охарактеризовать соединения, изучить их биотрансформацию, обеспечить понимание механизма фрагментации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Нетрусов, А.И. Экология микроорганизмов / Нетрусов А.И., Бонч-Осмоловская Е.А., Горленко В.М., Иванов М.В. и др. // Изд.: Издат. центр «Академия», – 2004. – С. 1-272.
2. Archibald, F. *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron / F. Archibald // FEMS Microbiol. Lett. – 1983. – V. 19. –P. 29–32.
3. Arnow, L.E. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine–tyrosine mixtures / L.E. Arnow // J. Biol. Chem. – 1937. – V. 118. – P. 531–537.
4. Atkin, C.L. Rhodotorulic acid from species of *Leucosporidium*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* and *Sporobolomyces*, and a new alanine-containing ferrichrome from *Cryptococcus melibiosum* / C.L. Atkin, J.B. Neilands, H.J. Phaff // J. Bacteriol. – 1970. – V. 103. – P. 722–733.
5. Ahmed E. Siderophores in environmental research: roles and applications / E. Ahmed and J.M. Holmstrom // Microb. Biotech. – 2014. – V. 7. – N.3. – P. 196–208.
6. Barbeau, K. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* / K. Barbeau, G.P. Zhang, D.H. Live and A. Butler // J. Am. Chem. Soc. – 2002. – V. 124. – P. 378–379.
7. Brainard, J.R. Actinide binding and solubilization by microbial siderophores / J.R. Brainard, B.A. Strietelmeier, P.H. Smith, P.J. Langston-Unkefer, M.E. Barr and R.R. Ryan // Radiochem. Acta – 1992. – V. 58-59. – P. 357–363.
8. Bedford, M.R. Iron chelation in the treatment of cancer: a new role for deferasirox? / M.R. Bedford, S.J. Ford, R.D. Horniblow, T.H. Iqbal, C. Tselepis // J. Clin. Pharmacol. – 2013. – V. 53. – N. 9. – P. 885-91.
9. Cornelis, P. Iron uptake and homeostasis in microorganisms / P. Cornelis and S.C. Andrews // Caister Academic Press, Norfolk, UK P. 1-85.
10. Braud, A. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria / A. Braud, K. Jézéquel, S. Bazot, and T. Lebeau // Chemosphere. – 2009. – V. 74. –P. 280–286.
11. Foley, T.L. Targeting iron assimilation to develop new antibacterials / T.L. Foley and A. Simeonov // Expert Opin. Drug. Discov. – 2012. – V. 7. – N. 9. –P. 831–847.
12. Gauglitz, J.M. A suite of citrate-derived siderophores from a marine *Vibrio* species isolated following the Deepwater Horizon oil spill / J.M. Gauglitz, H. Zhou and A. Butler // J. Inorg. Biochem. – 2012. – V. 107. –P. 90–95.
13. Hong, J.W. Pyrene degradation and copper and zinc uptake by *Fusarium solani* and *Hypocrea lixii* isolated from petrol station soil / J.W. Hong, J.Y. Park and G.M. Gadd // J. Appl. Microbiol. – 2010. – V. 108. –P. 2030–2040.
14. Hu, X. Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213 / X. Hu and G.L. Boyer // App. Environ. Microbiol. – 1996. – V. 62. – N. 11. – P. 4044–4048.

15. Jambor, J.L. Occurrence and constitution of natural and synthetic ferrihydrite, a widespread iron oxyhydroxide / J.L. Jambor, J.E. Dutrizac // *Chem. Rev.* – 1998. – V. 98. – P. 2549–2586.
16. Johnstone, T.C. Beyond iron: non-classical biological functions of bacterial siderophores / T.C. Johnstone and E.M. Nolan // *Dalton Trans.* – 2015. – V. 44. – N.3. – P. 6320–6339.
17. Kalinowski, B.E. Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches / B.E. Kalinowski, L.J. Liermann, S. Givens, S L. Brantley // *Chemical Geology* – 2000. – V. 169. –P. 357–370.
18. Neilands, J.B. Detection, determination, isolation, characterization and regulation of microbial iron chelates / J.B. Neilands and K. Nakamura // In: Winkelmann G. (ed) *Handbook of microbial iron chelates*. CRC Press, Boca Raton, Fla, P. 1-14.
19. Payne, S.M. Detection, isolation, and characterization of siderophores / S.M. Payne // In: *Methods in enzymology*, Academic Press, Inc. – 1994. – V. 235. – P. 329–344.
20. Rabaey, K. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells / K. Rabaey, N. Boon, M. Hofte, W. Verstraete // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. – V. 39. –P. 3401–3408.
21. Schalk, I.J. Minireview new roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance / I.J. Schalk, M. Hannauer and A. Braud // *Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 13. –P. 2844–2854.
22. Winkelmann, G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi / G. Winkelmann // *Biomaterials*. – 2007. – V. 20. –P. 379–392.
23. Weigel, K.J. Iron chelation and multiple sclerosis / K.J. Weigel, S.G. Lynch and S.M. LeVine // *ASN Neuro.* – 2014. – V.6. – N.1. – P. 43-63.