

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭНДОГЕННЫХ ФТАЛАТОВ У БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ РАСТЕНИЙ И ЖИВОТНЫХ

Т. Н. Шафикова*, Ю. В. Омеличкина, С. В. Бояркина,
А. Г. Еникеев, Л. А. Максимова, А. А. Семёнов**

Представлено академиком РАН Б.А. Трофимовым 02.03.2018 г.

Поступило 11.07.2018 г.

Впервые в клетках бактериальных патогенов растений (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium radiobacter*) и животных (*Escherichia coli*) были обнаружены эндогенные фталаты — дибутилфталат и ди(2-этилгексил)-о-фталат.

Ключевые слова: эндогенные фталаты, бактериальные патогены.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524841121-124>

Фталаты — сложные эфиры орто-фталевой кислоты — используются как пластификаторы во многих крупномасштабных производствах. Их находят повсеместно и считают опасными поллютантами-ксенобиотиками, продуктами производственной деятельности человека [1]. К наиболее распространённым относят дибутилфталат (ДБФ) и ди(2-этилгексил)фталат (ДЭГФ). Вместе с тем имеются сведения о наличии фталатов природного происхождения. Так, к настоящему времени они обнаружены практически во всех исследуемых организмах — в красных [2] и пресноводных водорослях, цианобактериях [3], в нитчатых грибах видов *Penicillium lanosum*, *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus niger* [4], в культуральной жидкости почвенного гриба *Trichoderma harzianum* [5], а также в растениях разных семейств [6–8]. Причём в зависимости от локализации в органах растения содержание фталатов имело качественные и количественные различия. Так, в гексановом экстракте из лаванды (*Lavandula officinalis*) содержание ДЭГФ составило: в листьях — 12,8%, в стеблях — 16,7% [8]; в листьях, соцветиях и стеблях аронника палестинского (*Arum palaestinum*) — содержание фталатов составило 36,3; 26,1 и 5,6 мкг/г соответственно [6].

Недавнее обнаружение фталатов в закрытых модельных системах — растениях *in vitro* и в культурах клеток *Aconitum baicalense* — послужило косвенным доказательством их эндогенности [7]. Для прямого

доказательства возможности биосинтеза фталатов *de novo* лабораторные культуры пресноводных водорослей и цианобактерий культивировали, используя в качестве единственного источника углерода стабильный изотоп ¹³C в составе NaH¹³CO₃, включение которого было зарегистрировано во фталатах, выделенных из перечисленных организмов. Таким образом, синтез *de novo* фталатов в клетках исследованных организмов был доказан. Кроме того, была установлена способность клеток в условия стресса секретировать фталаты во внеклеточную среду, что может иметь биологическое значение при взаимодействии различных организмов [3]. Присутствие эндогенных фталатов у бактерий практически не изучалось, за исключением сообщений о выделении из бактерий рода *Streptomyces* и идентификации как эндогенных соединений диэтилгексилфталата, обладающего антибактериальным действием против ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [9], и ДБФ, проявляющего фунгицидную активность в отношении возбудителя пятнистости листьев табака *Rhizoctonia solani* [10].

На основании описанных выше данных можно ожидать наличие эндогенных фталатов, принимающих участие в защитных реакциях, и у других бактериальных микроорганизмов. На наш взгляд, особый интерес представляло обнаружение эндогенных фталатов у бактерий разных жизненных стратегий (симбионты, эндофиты, патогены растений и животных) и установление в дальнейшем их биологических функций.

Цель работы — экстрагировать и идентифицировать эндогенные фталаты у бактериальных патогенов растений: *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*

Сибирский институт физиологии и биохимии растений
Сибирского отделения Российской Академии наук,
Иркутск

* E-mail: t-shafikova@yandex.ru

** E-mail: laps1936@mail.ru

(*Cms*), *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (*Pcc*), *Rhizobium rhizogenes* (*R-Ri*), *Rhizobium radiobacter* (*R-Ti*), — и животных: *Escherichia coli* (*E. coli*).

Изучаемые микроорганизмы отличаются по типам питания: *Cms* — биотроф, использующий ресурс живых клеток растения-хозяина; *Pcc* — некротроф, использующий ресурс мёртвых клеток; *R-Ri* и *R-Ti* — биотрофы, индуцирующие изменённый морфогенез растения для направленного биосинтеза нужных бактериям соединений; *E. coli* — биотроф, симбионт теплокровных животных, условный патоген.

Культуры бактерий *Cms* (штамм Ac-1405) и *Pcc* (штамм V1247) были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов, г. Пушкино; *R-Ri* (штамм RiC58C1), *R-Ti* (штамм TiC58), *E. coli* (безплазмидный штамм XL-1Blue) — из коллекции ЦКП “Биоресурсный центр” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

Культивирование бактерий осуществляли в темноте, при покачивании, при температуре 26°C, используя для культивирования *Cms* среду С, для *Pcc* и *E. coli* — мясопептонный бульон, для *R-Ri* и *R-Ti* — среду YPD. Через 72 ч культивирования бактериальную суспензию освобождали от культуральной среды центрифугированием и лиофильно высушивали на установке Иней 3-2 (СКБ БП АН СССР). Точные навески лиофилизированного центрифугата бактерий трижды экстрагировали

петролевым эфиром (40–70°), настаивая каждый раз не менее суток. Объединённые экстракты упаривали досуха в вакууме водоструйного насоса и переносили в градуированный пикнометр с помощью гексанового раствора с точной концентрацией динонилфталата (внутренний стандарт) и доводили до метки.

Анализ образцов проводили методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором с использованием хромато-масс-спектрометра 7000QQQ/7890A (“Agilent Technologies”, США). Объём вводимой пробы 0,2 мкл. Температура испарителя составляла 250°C, источника ионов 230°C, детектора 150°C, температура линии, соединяющей хроматограф с масс-спектрометром — 280°C. Диапазон сканирования 50–800 а.е.м. Для разделения использовали капиллярную колонку HP-5MS (30 м × 0,250 мм × 0,50 мкм) с фазой 5% фенил-метил-полисилоксан, градиент температуры от 70 до 280°C со скоростью 5°C/мин, затем выдерживание при 280°C в течение 10 мин. Газ-носитель — гелий, скорость потока газа 1 мл/мин. Разделение потоков 5:1. Масс-спектрометр — тройной квадруполь, способ ионизации — электронный удар (энергия ионизации 70 эВ). Анализ проводили в режиме поиска отдельных ионов. Для идентификации целевых соединений использовали сравнение их времени удерживания со временем

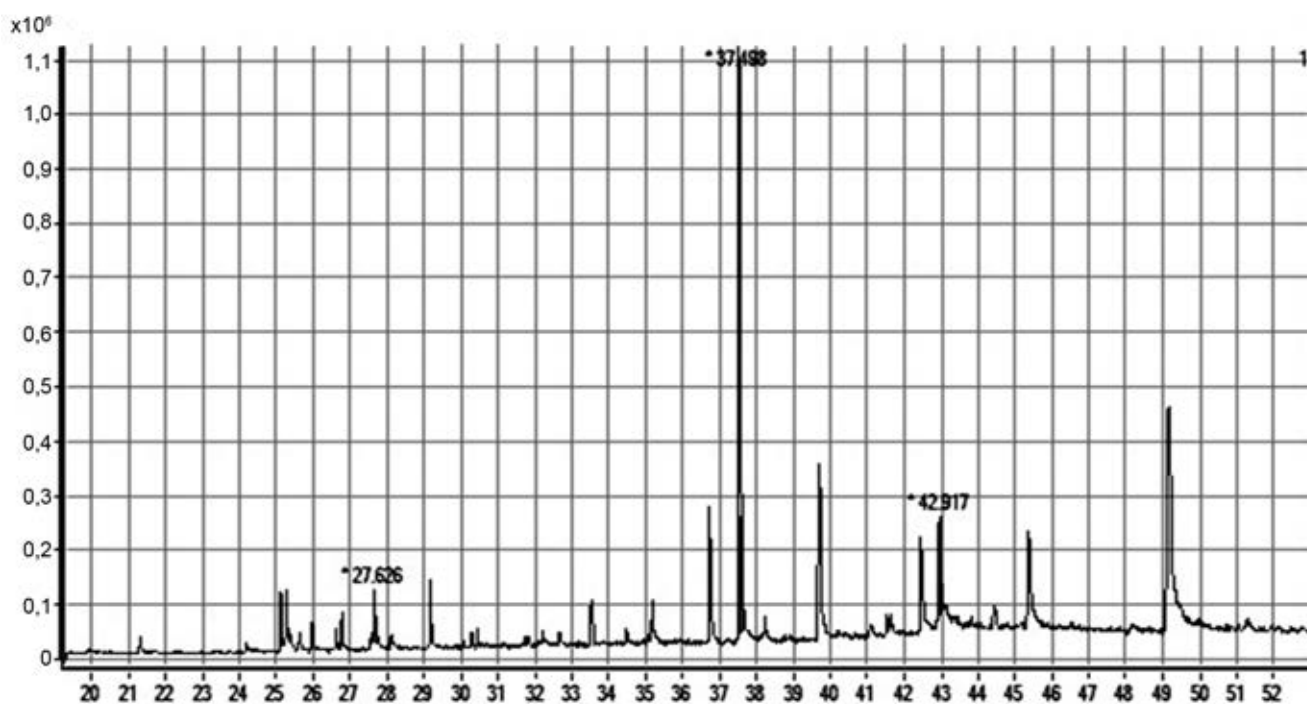


Рис. 1. Типичная хроматограмма орто-фталатов, экстрагированных из фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* (*Pcc*): 27,626 — дибutilфталат; 37,498 — ди-2-этилгексилфталат; 42,917 — динонилфталат (внутренний стандарт).

Таблица 1. Содержание сложных эфиров орто-фталевой кислоты в бактериях, мкг/г сухого веса

Фталаты	Бактерии				
	<i>Cms</i>	<i>Pcc</i>	<i>R-Ri</i>	<i>R-Ti</i>	<i>E. coli</i>
ДЭГФ	70–121	80–121	60–90	50–80	26–30
ДБФ	7–9	35–45	11–20	8–13	8–55

удерживания стандартов, а также с данными библиотеки масс-спектров NIST08 и WILEY7 (рис. 1). Количество фталевых эфиров определяли сравнением площадей хроматографических пиков с площадью пика внутреннего стандарта и рассчитывали по формуле

$$\frac{\Phi \cdot V_n \cdot K}{C_m \cdot MO},$$

где Φ — площадь пика определяемого фталата, условные единицы; K — объём мерной колбы, мл (г); C_m — площадь пика стандарта, условные единицы; V_n — концентрация стандарта, мкг/мл; MO — навеска образца, г. Эксперименты проводили в трёх повторностях.

Полученные результаты представлены на рис. 1 и обобщены в табл. 1.

Важно отметить, что исследуемые на присутствие эндогенных фталатов бактерии были размножены из коллекционных культур. Эксперименты проводили в условиях, исключающих наличие примесей фталатов в реактивах, материалах и посуде, что тщательно контролировали. Применяемые питательные среды и другие материалы проверяли на присутствие экзогенных фталатов. Их содержание в питательных средах не превышало 1 мкг в 100 мл. Все эксперименты проводили в стеклянной посуде. Таким образом, обнаруженные в наших экспериментах фталаты были однозначно природного происхождения.

Исходя из полученных нами результатов, можно констатировать факт выявления эндогенных фталатов в бактериях разных жизненных стратегий: эндофиты, симбионты, биотрофные и некротрофные бактериальные патогены растений и животных. Принимая во внимание данные других исследователей об обнаружении фталатов в организмах

разных таксономических групп, с высокой степенью вероятности можно предполагать, что фталаты являются функционально значимыми, отобранными в процессе эволюции метаболитами.

Работа выполнена на оборудовании ЦКП “Биоаналитика” с использованием коллекции ЦКП “Биоресурсный центр” Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vitali M., Guidotti M., Macilenti G., Cremisini C. // Environ. Internat. 1997. V. 23. № 3. P. 337–347.
2. Chih Yu Chen // Water Res. 2004. V. 38. № 4. P. 1014–1018.
3. Babu B., Wu J.-T. // Sci. Total Environ. 2010. V. 408. № 21. P. 4969–4975.
4. Tian C., Ni J., Chang F., Liu S., Nan X., Sun W., Xie Y., Guo Y., Ma Y., Yang Z., Dang C., Huang Y., Tian Z., Wang Y. // Sci. Rept. 2016. V. 6. DOI: 10.1038/srep19791.
5. Senthilkumar G., Madhanraj P., Panneerselvam A. // Asian J. Pharm. Res. 2011. V. 1. № 1. P. 19–21.
6. Husein A. I., Ali-Shtayeh M. S., Jamous R. M., Jondi W. J., Zatar N. A.-A. // Int. J. Curr. Res. Aca. Rev. 2014. V. 2. № 9. P. 195–203.
7. Семёнов А. А., Еникеев А. Г., Снеткова Л. В., Пермяков А. В., Соколова Н. А., Дударева Л. В. // ДАН. 2016. Т. 471. № 3. С. 366–367.
8. Shafaghat A., Salimi F., Amani-Hooshyar V. // J. Med. Plant Res. 2012. V. 6. № 3. P. 455–460.
9. Al-Bari M. A. A., Sayeed M. A., Rahman M. S., Mosadik M. A. // Res. J. Med. and Med. Sci. 2006. V. 1. № 2. P. 77–81.
10. Ahsan T., Chen J., Zhao X., Irfan M., Wu Y // AMB Exp. 2017. V. 7. № 54. P. 1–9.

DETECTION OF ENDOGENOUS PHTHALATES IN BACTERIAL PATHOGENS OF PLANTS AND ANIMALS

**T. N. Shafikova, U. V. Omelichkina, S. V. Boyarkina, A. G. Enikeev,
L. A. Maksimova, A. A. Semenov**

Presented by Academician of the RAS B.A. Trofimov March 2, 2018

Received 11 July, 2018

The endogenous esters of *ortho*-phthalic acid, dibutyl phthalate (DBP) and di-(2-ethylhexyl)-*o*-phthalate (DEHP), have been first detected in bacterial pathogens of plants (*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium radiobacter*) and animals (*Escherichia coli*).

Keywords: endogenous phthalates, bacterial pathogens.