

УДК 577.13:579.66

DOI: 10.31040/2222-8349-2023-0-1-97-103

**АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ ПИГМЕНТОВ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
РОДА *JANTHINOBACTERIUM***

© П.Ю. Мильман, Е.А. Гильванова, Л.Ю. Кузьмина, Н.Ф. Галимзянова

Среди природных источников известны микробные пигменты, включая меланин, пиоцианин, бактериохлорофилл, виолацеин, продигиозин и каротиноиды, которые проявляют разнообразную биологическую активность в качестве антиоксидантов и демонстрируют противовоспалительные, противораковые, противопаразитарные и антимикробные свойства. Выделение, исследование и идентификация штаммов, продуцирующих пигменты, представляют интерес для разработки биотехнологических процессов, нацеленных на промышленный биосинтез этих соединений. Изучены антибактериальные свойства синефиолетового (VIO) и красного (RED) пигментов новых штаммов бактерий IB-ST-GO и IB-ST-GOR, выделенных из природных вод воклюзного источника пещеры Шульган-Таш (Южный Урал). Сиквенс-анализ гена 16S рРНК выявил принадлежность продуцентов пигментов IB-ST-GO и IB-ST-GOR к представителям клада *Janthinobacterium lividum* с уровнем сходства 99.72 и 99.86% соответственно. Пигменты экстрагировали 96%-м этанолом из биомассы, полученной при культивировании штаммов на агаризованной среде Wakimoto. По результатам спектрофотометрического анализа установлено, что пигмент VIO относится к семейству виолацеинов, а пигмент RED – семейству продигиозинов. Выделенные пигменты проверены на антибактериальное действие к 8 видам грамположительных и грамотрицательных бактерий, определены ингибирующие концентрации обоих неочищенных препаратов. Пигменты VIO и RED проявляют ингибирующий эффект в диапазоне концентраций 1.0–5.0 мг/мл для выборки грамположительных бактерий, тогда как в отношении грамотрицательных бактерий уровень ингибирующих концентраций для препарата RED составляет 10.0–20.0 мг/мл, а для VIO выше 20.0 мг/мл. Пигмент RED проявляет в большей степени дозозависимый эффект и более высокую селективность по отношению к грамположительным бактериям, чем препарат VIO. В совокупности оба пигмента являются сильными ингибиторами роста грамположительных бактерий, в то время как антимикробная активность обоих пигментов в отношении грамотрицательных бактерий невысока.

Ключевые слова: бактерии, *Janthinobacterium*, пигмент, виолацеин, продигиозин, антимикробная активность.

Введение. Бактериальные клетки продуцируют огромное количество биологически активных соединений, включая витамины, аминокислоты, антибиотики и ферменты. В настоящее время оценена биотехнологическая значимость еще одной группы вторичных метаболитов бактерий – пигментов [1]. Пигменты часто описывают как соединения, обладающие способностью поглощать и отражать определенную часть электромагнитного видимого спектра. При таком широком определении пигменты

повсеместно распространены в природе и имеют огромное разнообразие химических структур, свойств и применений [2]. Они обычно используются в качестве красителей в пищевой, текстильной или косметической промышленности, или в качестве фармацевтических продуктов, обладающих биологическими активностями, такими как антиоксидантная, антибактериальная или противораковая [3]. Способность синтезировать пигменты, различающиеся по химическому составу, цвету и растворимости,

МИЛЬМАН Полина Юрьевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: polina.milman@gmail.com

ГИЛЬВАНОВА Елена Альбертовна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: gelena@anrb.ru

КУЗЬМИНА Людмила Юрьевна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: ljkuz@anrb.ru

ГАЛИМЗЯНОВА Наиля Фауатовна – к.б.н., Уфимский Институт биологии УФИЦ РАН,
e-mail: galnailya@yandex.ru

характерна для многих микроорганизмов. Роль пигментов для микроорганизмов может заключаться в участии в процессах дыхания, для защиты от ультрафиолетового излучения. Кроме того, некоторые микроорганизмы синтезируют пигменты, обладающие антибактериальными и/или противогрибковыми свойствами. Образование микроорганизмами вторичных метаболитов, обеспечивающих их антагонистические эффекты, является адаптацией к условиям существования в микробном сообществе [4].

Пигментам природного происхождения уделяется гораздо больше внимание поскольку они являются альтернативой синтетическим пигментам, что особенно важно при производстве продуктов питания, фармацевтике, косметологии и текстильной промышленности [5, 6]. Положительными свойствами натуральных пигментов является возможность биологического разложения и возможность их получения из различных ресурсов, таких как микроорганизмы, растения, животные [7]. Пигменты, полученные из перечисленных выше источников, используются реже из-за сложной структуры пигментсодержащей ткани и трудностей с их извлечением. Среди видов микроорганизмов, продуцирующих пигмент, бактерии обладают определенными преимуществами, основанными на их быстром росте, всесезонной доступности, коротком жизненном цикле и простой технике размножения [7]. Кроме того, бактериальные пигменты обладают противомикробной, противораковой и антипаразитарной биоактивностью, что расширяет их потенциал в качестве фармацевтических продуктов [2, 5]. Последним значимым достижением биотехнологического применения бактериальных пигментов является использование виолацеина в одноразовых масках в борьбе с вирусными заболеваниями [9].

Выделение и идентификация штаммов, продуцирующих пигменты, исследование их вторичных метаболитов, представляет большой интерес для возможности их использования в инновационных биотехнологических производствах.

Целью настоящей работы было изучение антимикробных свойств неочищенных этанольных пигментных экстрактов сине-фиолетового и красного цвета, выделенных из новых штаммов бактерий рода *Janthinobacterium*.

Объекты и методы исследования. Микроорганизмы, использованные в работе, и условия культивирования. В качестве источни-

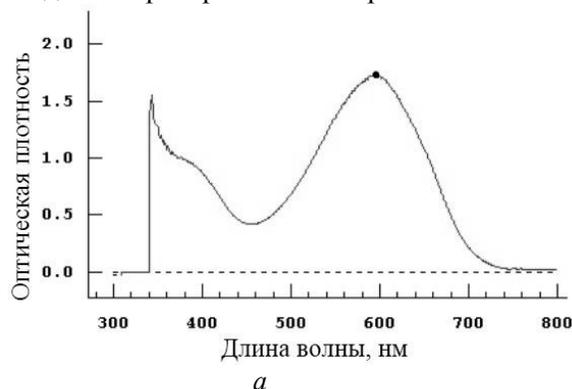
ков пигментов использовали бактерии рода *Janthinobacterium*, выделенные из природных вод воклюзного источника «Голубое озеро» пещеры Шульган-Таш (Капова), Южный Урал (N53°02'45.854895 – E57°03'33.564721). Молекулярно-генетическая идентификация штаммов бактерий IB-ST-GO и IB-ST-GOR с помощью анализа последовательностей гена 16S рРНК позволила отнести их к кладу *Janthinobacterium lividum* с уровнем сходства 99.72 и 99.86% соответственно. Штамм IB-ST-GO активно образовывал сине-фиолетовый пигмент (VIO) на вторые сутки на агаризованных и жидких средах Luria Bertani (LB) и Wakimoto [10] при культивировании температуре 24°C. Среда Wakimoto (г/л): картофельный отвар – 1000 мл, Ca(NO₃)₂*4H₂O – 0.5, Na₂HPO₄*12H₂O – 2, пептон – 5, сахароза – 15, агар – 15 [10]. Источником красного пигмента являлся штамм IB-ST-GOR, который также активно образовывал его внутриклеточно на упомянутых выше средах. Прочитанные последовательности гена 16S рРНК обоих штаммов доступны в Генбанке (NCBI) под номерами OQ143958 и OQ144911.

Получение и извлечение пигментного комплекса. Для получения пигментов штаммы-продуценты культивировали на агаризованной среде Wakimoto. Культуры выращивали в термостате ТС-80М-2 (Россия) при температуре 24°C в течение 7 сут. Выросшую биомассу снимали с агара скальпелем, к ней добавляли 96%-й этанол для экстрагирования пигмента из клеток. Далее смесь встряхивали на шейкере MPS-1 («Biosan», Латвия) 30 мин, центрифугировали при 12000 g в течение 10 мин на Centrifuge CM-50 («ELMI», Латвия) и отбирали надосадочную жидкость, осадок вновь заливали 96%-м этанолом. Данную процедуру повторяли до исчезновения окраски в биомассе. Спиртовые экстракты пигментов сине-фиолетового (VIO) и красного (RED) цвета концентрировали на роторно-вакуумном испарителе Concentrator 5301 («Eppendorf», Германия). Максимумы поглощения неочищенных этанольных экстрактов пигментов определяли спектрофотометрически в диапазоне длин волн $\lambda=300-800$ нм на спектрофотометре СФ-56 (Россия).

Антибактериальная активность этанольных экстрактов пигментов. В исследованиях по выявлению антимикробной активности полученных пигментных комплексов использо-

вали штаммы грамположительных (*Bacillus subtilis* IB-54, *B. subtilis* IB-22, *B. pumilus* IB-320, *B. atrophaeus* IB-33, *Rhodococcus sp.* IB-RD) и грамтрицательных (*Stutzerimonas stutzeri* IB-16С, *Pseudomonas extremaustralis* IB-13, *P. extremaustralis* IB-13а, *P. mandelii* IB-14, *Pantoea agglomerans* IB-BF) бактерий. Все тест-штаммы взяты из коллекции культур микроорганизмов лаборатории прикладной микробиологии УИБ УФИЦ РАН, а прочитанные их последовательности гена 16S рНК доступны в Генбанке под номерами AM765842.1, MT590663.1, MT914510.1, MW586119.1, LT617886.1, MN865836.1, MT809041.1.

Антибактериальную активность этанольных экстрактов пигментов бактерий рода *Janthinobacterium* выявляли по образованию зоны задержки роста тест-культур микроорганизмов в месте внесения препарата. Для этого чашки Петри с агаризованной средой LB засеивали 24-часовой суспензией штаммов в количестве 0.1 мл плотностью ($ОП_{600}=0.1$), равномерно распределив шпателем по всей поверхности чашки. После впитывания бактериальной суспензии на поверхность питательной среды точечно наносили по 10 мкл этанольных экстрактов в различной концентрации (VIO – 0.5; 1.0; 5.0; 10.0; 20.0 мг/мл и RED – 0.5; 2.0; 5.0; 10.0; 20.0 мг/мл). В качестве контроля использовали 50%-й этиловый спирт. Результаты оценивали через 48–72 ч культивирования при 28°C (для грамтрицательных бактерий) и при 37°C (для грамположительных бактерий) по наличию или отсутствию зоны ингибирования бактериального роста на месте внесенного этанольного экстракта. Для сравнительной оценки использовали такой параметр как площадь зоны задержки роста различных штаммов от действия препаратов. Для каждой тест-культуры эксперименты проводили в трехкратной повторности.



Статистическая обработка результатов. Математическую обработку данных проводили в стандартной компьютерной программе Origin 7.0 (OriginLab Corp., США). Достоверность отличия опытных вариантов от контрольных оценивали с помощью критерия Стьюдента. Результаты считали достоверными при критерии вероятности $p \leq 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Качественный и количественный анализ полученных вторичных метаболитов пигментов включал изучение спектров поглощения в видимом диапазоне длин волн с примыкающим к нему ультрафиолетовым диапазоном. Спектр поглощения полученных неочищенных этанольных экстрактов пигментных препаратов VIO (сине-фиолетового цвета) и RED (красного цвета) регистрировали на спектрофотометре в диапазоне от 300 до 800 нм. Максимумы поглощения растворов для VIO приходится на длину волны (λ) 575 нм (рис. 1, а), а для RED – 535 нм (рис. 1, б).

Сходство спектральных свойств изучаемых этанольных экстрактов с данными идентифицированных гомологов позволяет предположить, что во вторичных метаболитах культур IB-ST-GO и IB-ST-GOR, присутствует сине-фиолетовый пигмент VIO аналогичный виолацеину [4, 11], и красный пигмент RED – продигиозину [12, 13] соответственно. Дополнительно принадлежность фиолетового пигмента к группе виолацеинов подтверждена положительным тестом Gillis и Logan [14]. Пигмент (виолацеин) определяется добавлением по каплям 10% серной кислоты к неочищенному этанольному пигментсодержащему экстракту до появления зеленого цвета. Таким образом, исследуемые бактерии рода *Janthinobacterium* могут принадлежать к группе, продуцирующей виолацеин и продигиозин.

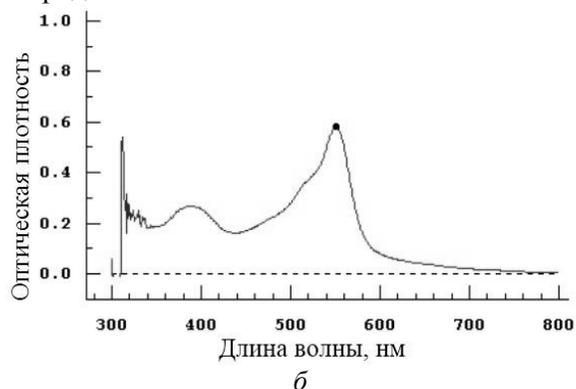


Рис. 1. Спектры поглощения этанольных экстрактов пигментных препаратов VIO (а) и RED (б) в диапазоне от 300 до 800 нм

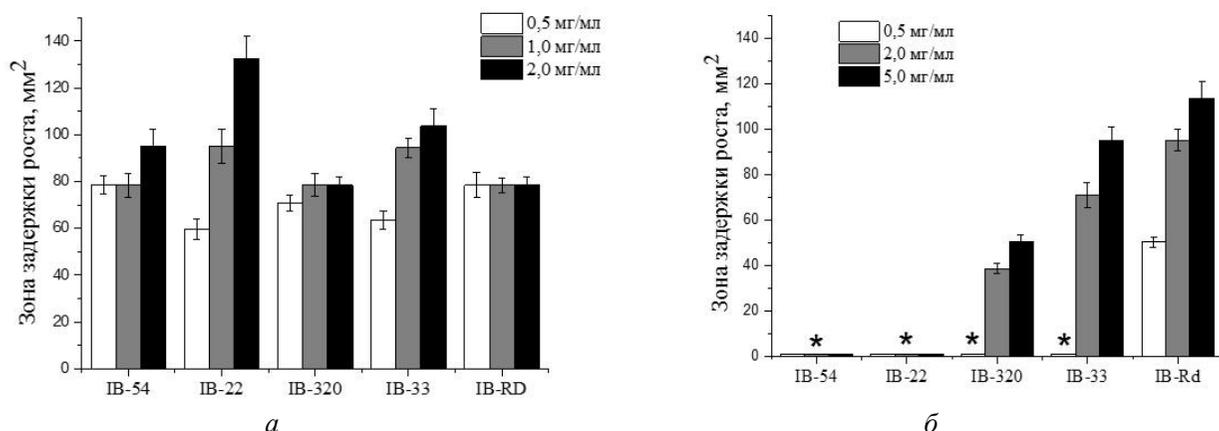


Рис. 2. Антимикробная активность пигментов в отношении грамположительных бактерий: а – VIO и б – RED. * – антибактериальная активность не обнаружена. IB-54 – *B. subtilis* IB-54, IB-22 – *B. subtilis* IB-22, IB-320 – *B. pumilus* IB-320, IB-33 – *B. atrophaeus* IB-33, IB-RD – *Rhodococcus sp.* IB-RD

Результаты оценки антибактериальной активности препаратов, содержащих VIO и RED, представлены на рис. 2, а и б.

Было обнаружено, что этанольный экстракт, содержащий VIO (рис. 2, а), проявлял антибактериальную активность в отношении всех представленных в данном эксперименте грамположительных бактерий рода *Bacillus* и *Rhodococcus*. Для представителей *Bacillus* ингибирующий эффект VIO имел тенденцию к дозозависимости (слабее у *B. pumilus* IB-320) и был ограничен во времени. На третьи сутки после нанесения пигмента отдельные колонии бактерий начинали прорастать от периферии к центру нанесения пигмента, то есть присутствовал эффект торможения роста, а не полного его подавления.

Пигмент RED (рис. 2, б) проявил ингибирующий дозозависимый эффект в отношении только двух представителей спорообразующих бацилл *B. pumilus* IB-320 и *B. atrophaeus* IB-33 в диапазоне концентраций 2.0–5.0 мг/мл, тогда как в отношении бацилл вида *B. subtilis* оказался неэффективным даже в своей высшей концентрации 5.0 мг/мл.

Интересно отметить, что в отношении представителя рода *Rhodococcus* оба пигмента проявляли антимикробную активность уже при минимальных концентрациях 0.5 мг/мл, что вероятно может быть связано с особенностями гидрофобной, склонной к адгезии поверхности родококка. Если ингибирующий эффект пигмента RED увеличивался пропорционально его концентрации, то для препарата VIO не зависел от концентрации.

Результаты оценки антибактериальной активности этанольных экстрактов RED на грамотрицательные бактерии представлены на рис. 3.

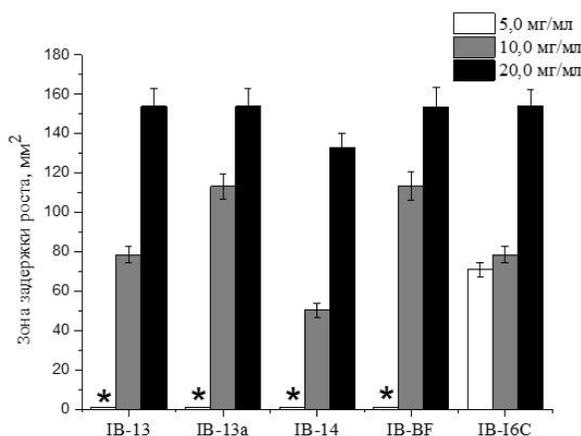


Рис. 3. Антимикробная активность пигмента RED в отношении грамотрицательных бактерий: * – антибактериальная активность не обнаружена; IB-16C – *P. stutzeri* IB-16C; IB-13 – *P. extremaustralis* IB-13; IB-13a – *P. extremaustralis* IB-13a; IB-14 – *P. mandelii* IB-14; IB-BF – *P. agglomerans* IB-BF

Все грамотрицательные тест-культуры оказались нечувствительными к действию VIO в диапазоне концентраций 5.0–20.0 мг/мл, за исключением штамма *Stutzerimonas stutzeri* IB-16C, у которого наблюдался ослабленный рост в зоне внесения препарата в высшей своей концентрации 20.0 мг/мл. Следует отметить, что штаммы *P. extremaustralis* IB-13, *P. extremaustralis* IB-13a, *P. mandelii* IB-14 выделены из грунтов подземных сред (пещера Киндерлинская), что и бактерии рода *Janthinobacterium*, являющиеся продуцентами пигментов. Тестируемые псевдомонады синтезируют повышенный уровень внеклеточных ЭПС, флуоресцирующих пигментов пиоцианина и сидерофора пиовердина, подтвержденных спектрофотометрическим анализом

и эффектом гашения флуоресценции при взаимодействии с Fe^{3+} (данные не опубликованы). Эндоситная бактерия *Pantoea agglomerans* IB-BF также продуцирует пигмент, но другой химической природы – каротин [15]. Подобные вторичные метаболиты, некоторые из которых, являясь сигнальными молекулами в системе QS, вполне могут взаимодействовать с пигментами и тем самым снижать ингибирующий эффект [16].

Все грамотрицательные тест-бактерии были более чувствительны к красному пигменту RED (рис. 3). У трех видов *P. extremaustralis* IB-13, IB-13a, *P. mandelii* IB-14 и *Pantoea agglomerans* IB-BF концентрация пигмента 10.0 мг/мл вызывала задержку роста, для вида *Stutzerimonas stutzeri* IB-I6c тот же эффект наблюдался уже при концентрации 5.0 мг/мл. Ингибирующее действие пигмента RED в отношении грамотрицательных бактерий было дозозависимым и видоспецифичным, как и в случае воздействия на грамположительные бактерии.

Вторичные метаболиты часто выполняют функции, отличные от непосредственных потребностей бактерий в росте и размножении. Многие из этих молекул биологически активны, а некоторые обладают токсичными свойствами для конкурирующих видов, что дает бактериям конкурентное преимущество [5, 17]. Антимикробная активность этих двух соединений ранее уже была изучена. Сообщается, что виолацеин активен в отношении многих грамположительных бактерий, включая *Staphylococcus*, *Bacillus* и *Streptococcus* [18], но совсем немногие грамотрицательные бактерии чувствительны к нему [19]. Несмотря на это, его спектр распространяется не на все грамположительные штаммы. Например, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 не подвергался воздействию виолацеина [20]. Продигиозин ингибирует рост широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий [21]. Кроме того, сообщалось, что продигиозин индуцирует выработку аутолизина у активно растущих *B. subtilis* и других видов *Bacillus* [22].

Антимикробная активность обоих соединений частично обусловлена их липофильной природой [23]. При введении в бактериальную культуру, продигиозин и виолацеин быстро проникают в мембраны микроорганизма и нарушают их целостность, что приводит к утечке АТФ и белка [23]. В работе *Sauz* с соавторами были смоделированы взаимодействия между виолацеином и бактериальными мембранами, и в ре-

зультате высказано предположение, что это соединение не внедряется глубоко в липидный слой [24]. Позднее было обнаружено, что, в отличие от виолацеина, продигиозин внедряется гораздо глубже в липидный слой мембраны, и далее проникая в цитоплазматическую мембрану, обеспечивает ингибирующий эффект против некоторых грамотрицательных штаммов [25]. В дополнение к разрушению мембран, продигиозин, по-видимому, вызывает дополнительные повреждения внутри бактерии, включая образование активных форм кислорода (АФК) [26, 27] и взаимодействует с бактериальной геномной ДНК [26]. Этот последний аспект его активности подтверждает более раннее исследование, в котором было показано, что продигиозин расщепляет двухцепочечную ДНК *in vitro* [28].

В нашей работе в выборке грамположительных бактерий VIO оказался более активным, чем пигмент RED, по крайней мере, это относится к эффекту, направленному против представителей *Bacillus*. Так, для образования площади зоны задержки роста IB-33 под влиянием VIO в концентрации 1.0 мг/мл красного пигмента RED требуется почти в 5 раз больше (5.0 мг/мл). Для другого бациллярного штамма IB-320 под действием пигмента VIO зона задержки роста была в 2.5 раза больше зоны, образованной под воздействием пигмента RED при исходных равных концентрациях 2.0 мг/мл. Для выборки тестируемых грамотрицательных бактерий более сильным ингибитором роста был пигмент RED, тогда как для фиолетового пигмента выбранный уровень концентраций оказался не бактерицидным и требует повышения.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что новые штаммы *Janthinobacterium* sp. IB-ST-GO и IB-ST-GOR, выделенные из природных вод воклюзного источника пещеры Шульган-Таш способны образовывать пигменты, относящиеся к семействам виолацеинов и продигиозинов соответственно, и обладающие антимикробной активностью. Из совокупности данных видно, что пигмент VIO (виолацеин) подавляет рост преимущественно грамположительных бактерий, и практически не действует на грамотрицательные бактерии. Пигмент RED (продигиозин) обладает антимикробной активностью широкого спектра действия в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, проявляя дозозависимый эффект и более высокую селективность по отношению к грамположительным бактериям.

Литература

1. Bayram S., Dengiz C., Gerçek Y.C., Cetin I., Topcul M.R. Bioproduction, structure elucidation and *in vitro* antiproliferative effect of eumelanin pigment from *Streptomyces parvus* BSB49 // Arch. Microbiol. 2020. V. 202. P. 1–9. DOI: 10.1007/s00203-020-01956-2.
2. Ramesh C., Vinithkumar N.V., Kirubakaran R., Venil C.K., Dufossé L. Multifaceted applications of microbial pigments: current knowledge, challenges and future directions for public health implications // Microorganisms. 2019. V. 7(7). 186. DOI: 10.3390/microorganisms7070186
3. Lagashetti A.C., Dufossé L., Singh S.K., Singh P.N. Fungal pigments and their prospects in different industries // Microorganisms. 2019. V. 7(12). 604. DOI: 10.3390/microorganisms7120604
4. Lyakhovchenko N.S., Abashina T.N., Polivtseva V.N., Senchenkov V.Yu., Pribylov D.A., Chepurina A.A., Nikishin I.A., Avakova A.A., Goyanov M.A., Gubina E.D., Churikova D.A., Sirotin A.A., Suzina N.E., Solyanikova I.P. A blue-purple pigment-producing bacterium isolated from the Vezelka river in the city of Belgorod // Microorganisms. 2021. V. 9(102). P. 1–19. DOI: 10.3390/microorganisms9010102
5. Dufossé L. Pigments, Microbial. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). New-York: Elsevier/Academic Press. 2009. P. 457–471. DOI:10.1016/b978-012373944-5.00155-3
6. Rao M.P.N., Xiao M., Li W.J. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications // Front Microbiol. 2017. V. 8. P. 11–13. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01113
7. Kamel M.M., El-Shishtawy R.M., Yussef B.M., Mashaly H. Ultrasonic assisted dyeing III: Dyeing of wool with lac as a natural dye // Dyes and Pig. 2005. V. 65. P. 103–110. DOI: 10.1016/j.dyepig.2004.06.003
8. Joshi V., Attri D., Baja A., Bhushan S. Microbial Pigments // Indian J Biotechnol. 2003. V. 2(3). P. 362–369.
9. Lee J., Bae D.-Y., Youn J., Ahn W.-T., Hwang H., Bae P.K., Bae I.-D. Violacein-embedded nanofiber filters with antiviral and antibacterial activities // Chem Eng J. 2022. V. 444. P. 1–9. DOI: 10.1016/j.cej.2022.136460
10. Shirata A., Tsukamoto T., Yasui H., Hata T., Hayasaka S., Kojima A., Kato H. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing // Jap Agric Res Q. 2000. V. 34. P. 131–140.
11. Akhmedova F.R.; Jafarova U.D. Studying the distribution of pigment-forming bacteria in various substrates // Actual Probl. Humanit. Nat. Sci. 2012. V. 12. P. 26–29.
12. Cassulo de Araújo H.W., Fukushima K., Takaki G.M.C. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate // Molecules. 2010. V. 15(10). P. 6931–6940. <https://doi.org/10.3390/molecules15106931>
13. Yip C.H., Mahalingam S., Wan K.L., Nathan S. Prodigiosin inhibits bacterial growth and virulence factors as a potential physiological response to interspecies competition // PLoS ONE. 2021. V. 16(6). P. 1–24. DOI: 10.1371/journal.pone.0253445
14. Gillis M., Logan N.A. Genus IV. *Chromobacterium* Bergonzini 1881, 153AL. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd edn. V. 2, part C. New York: Springer; 2005. P. 824–827. DOI: 10.1007/0-387-29298-5_188
15. Гильванова Е.А., Мильман П.Ю. Биосинтез ауксина и каротина PGPR-бактерий *Pantoea* sp. на питательных средах различного состава // Биомика. 2020. Т. 12. № 2. С. 218–222. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-12
16. Bodelón G., Montes-García V., Costas C., Pérez-Juste I., Pérez-Juste J., Pastoriza-Santos I., Liz-Marzán L.M. Imaging bacterial interspecies chemical interactions by surface-enhanced raman scattering // ACS Nano. 2017. V. 11(5). P. 4631–4640. DOI: 10.1021/acsnano.7b00258
17. Rao M.P.N., Xiao M., Li W.J. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications // Front Microbiol. 2017. V. 8. P. 11–13. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01113
18. Nakamura Y., Asada C., Sawada T. Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain // Biotechnol Bioproc E. 2003. V. 8(1). P. 37–40. DOI:10.1007/BF02932896
19. Hansol Im., Choi S.Y., Son S., Mitchell R.J. Combined application of bacterial predation and violacein to kill polymicrobial pathogenic communities // Sci Rep. 2017. V. 7(1). P. 1–10. DOI:10.1038/s41598-017-14567-7
20. Martins D., Costa F.T.M., Brocchi M., Duran N. Evaluation of the antibacterial activity of poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein // J Nanopart Res. 2011. V. 13(1). P. 355–363. DOI:10.1007/S11051-010-0037-9
21. Ibrahim D., Nazari T.F., Kassim J., Lim S.H. Prodigiosin – an antibacterial red pigment produced by *Serratia marcescens* IBRL USM 84 associated with a marine sponge *Xestospongia testudinaria* // J Appl Pharm Sci. 2014. V. 4(10). P. 1–6. DOI:10.7324/japs.2014.40101
22. Starič N., Danevčič T., Stopar D. *Vibrio* sp. DSM 14379 pigment production. A competitive advantage in the environment // Microb Ecol. 2010. V. 60. P. 592–598. DOI: 10.1007/s00248-010-9671-0
23. Suryawanshi R.K., Patil C.D., Koli S.H., Hallsworth J.E., Patil S.V. Antimicrobial activity of prodigiosin is attributable to plasma-membrane damage // Nat Product Res. 2016. V. 31(5). P. 572–577. DOI:10.1080/14786419.2016.1195380
24. Cauz A.C.G., Carretero G.P.B., Saraiva G.K.V., Park P., Mortara L., Cuccovia I.M., Brocchi M., Gueiros-Filho F.J. Violacein targets the cytoplasmic membrane of bacteria // ACS Infect Dis. 2019. V. 5(4). P. 539–549. DOI: 10.1021/acsinfectdis.8b00245
25. Ravindran A., Anishetty S., Pennathur G. Molecular dynamics of the membrane interaction and localisation of prodigiosin // J Mol Graph Model. 2020. V. 98. P. 1–7. DOI: 10.1016/j.jmgm.2020.107614

26. Darshan N., Manonmani H.K. Prodigiosin inhibits motility and activates bacterial cell death revealing molecular biomarkers of programmed cell death // *AMB Express*. 2016. V. 6. P. 1–12. DOI: 10.1186/s13568-016-0222-z

27. Kimyon Ö., Das T., Ibugo A.I., Kutty S.K., Ho K.K., Tebben J., Kumar N., Manefield M. Serratia secondary metabolite prodigiosin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development by producing reactive

oxygen species that damage biological molecules // *Front Microbiol*. 2016. V. 7. P. 1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00972

28. Melvin M.S., Tomlinson J.T., Saluta G.R., Kucera G.L., Lindquist N., Manderville R.A. Double-strand DNA cleavage by copper-prodigiosin // *J Am Chem Soc*. 2000. V. 122(26). P. 6333–6334. DOI: 10.1021/JA0000798



ANTIBACTERIAL EFFECT OF PIGMENTS OF THE GENUS *JANTHINOBACTERIUM*

© P.Yu. Milman, E.A. Gilvanova, L.Yu. Kuzmina, N.F. Galimzianova

Ufa Institute of biology – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,

69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

Microbial pigments are known among natural sources, including melanin, pyocyanin, bacteriochlorophyll, violacein, prodigiosin and carotenoids, which exhibit a variety of biological activity as antioxidants and demonstrate anti-inflammatory, anti-cancer, antiparasitic and antimicrobial properties. Isolation, research and identification of pigment-producing strains are of interest for the development of biotechnological processes aimed at industrial biosynthesis of these compounds. The antibacterial properties of blue-violet (VIO) and red (RED) pigments of new strains of bacteria IB-ST-GO and IB-ST-GOR isolated from natural waters of the Shulgan-Tash cave's vauclose spring (Southern Urals) have been studied. Sequence analysis of the 16S rRNA gene revealed that the producers of IB-ST-GO and IB-ST-GOR pigments belong to representatives of *Janthinobacterium lividum* with a similarity level of 99.72 and 99.86% respectively. The pigments were extracted with 96% ethanol from biomass obtained by cultivating strains on Wakimoto agar medium. According to the results of spectrophotometric analysis, it was found that the VIO pigment belongs to the violacein family, and the RED pigment belongs to the prodigiosin family. The isolated pigments were tested for antibacterial action against 8 types of gram-positive and gram-negative bacteria, inhibitory concentrations of both crude preparations were determined. VIO and RED pigments exhibit an inhibitory effect in the concentration range of 1.0–5.0 mg/ml for a sample of gram-positive bacteria, whereas for gram-negative bacteria, the level of inhibitory concentrations for RED is 10.0–20.0 mg/ml, and for VIO above 20.0 mg/ml. RED pigment exhibits a more dose-dependent effect and a higher selectivity towards gram-positive bacteria than VIO. Together, both pigments are strong inhibitors of the growth of gram-positive bacteria, while the antimicrobial activity of both pigments against gram-negative bacteria is low.

Keywords: bacteria, *Janthinobacterium*, pigment, violacein, prodigiosin, antimicrobial activity.