



ORIGINAL ARTICLE

## Secondary Metabolites Detected in Deep-Water Endemic Amphipods of Lake Baikal: Bacterial or Crustacean Origin?

Protasov E.S.<sup>1</sup>, Axenov-Gribanov D.V.<sup>1,2\*</sup>, Shatilina Z.M.<sup>1,2</sup>,  
Voytsekhovskaya I.V.<sup>1</sup>, Vereshchagina K.P.<sup>1,2</sup>, Lubyaga Y.A.<sup>1,2</sup>,  
Rzhechitskiy Y.A.<sup>1</sup>, Shirokova Y.A.<sup>1</sup>, Timofeyev M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Biology at Irkutsk State University, Irkutsk, 3 Lenin str., Russia

<sup>2</sup> Baikal Research Centre, Irkutsk, 21 Lenin str., Russia

\*E-Mail: [denis.axengri@gmail.com](mailto:denis.axengri@gmail.com)

Received October 29, 2017

The aim of the study was to conduct a dereplication analysis of crude extract of deepwater Baikal's endemic amphipod species *Ommatogammarus albinus*. Detected masses provide some evidence that amphipod's extract might contain both host and microbiota secondary metabolites. Some of the masses correspond with known structures isolated from eubacteria. Also, two compounds did not match with any registered natural products from the database Dictionary of Natural Products. Those findings allow suggesting that Baikal's endemics and their microbiota are promising sources of novel natural products.

*Key words: Amphipods, Baikal, dereplication, natural products, secondary metabolites, Ommatogammarus albinus*

Вторичные метаболиты – это соединения, которые синтезируются организмом, но при этом не играют основополагающей роли в процессах его жизнедеятельности, поскольку они зачастую не участвуют в росте, развитии или репродукции. Особое разнообразие вторичных метаболитов встречается у растений и бактерий, у которых они выполняют защитные, коммуникативные, трофические и иные функции (Patin *et al.*, 2015; Tус *et al.*, 2016). Так же, изучение вторичных метаболитов позволяет выявить закономерности внутри- и межвидовых взаимодействий. Однако, современные технологии по изучению качественного и количественного состава вторичных метаболитов привели к пониманию, что многие из них синтезируются не организмом-хозяином, а его микрофлорой. Один из таких примеров описан для губок видов *Xestospongia muta* и *Callyspongia vaginalis*, в которых обитают сообщества микроорганизмов, выделяющих вторичные метаболиты для защиты своих хозяев (Hentschel *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2010). Другим примером являются взаимодействия между насекомыми и их микрофлорой. При этом микроорганизмы защищают своих хозяев от патогенов или синтезируют для них не поступающие с пищей компоненты – аминокислоты и витамины. Для бабочки *Spodoptera littoralis* было показано наличие симбиоза с бактерией вида *Enterococcus mundtii*, продуцирующей мундтицин (mundticin). Данное соединение защищает гусеницу от патогенных бактерий (Shao *et al.*, 2017). Схожую картину наблюдали у муравьев-листорезов, которые защищают свои грибные фермы с помощью антибиотиков, продуцируемых актинобактериями, растущими на экзоскелете муравьев (Barke *et al.*, 2010; Safaro *et al.*, 2011; Seipke *et al.*, 2011).

Как упоминалось выше, не только микроорганизмы-симбионты являются источником биологически активных соединений. Показано, что сам хозяин тоже способен продуцировать вторичные метаболиты. Так, для креветок видов *Penaeus vannamei* и *Penaeus stylirostris* показано наличие в гемолимфе специфического белка, вырабатываемого в ответ на грибное заражение (Destoumieux-Garzón

*et al.*, 2001). В исследовании Haug с соавторами были изучены четыре различных вида из отряда десятиногих раков, у которых также были обнаружены бактерицидные вещества пептидной природы, выделенные из различных частей тела животных (Haug *et al.*, 2002). Помимо синтеза противомикробных пептидов, для ракообразных была показана способность к синтезу лектинов и меланизация (Cerenius *et al.*, 2010). Таким образом, для установления продуцента конкретных соединений в системе «хозяин-симбионт» необходимо тщательное исследование с привлечением современных методов детекции и анализа.

До настоящего времени пристальное внимание исследователей привлекал синтез вторичных метаболитов растениями и микроорганизмами, тогда как вопросу исследования биологической активности вторичных метаболитов у беспозвоночных посвящены лишь единичные работы. Особый интерес для изучения природных соединений, синтезируемых беспозвоночными организмами, представляет экосистема древнего озера Байкал и ее обитатели. Фауна озера отличается высоким уровнем эндемизма, который является прямым следствием специфических условий экосистемы – низкого уровня минерализации и количества органического вещества в воде, низких средних температур в пелагиали озера и высокого уровня растворенного кислорода по всей толще воды (Rusinek *et al.*, 2012). Одной из наиболее распространенных в озере групп беспозвоночных животных является отряд Amphipoda, который насчитывает 276 видов и 78 подвидов (Takhteev *et al.*, 2015). Несмотря на то, что амфиподы озера Байкал хорошо изучены с точки зрения таксономии, физиологии, биохимии и молекулярной биологии, их симбиотические взаимоотношения остаются малоизученными. В связи с этим, целью настоящего исследования являлась оценка состава вторичных метаболитов в экстрактах байкальских эндемичных глубоководных амфипод вида *Ommatogammarus albinus* с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией высокого разрешения.

## MATERIALS AND METHODS

Объектом исследования были выбраны байкальские эндемичные глубоководные амфиподы вида *O. albinus* (Dybowsky, 1874), которые были собраны с помощью глубоководных ловушек с глубины 80 м в районе пос. Большие Коты (Южный Байкал, март 2015 г.).

Амфипод гомогенизировали в смеси вода:этилацетат (1:1) в течение 1 часа. Верхнюю фракцию отбирали и концентрировали при использовании газового концентратора. Сухое вещество растворяли в метаноле. Полученный экстракт анализировали с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе Ultimate 3000 (Dionex), сопряженном с масс-спектрометром высокого разрешения LTQ Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). Программа, по которой проводили разделение: растворители - вода: ацетонитрил. К растворителям добавляли 0,1% муравьиную кислоту. Для разделения применяли линейный градиент растворителей от 5% до 95% в течение 18 минут на колонке ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm. Детекцию масс в диапазоне 160-2500 Да проводили в условиях положительной ионизации. Поиск и идентификацию соединений в диапазоне анализируемых масс M~0,02 Да проводили с применением базы данных Dictionary of Natural Products (CRC-press). Для идентификации соединений в качестве источника выделения природных метаболитов указывали источник «членистоногие» и/или «микроорганизмы». Анализ каждого образца проведен трехкратно.

## RESULTS AND DISCUSSION

Хроматограмма масс (соединений), обнаруженных в экстракте амфипод вида *O. albinus* представлена на рис. 1.

В ходе проведенного анализа в экстракте амфипод вида *O. albinus* было обнаружено 22 мажорных пика (Табл. 1) с массой, не превышающей 2500 Да. Два пика (с молекулярными массами – 214.15622 Да и 255.25544 Да) соответствуют трем соединениям, выделенным ранее из членистоногих. Однако данные соединения ранее были обнаружены

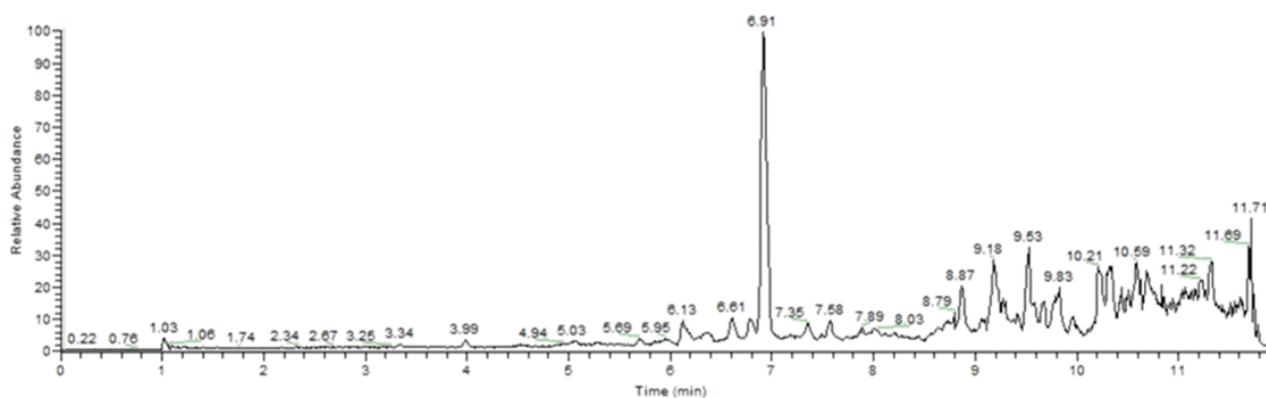
не в ракообразных, а в насекомых (два у *Idea leucopoe* и одно у *Mesoponera sp.*) Кроме того, соединение с массой 214.15622 Да имеет массу, схожую с пятью соединениями, ранее выделенными из эубактерий. При этом, три из них выделены из актинобактерий – активных продуцентов вторичных метаболитов. В ходе проведенного анализа установлено, что пять соединений (пиков) могут быть схожи с соединениями, выделенными ранее из эубактерий. Два соединения (пика) с массами 348.19046 Да и 1486.2129 Да, обнаруженные в экстракте глубоководных амфипод вида *O. albinus*, не выявили соответствия с массами природных соединений, зарегистрированными в крупнейшей базе данных Dictionary of Natural Products (CRC press), объединяющей сведения по 250 тысячам природных соединений.

Беспозвоночные являются источником большого числа биологически активных веществ. Особое многообразие данных соединений встречается среди морских губок, моллюсков, оболочников, иглокожих и кораллов (Blunt et al., 2017; Soldatou and Baker, 2017). Основная роль, которую вторичные метаболиты играют в жизни беспозвоночных, по-видимому, защитная (Otero-Gonzalez et al., 2010). Например, для двух видов полихет и 32 видов моллюсков было показано, что выделяемые ими биологически активные вещества служат для защиты кладок яиц от патогенных микроорганизмов (Benkendorff et al., 2001). Однако для ракообразных видов *Palaemon macrodactylus* и *Homarus americanus* было показано, что за защиту яиц у них отвечают эпibiонтные бактерии, вырабатывающие низкомолекулярные вещества с антибиотическими свойствами (Gil-Turnes et al., 1989; Gil-Turnes and Fenical, 1992).

Следует отметить, что исследований пресноводных беспозвоночных, в частности ракообразных, направленных на изучение синтезируемых ими биологически активных веществ, проводится значительно меньше. В базе данных Dictionary of Natural Products на настоящий момент зарегистрировано только 178 соединений, выделенных из ракообразных. И только одно из них (Эхиненон - Echinone, 3',4'-Дегидро-β,β-каротин-4-

ол. 3',4'-Дегидро-4-гидрокси-β-каротин (ММ 550,866 Да)) выделено из байкальских эндемичных амфипод вида *Pallasea cancelloides*. Несмотря на то, что присутствует высокая вероятность того, что вторичные метаболиты, найденные в амфиподах, изначально синтезируются симбиотическими бактериями или поступают в организм животных с пищей, часть из этих соединений может являться продуктом синтеза самих амфипод. В то же время, как сама природа вторичных метаболитов, так и роль этих метаболитов в жизнедеятельности организмов,

требует дополнительных исследований. Дальнейшее изучение состава вторичных метаболитов, продуцируемых амфиподами и ассоциированной с ними микрофлорой, позволит лучше понять природу взаимодействия этих двух групп в системе «хозяин-микробиота», а предполагаемые соединения с новыми массами указывают на то, что байкальские эндемичные амфиподы и ассоциированная с ними микрофлора представляют особый интерес для открытия новых биологически активных соединений.



**Figure 1.** Хроматограмма масс, обнаруженных в экстракте амфипод вида *O. albinus*

**Table 1.** Основные соединения, обнаруженные в экстракте амфипод вида *O. albinus*

N	Время удержания (мин)	Аддукты	Масса, Да	Число возможных соединений	Из них число соединений из зубактерий (с указанием конкретных продуцентов и продуцируемого вещества)	Число возможных соединений, выделенных из членистоногих
1	5.05	[M+NH <sub>4</sub> ]	223.1561	14	0	0
2	5.72	[M+Na]	214.15622	48	5 <i>Lactobacillus plantarum</i> (3-hydroxy-5dodecenoic acid, CRC - QMF83-X) <i>Serratia marcescens</i> (3-hydroxy-5dodecenoic acid, CRC - CQS87-V) <i>Streptomyces antibioticus</i> (dihydro-4-hydroxy-5-methyl-3-(5-methylhexyl)-2(3H)-furanone, CRC - BOV27-Q) <i>Streptomyces</i> sp. (11,12,13-Trinor-2,5,9-eudesmanetriol, CRC - OZH13-D) <i>Streptomyces</i> sp. (Streptoketol B, CRC - JYG29-X)	2 Бабочка <i>Idea leuconoe</i> (Dihydro-5-(2-hydroxyoctyl)-2(3H)-furanone, CRC = MWY53-F) Tetrahydro-6-(2-hydroxyheptyl)-2H-pyran-2-one, CRC - RHM73-F)
3	5.95	[M+Na]	224.18814	10	0	0
4	6.6	[M+NH <sub>4</sub> ], [M+Na]	302.22394	699	0	0

N	Время удержания (мин)	Аддукты	Масса, Да	Число возможных соединений	Из них число соединений из эубактерий (с указанием конкретных продуцентов и продуцируемого вещества)	Число возможных соединений, выделенных из членистоногих
5	6.91	[M+NH <sub>4</sub> ], [M+Na]	414.2035	86	0	0
6	7.35	[M+NH <sub>4</sub> ]	331.25849	68	1 <i>Streptomyces</i> sp. (9(11), 15-Pimaradien-3-ol, CRC - PKS23-T)	0
7	7.58	[M+NH <sub>4</sub> ], [M+Na]	388.25803	9	0	0
<b>8</b>	<b>8.86</b>	<b>[M+Na]</b>	<b>348.19046</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
9	9.07	[M+Na]	402.27628	116	1 <i>Streptomyces roseoviridis</i> (Enactin Ib, CRS = LHR41-F)	0
10	9.2	[M+Na]	368.34339	1	0	0
11	9.27	[M+Na]	334.14301	98	3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus vulgaris</i> (5,7-Diamino-4,6,8-trihydroxy-2-oxononaic acid, CRS -NXC26-L)  <i>Streptomyces nashvillensis</i> (Tetrodecyanicin, CRS - NHL59-I)  <i>Serratia marcescens</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i> (4-Methoxy-5[(3-methoxy-5-pyrrol-2-yl-2H-pyrrol-2ylidene)methyl]-2,2'-bypyrrole, CRC - CLS30-B)	0
12	9.51	[M+Na]	328.23938	58	0	0
13	9.66	[M+Na]	404.29087	63	0	0
14	9.83	[M+NH <sub>4</sub> ]	313.26911	27	0	0
15	9.97	[M+Na]	338.2811	27	0	0
16	10.22	[M+Na]	608.44333	6	0	0
17	10.33	[M+Na]	284.29013	1	0	0
18	10.58	[M+Na]	255.25544	10	0	1 Муравьи померины <i>Mesoponera</i> sp. (N-Acetyl-N-isoamyl-1-nonylamine, CRC - RHO41-E)
19	10.7	[M+Na]	634.45823	10	0	0
<b>20</b>	<b>11.03</b>	<b>[M+Na]</b>	<b>1486.2129</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
21	11.23	[M+Na]	660.47312	3	0	0
22	11.32	[M+Na]	638.48935	80	1 <i>Flavobacterium</i> sp. (Antibiotic WB3559A, CRC = CLH83-C)	0

## ACKNOWLEDGEMENT

Работа выполнена в рамках Госзадания № 6.9654.2017/8.9, а также при частичной финансовой поддержке проектов РФФИ № 16-34-00686, 16-34-60060, РНФ № 17-14-01063 и ФГБОУ ВО «ИГУ».

## REFERENCES

Barke J., Seipke R., Grünschow S., Heavens D., Drou N., Bibb M., Goss R., Douglas W., Hutchings M. (2010) A mixed community of actinomycetes produce multiple antibiotics for the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *BMC Biology*, **8(1)**, 109.

- Benkendorff K., Davis AR., Bremner J. (2001) Chemical Defense in the Egg Masses of Benthic Invertebrates: An Assessment of Antibacterial Activity in 39 Mollusks and 4 Polychaetes. *J Invertebr Pathol*, **78**, 109–118.
- Blunt J. W., Copp B. R., Keyzers R. A., Munro M. H., Prinsep M. R. (2017) Marine natural products. *Nat Prod Rep*, **34**, 235–294.
- Cafaro M.J., Poulsen M., Little A.E., Price S.L., Gerardo N.M., Wong B., Stuart A.E., Larget B., Abbot P., Currie C.R. (2011) Specificity in the symbiotic association between fungus-growing ants and protective *Pseudonocardia* bacteria. *Proc Biol Sci*, **278(1713)**, 1814–22.
- Cerenius L., Jiravanichpaisal P., Liu H., Söderhäll I. (2010) Crustacean immunity. In: *Invertebrate Immunity*. Springer US, 239–259.
- Destoumieux-Garzón D., Saulnier D., Garnier J., Jouffrey C., Bulet P., Bachère E. (2001) Crustacean immunity: Antifungal peptides are generated from the C terminus of shrimp hemocyanin in response to microbial challenge. *J Biol Chem*, **276(50)**, 47070–47077.
- Gil-Turnes M., Fenical W. (1992) Embryos of *Homarus Americanus* Are Protected by Epibiotic Bacteria. *Biol Bull*, **182**, 105–108.
- Gil-Turnes M., Hay M., Fenical W. (1989) Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science*, **246(4926)**, 116–118.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Stensvåg, K., Sandsdalen, E. and Styrvold, O.B. (2002) Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish Shellfish Immunol*, **12(5)**, 371–385.
- Hentschel U., Usher K., Taylor M. (2006) Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol* **55(2)**, 167–177.
- Otero-González, A.J., Magalhães, B.S., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D.A., Dias, S.C., Franco, O.L. (2010) Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *FASEB J* **24(5)**, 1320–1334.
- Patin N., Duncan K., Dorrestein P., Jensen P. (2015) Competitive strategies differentiate closely related species of marine actinobacteria. *ISME J* **10(2)**, 478–490.
- Seipke, R.F., Barke, J., Brearley, C., Hill, L., Douglas, W.Y., Goss, R.J., Hutchings, M.I. (2011) A single *Streptomyces* symbiont makes multiple antifungals to support the fungus farming ant *Acromyrmex octospinosus*. *PLoS One* **6(8)**, e22028.
- Shao, Y., Chen, B., Sun, C., Ishida, K., Hertweck, C., Boland, W. (2017) Symbiont-Derived Antimicrobials Contribute to the Control of the Lepidopteran Gut Microbiota. *Cell Chem Biol* **24(1)**, 66–75.
- Soldatou S, Baker BJ. (2017) Cold-water marine natural products, 2006 to 2016. *Nat Prod Rep*.
- Takhteev V., Berezina N., Sidorov D. (2015) Checklist of the Amphipoda ( Crustacea ) from continental waters of Russia , with data on alien species. *Arthropoda Sel* **24(3)**, 335–370.
- Taylor M., Radax R., Steger D., Wagner M. (2007) Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol Mol Biol Rev* **71(2)**, 295–347.
- Thomas T., Kavlekar D., LokaBharathi P. (2010) Marine drugs from sponge-microbe association - A review. *Mar. Drugs* **8(4)**, 1417–1468.
- Тыс О., Song C., Dickschat J.S., Vos M., Garbeva P. (2016) The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends Microbiol* **25(4)**, 280–292.
- Русинек О.Т., Тахтеев В.В., Ходжер Т.В., Плешанов А.С., Воронин В.И., Аров И.В., Азовский М.Г., Горюнова О.И., Дрюккер В.В., Задонина Н.В., Зилов Е.А., 2012. Байкаловедение. Новосибирск : Наука, 2012, 467 с.
- Тахтеев В. (2000) Очерки о бокоплавах озера Байкал (систематика, сравнительная экология, эволюция). Изд-во Иркутского государственного университета, Иркутск, 355 с.