

УДК 579.841.11:597.2

Е.Г. ВЕРЕМЕЕНКО, М.Н. ФЕДОРОВИЧ, И.Н. ФЕКЛИСТОВА, Н.П. МАКСИМОВА

### **ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТОВ *PSEUDOMONAS AURANTIACA* – ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ ФЕНАЗИНОВОГО РЯДА**

Regulatory mutants of *Pseudomonas aurantiaca* capable of phenazine super production were created with the help of NG-mutagenesis followed by selection on toxic analogues of aromatic amino acids. It was shown that mutant strains have a higher level of N-hexanoilhomoserinelactone production. Most of all it was proved that studied mutants possess a higher level of synthesis of ДАНР-synthetase, which was less sensitive to inhibitory action of tyrosine and phenylalanine. It was also shown that antimicrobial properties correlated with the level of phenazine production.

Природные феназиновые антибиотики представляют собой азотсодержащие ароматические соединения, продуцируемые бактериями различных родов и видов [1]. Данные соединения являются высокоактивными в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также целого ряда грибов [2]. Такой широкий спектр действия феназиновых антибиотиков объясняется механизмом их действия: феназины легко проникают внутрь клетки и вступают там в окислительно-

восстановительные реакции, присоединяя электроны и превращаясь в относительно стабильные анионы. В результате нарушения нормального транспорта электронов блокируется клеточное дыхание, индуцируется накопление в клетках токсичных супероксид-радикалов и перекиси водорода, что приводит в конечном итоге к гибели чувствительных к феназинам организмов [3].

Ранее на основе ризосферных бактерий *P. aurantiaca* КМБУ В-162 был получен штамм-продуцент феназиновых антибиотиков (мутант В-162/498), уровень продукции которых достигал 205 мг/л, что примерно в три раза больше, чем у бактерий дикого типа [4]. Масс-спектроскопический анализ феназинового комплекса этих бактерий показал, что в его состав входит феназин, 1-оксифеназин и их общий предшественник феназин-1,6-дикарбоксилат [4]. Целью настоящей работы являлось получение регуляторных мутантов *P. aurantiaca* В-162, обладающих более высоким уровнем продукции феназинов, и их характеристика.

### Материал и методика

В работе использовали штамм *P. aurantiaca* В-162, полученный из коллекции кафедры генетики БГУ (коллекционный номер КМБУ В-162).

Культивирование бактерий осуществляли в жидкой и агаризованной питательной среде, а для изучения продукции феназинов – в среде специального состава [5]. Химический мутагенез производили с помощью N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина по методике, описанной в [6]. Регуляторных мутантов отбирали по устойчивости к токсическим аналогам ароматических соединений и способности к сверхсинтезу антибиотиков феназинового ряда. Выявление феназинов проводили по известной методике [5]; их концентрацию в культуральной жидкости измеряли спектрофотометрически (спектрофотометр Cary 50 Scan) при длине волны 369 нм с последующим определением концентрации по калибровочной кривой. Анализ активности ДАГФ-синтазы осуществляли по методике, предложенной в [7]. Измерение уровня продукции гомосеринлактонов производили известным методом [8]. Антифунгальную и антимикробную активности бактерий *P. aurantiaca* В-162 определяли по методике, описанной в [9].

### Результаты и их обсуждение

Путь синтеза феназиновых антибиотиков представлен на рис. 1. Основным предшественником феназиновых соединений является хоризмат, синтез которого осуществляется по общему участку ароматического пути, берущему начало от реакции конденсации эритрозо-4-фосфата и фосфоенолпирувата, катализируемой 3-дезоксид-арабиногептулозонат-7-фосфат-синтазой (ДАГФ-синтазой). Из хоризмата в серии последовательных реакций, контролируемых генами Phz-оперона, образуются различные производные феназинов (сегодня их известно 8). Общий участок ароматического пути у бактерий регулируется на уровне ключевого фермента – ДАГФ-синтазы посредством репрессии и (или) ретроингибирования ароматическими аминокислотами.

Отбор регуляторных мутантов – продуцентов феназиновых антибиотиков – проводили по устойчивости к токсическим аналогам метаболитов ароматического пути. Предполагалось, что их использование даст возможность осуществить селекцию мутантов с дерегуляцией ДАГФ-синтазы, а следовательно, способных к повышенной продукции ароматических соединений, в том числе и феназиновых антибиотиков.

В серии предварительных экспериментов была определена чувствительность бактерий *P. aurantiaca* В-162 к следующим токсическим аналогам: р- и

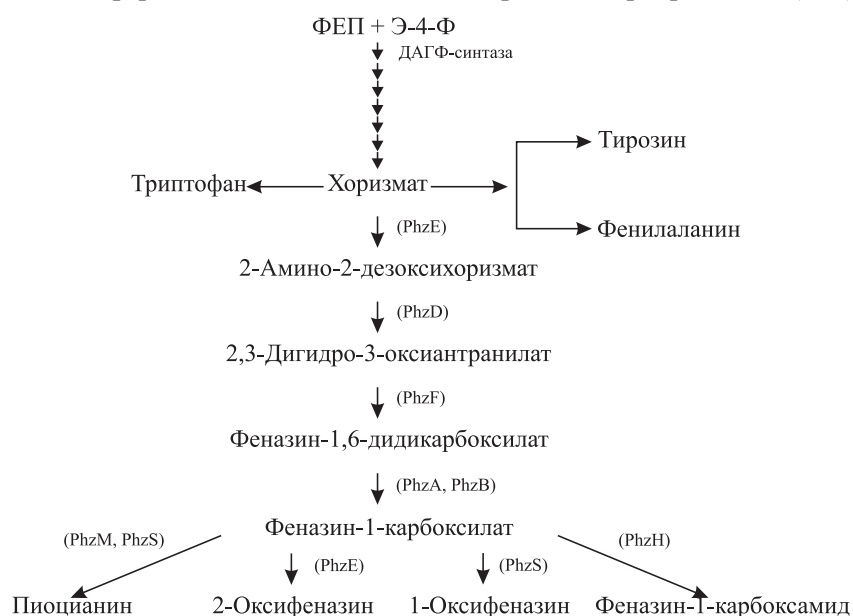


Рис. 1. Схема синтеза феназиновых соединений. ФЭП – фосфоенолпируват, Э-4-Ф – эритрозо-4-фосфат. В скобках приведены названия генов Phz-оперона, продукты которых контролирует соответствующий этап пути синтеза феназинов

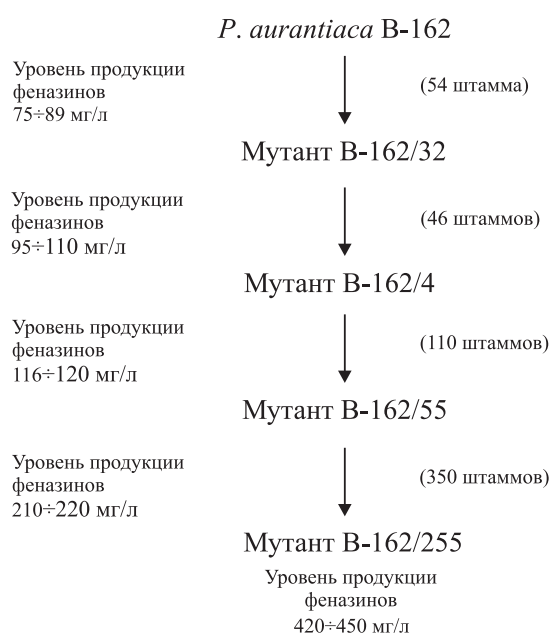


Рис. 2. Схема селекции штаммов-продуцентов феназиновых антибиотиков. В скобках приведено число проанализированных аналогоустойчивых штаммов. Для последующих этапов селекции отбирали наиболее продуктивный вариант

На следующем этапе работы у полученных мутантов анализировали уровень синтеза ключевого фермента ароматического пути – ДАГФ-синтазы и чувствительность его к ингибирующему действию ароматических аминокислот тирозина и фенилаланина. Ранее было показано, что синтез ДАГФ-синтазы у бактерий *P. aurantiaca* B-162 происходит конститутивно, а активность фермента подвержена ретроингибированию фенилаланином и тирозином и, кроме того, неконкурентному ингибированию феназином [3]. Из приведенных в табл. 1 результатов видно, что у мутантов, способных к сверхпродукции феназинов (штаммы B-162/55 и B-162/255), удельная активность ДАГФ-синтазы выше в 1,46 и 1,7 раза соответственно. Кроме того, зарегистрировано снижение чувствительности фермента к ингибирующему действию тирозина (примерно на 18,34 % для штамма B-162/55 и на 54,81 % для B-162/255), а также фенилаланина (на 5,53 и 11,79 % соответственно). Повышение уровня синтеза фермента и его частичная десенсибилизация к действию тирозина и фенилаланина свидетельствуют о том, что сверхсинтез феназиновых соединений у изучаемых мутантов связан с дерегуляцией ДАГФ-синтазы и, следовательно, общего участка ароматического пути, что обеспечивает увеличение уровня синтеза хоризмата – ключевого предшественника феназиновых соединений.

Таблица 1

Сравнительная характеристика показателей активности ДАГФ-синтазы у *P. aurantiaca* B-162 дикого типа и аналого-резистентных мутантов

Штаммы <i>P. aurantiaca</i>	Удельная активность, нмоль/мин · мг белка	Ингибирование активности, %	
		тирозином	фенилаланином
B-162 (дикий тип)	13,368 ± 0,119	72,03	78,21
B-162/55	19,568 ± 0,375	66,5	59,87
B-162/255	22,952 ± 0,509	60,24	23,4

Примечание. Ингибиторы использовали в концентрации 1 ммоль/л. Активность фермента рассчитывали как отношение ОП пробы с ингибитором к ОП контроля, выраженное в процентах.

Следует отметить, что описанный регуляторный механизм не является единственным в биосинтезе феназинов. Известно, что продукция данных соединений находится под контролем ряда систем общей клеточной регуляции, главная роль среди которых принадлежит двухкомпонентной регуляторной GacS/GacA-системе, которая осуществляет как положительный, так и отрицательный контроль экспрессии генов феназинового оперона. Одним из важнейших механизмов положительного контроля синтеза феназинов является регуляция посредством GacS/GacA-зависимой QS системы [12], в основе которой лежит увеличение уровня транскрипции генов Phz-оперона в ответ на накопление в среде при высокой плотности культуры сигнальных молекул, обеспечивающих межклеточные ком-

*m*-фторфенилаланину, 5-фтортриптофану, 5-окситриптофану, 5-метилтриптофану, 2-фторфенилаланину, *m*-фтортирозины, α-метил-DL-фенилаланину, 1-метилтриптофану, азасерину и норлейцину. Те из них, к которым данные бактерии оказались чувствительными, были использованы для селекции мутантов. В результате нескольких серий последовательных мутагенезов и отбора мутантов на устойчивость к соответствующим аналогам были получены мутантные штаммы *P. aurantiaca* B-162/55 и B-162/255 (рис. 2), продукция феназинов у которых достигала 210÷220 и 420÷450 мг/л соответственно.

Уровень синтеза феназинов у наиболее активного продуцента B-162/255 оказался примерно в 2 раза выше, чем у ранее описанного мутанта B-162/498 [4], в 5,6 раза выше, чем у исходного штамма, и почти в 17 раз выше, чем у известных штаммов *P. fluorescens* и *P. chlororaphis* [10, 11].

муникации. Роль сигнальных молекул у бактерий *P. aurantiaca* В-162 выполняют N-гексаноилгомосерин лактоны [4]. В связи с этим представлялось интересным исследовать у полученных регуляторных мутантов уровень образования данных молекул. В результате анализа этого показателя у мутантных штаммов В-162/55 и В-162/255 выявлено, что продукция N-гексаноилгомосерин лактона по сравнению с контролем (штамм В-162) возросла в 2,1 и 2,3 раза соответственно. Следовательно, увеличение выхода феназиновых соединений у мутантов по сравнению с бактериями дикого типа может быть обусловлено также повышением продукции сигнальных молекул и дерегуляцией системы общего контроля клеточного метаболизма.

В связи с этим важно отметить, что помимо положительного контроля известна также и отрицательная регуляция синтеза феназинов, находящаяся под контролем глобальной регуляторной GacS/GacA-системы [13]. В настоящее время известны несколько негативных регуляторов синтеза феназинов – продукты генов *psrA* и *greA*, обнаруженные у бактерий *P. aureofaciens* [14, 15], а также продукт гена *mvaT*, подавляющий синтез пиоцианина у бактерий *P. aeruginosa* [16]. Было сделано предположение, что сверхсинтез феназинов у полученных мутантов связан со снятием негативного контроля на уровне одного из указанных регуляторных генов. Как ранее было показано [15], инактивация гена *greA* помимо сверхсинтеза феназиновых антибиотиков у *P. aureofaciens* 30-84 в специальной среде (см. [5]) и LB-бульоне приводит к способности синтезировать феназины и в минимальной среде М9 [15] (в норме бактерии дикого типа не обладают такой способностью). Проведенный нами анализ синтеза феназинов при выращивании бактерий в минимальной среде показал отсутствие этого признака у полученных штаммов. Кроме того, известно, что у мутантов по гену *greA* сверхсинтез феназинов не коррелирует с возрастанием уровня синтеза N-гексаноилгомосерин лактонов [15], тогда как у исследуемых нами штаммов В-162/55 и В-162/255 синтез сигнальных молекул по сравнению с контролем повысился в 2,1 и 2,3 раза соответственно. Указанные факты свидетельствуют о том, что ген *greA* у полученных мутантов не нарушен. Следовательно, наиболее вероятной причиной сверхсинтеза феназинов у мутантов может быть мутация в гене *psrA* или *mvaT*.

Повышение уровня синтеза феназиновых антибиотиков у мутантных штаммов должно коррелировать с увеличением их антимикробной активности. В связи с этим следующий этап работы заключался в сравнении бактерий дикого типа *P. aurantiaca* В-162 и мутанта В-162/255 по способности подавлять развитие мицелия и спор ряда фитопатогенных грибов. Полученные результаты приведены на рис. 3 и в табл. 2.

Таблица 2

#### Влияние бактерий *P. aurantiaca* В-162 и мутанта В-162/255 на прорастание спор фитопатогенных грибов

Микроорганизм	Прорастание спор, %			
	в воде	в среде (ПСА)	супернатант бактерий В-162	супернатант бактерий В-162/255
<i>Alternaria brassicae</i>	90	93	0	0
<i>Alternaria brassicicola</i>	99	100	0	0
<i>Alternaria panax</i>	100	100	0	0
<i>Alternaria alternata</i>	100	100	5	0
<i>Alternaria infectoria</i>	100	100	6	1
<i>Alternaria capsici</i>	100	100	33	5
<i>Alternaria tenuissima</i>	97	100	12	12
<i>Alternaria dauci</i>	100	100	34	33

Примечание. Измерения проводились в трех полях зрения. Пропись среды ПСА приведена в работе [5]. Супернатант получен путем осаждения клеток из культуральной жидкости штаммов В-162 и В-162/255.

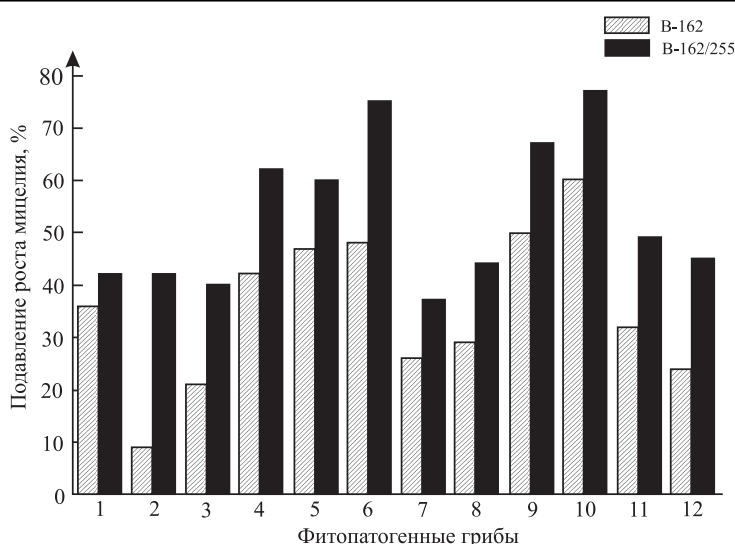


Рис. 3. Сравнительная характеристика антифунгальной активности бактерий *P. aurantiaca* В-162 и В-162/255. 1 – *Ascochyta* sp., 2 – *F. avenaceum* 6(9), 3 – *F. avenaceum* 04-7, 4 – *F. oxysporum* 6(14), 5 – *F. culmorum* 1(8), 6 – *F. culmorum* 005, 7 – *F. culmorum* 1(17), 8 – *F. oxysporum* 6(12), 9 – *A. tenuissima*, 10 – *A. alternata*, 11 – *A. infectoria*, 12 – *A. brassicicola*

Из рис. 3 видно, что оба штамма обладают способностью подавлять развитие мицелия всех исследованных фитопатогенных грибов, причем антифунгальные свойства штамма В-162/255, обладающего повышенным уровнем синтеза феназинов, выражены в большей степени, чем в контроле.

Кроме того, была проанализирована способность изучаемых бактерий подавлять прорастание спор фитопатогенных грибов рода *Alternaria* (8 видов). Для трех штаммов грибов (*A. brassicae*, *A. brassicicola* и *A. panax*) изучить корреляцию между антифунгальной активностью и уровнем продукции феназинов оказалось невозможно из-за их высокой чувствительности не только к метаболитам штамма В-162/255, но и бактерий дикого типа. Вместе с тем по отношению к трем штаммам рода *Alternaria* (*A. infectoria*, *A. alternata* и *A. capsici*) прослеживалась четкая зависимость между уровнем синтеза феназиновых антибиотиков и антифунгальной активностью мутантных бактерий. Особенно показательной является реакция спор гриба *A. capsici* на метаболиты мутантного штамма В-162/255.

Следует отметить, что споры двух штаммов фитопатогенных грибов *A. tenuissima* и *A. dauci* проявили низкую чувствительность к действию феназиновых антибиотиков, что может быть объяснено особенностями строения оболочек спор данных фитопатогенов или спецификой их метаболизма (возможно, повышенным уровнем каталазы).

Анализируя данные, представленные на рис. 3 и в табл. 2, можно сделать вывод, что мутантный штамм В-162/255 обладает по сравнению с бактериями дикого типа более выраженными антифунгальными свойствами как в отношении вегетативных форм фитопатогенных грибов, так и в отношении спор, причем антифунгальная активность коррелирует с уровнем продукции феназиновых соединений.

Кроме того, были проведены эксперименты по изучению антибактериальной активности бактерий *P. aurantiaca* В-162 и мутанта В-162/255, в результате чего установлено, что к *P. glycinea* 8541, *X. rubilans*, *E. carotovora* D261, *P. lachrymans* 7595 и *E. aroideae* 3481 изучаемые бактерии также проявляли антибактериальную активность, которая коррелировала с уровнем синтеза феназиновых соединений.

Таким образом, в результате нескольких серий последовательных мутагенезов были получены штаммы *P. aurantiaca* В-162/55 и В-162/255, продукция феназиновых антибиотиков у которых достигала 210÷220 и 420÷450 мг/л соответственно. Уровень синтеза феназинов у мутантных бактерий коррелирует с увеличением уровня синтеза гомосеринлактонов, частичной дерегуляцией ключевого фермента ароматического пути – ДАГФ-синтазы, а также возрастанием антифунгальной и антибактериальной активностей.

1. Delaney S. M., Mavrodi D. V., Bonsall R. F. et al. // J. Bacteriol. 2001. Vol. 183. № 1. P. 318.
2. Соколов М. С., Литвишко Е. В. // Защита растений. 1993. № 10. С. 11.
3. Ермолаева Н. И., Иванова Н. И., Скворцова Н. П. et al. // Там же. 1992. № 8. С. 24.
4. Феклистова И. Н. Синтез антибиотиков ароматической природы у бактерий *Pseudomonas aurantiaca* В-162: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. Мн., 2006.
5. Levitch M. E., Stadtman E. R. // Arch. Biochem. Biophys. 1964. Vol. 106. P. 194.
6. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
7. Jensen R. A., Nester E. W. // J. Biol. Chem. 1966. Vol. 241. № 14. P. 3365.
8. McClean K. H., Winson M., Fish L. et al. // Microbiol. 1997. Vol. 143. № 12. P. 3703.
9. Феклистова И. Н., Максимова Н. П. // Земляробства і ахова раслін. 2006. № 2. С. 442.
10. Levitch M. E. // J. Bacteriol. 1970. Vol. 103. № 1. P. 16.
11. Ge Y., Huang X., Wang S. et al. // FEMS Microbiol. Lett. 2004. Vol. 237. № 1. P. 41.
12. Pierson L. S., Keppenne V. D., Wood D. W. // J. Bacteriol. 1994. Vol. 176. № 13. P. 3966.
13. Laville J., Voisard C., Keel C. et al. // Prac. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 1562.
14. Thomas F. C., Chin-A- Woeng, Daan van den Broek et al. // Mol. Plant. Inter. 2005. Vol. 18. № 3. P. 244.
15. Cheryl A. Whistler, Lenard S. Pierson III. // J. of Bacteriol. 2003. Vol. 185. № 13. P. 3718.
16. Diggle S. P., Winzer K., Landuski A. et al. // Ibid. 2002. Vol. 184. № 10. P. 2578.

Поступила в редакцию 15.05.08.

**Екатерина Геннадьевна Веремеенко** – аспирант кафедры генетики. Научный руководитель – Н.П. Максимова.

**Мария Николаевна Федорович** – ассистент кафедры ботаники.

**Ирина Николаевна Феклистова** – кандидат биологических наук, научный сотрудник НИЛ молекулярной генетики бактерий БГУ.

**Наталья Павловна Максимова** – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой генетики.