

## СОЗДАНИЕ ШТАММОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ФЕАЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ, ЭФФЕКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ ПАТОГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА

Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь  
e-mail: veremeenkoKatya@yandex.ru

### Введение

В последние годы феназиновые антибиотики приобретают все большее значение не только как биопестицидные препараты, но находят применение и в медицине. Предпринимаются попытки разработать на их основе активные и высоко специализированные антираковые препараты, успешно проходят испытания гипотензивные и антималярийные средства [1]. Вместе с тем, потенциал феназинов для медицины не ограничивается лишь этим. Практически не исследовано их действие на патогенные для человека грибы и бактерии, что может иметь практическую ценность, учитывая чрезвычайно высокую антимикробную активность данных соединений.

Особенно актуальным это является на фоне значительного роста заболеваний микозами и бактериальными инфекциями среди населения, что в немалой степени обусловлено повсеместным применением в медицинской практике антибиотиков широкого спектра действия, иммунодепрессантов и других групп лекарственных средств, подавляющих активность иммунной системы. Настоящей проблемой стали микозы (в первую очередь, тяжелые висцеральные микозы) для людей, страдающих ВИЧ-инфекцией, для пациентов, проходящих курс реабилитации после химеотерапии онкогематологических заболеваний, а также для лиц, которым была осуществлена трансплантация органов или тканей [2]. Основную роль в терапии как микозов, так и ряда бактериальных инфекций играют достаточно токсичные синтетические препараты, интенсивное применение которых приводит к побочным эффектам, а также возникновению резистентных к данным препаратам форм патогенных бактерий и грибов [3]. В связи с этим возрастает потребность в разработке новых эффективных и безопасных антибиотических средств, и феназиновые антибиотики потенциально могли бы стать эффективной и недорогой альтернативой имеющимся лекарственным средствам. Это во многом будет обусловлено не только спектром их антимикробной активности, но легкостью получения феназинов, что напрямую зависит от наличия высоко активных штаммов-продуцентов.

Целью данной работы являлось получение штаммов *P. aurantiaca*, обладающих высоким уровнем продукции феназиновых антибиотиков и исследование их антимикробной активности в отношении патогенов человека.

### Методы исследований

Объектом исследований являлся штамм *P. aurantiaca* В-162 и ранее полученный на его основе мутантный штамм В-162/255 [4]. В работе использовали условно патогенные штаммы бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae ozaenae*, *Pseudomonas aeruginosa*), и грибов (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*), полученных из коллекции культур микроорганизмов УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Культивирование бактерий *P. aurantiaca* в зависимости от целей эксперимента осуществляли в жидких и на агаризованных полноценных питательных средах (ПСА [5], Сабуро [6] и мясо-пептонный агар) при температуре 28°C. Культивирование условно патогенных штаммов грибов и бактерий проводили на среде Сабуро при 37°C.

Химический мутагенез производили с помощью *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидина (НГ) по методике, описанной ранее [7]. В качестве селективирующего фактора для отбора мутантов с высоким уровнем выхода феназинов использовали пероксид водорода в концентрации 19,5 мМ и 39 мМ. Идентификацию феназинов проводили по

известной методике [5], их концентрацию в культуральной жидкости измеряли спектрофотометрически при длине волны 369 нм с последующим определением концентрации феназинов по калибровочной кривой. Феназиновый комплекс в препаративной форме получали путем высушивания хлороформной фракции в вакуумном роторном испарителе. В экспериментах по определению антимикробной активности препаративного феназинового комплекса использовали его растворы в ДМСО. Кроме того, аналогичные концентрации ДМСО использовали в качестве дополнительного контроля, чтобы продемонстрировать отсутствие ингибирующего эффекта растворителя на рост условных патогенов. Антимикробную активность штаммов *P. aurantiaca* определяли согласно методике, описанной в работе [8].

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы осуществляли получение мутантных штаммов *P. aurantiaca*, способных к сверхпродукции феназинов, с помощью НГ-мутагенеза и дальнейшей селекции на устойчивость к пероксиду водорода. Выбор этого селективирующего фактора был обусловлен выдвинутым нами предположением, что мутанты, способные выдерживать высокие концентрации пероксида водорода должны обладать и повышенным уровнем продукции феназинов, поскольку их метаболизм будет адаптирован к высоким концентрациям антибиотика, имеющего, как показано нами ранее [9], сходный с  $H_2O_2$  механизм действия. Ранее было показано, что пероксид водорода является одной из основных форм активного кислорода, образующихся в присутствии феназиновых антибиотиков, и одним из основных компонентов, обеспечивающих их бактерицидные свойства. В тоже время устойчивость штаммов-продуцентов феназинов к высоким уровням собственных антибиотиков коррелирует у них с повышением уровня удельной активности каталазы [8].

В качестве основы для создания продуцентов использовали бактерий *P. aurantiaca*: штамм дикого типа В-162, уровень синтеза феназинов у которого был равен 75 мг/л, а также полученный ранее нами мутантный штамм В-162/255, продуктивность которого соответствовала 410 мг/л [4].

Бактерии штаммов В-162 и В-162/255, подвергшиеся действию НГ, высевали на среду, содержащую 19,5 мМ и 39 мМ пероксида водорода соответственно, и отбирали выросшие колонии. В результате было создано две коллекции мутантных штаммов, одна была представлена производными штамма В-162/255, устойчивыми к более высоким концентрациям окислителя (39 мМ) (9 штаммов), а вторая – на основе бактерий дикого типа В-162, устойчивых к более низким концентрациям пероксида водорода (19,5 мМ) (24 штамма).

Далее у полученных штаммов проводили анализ уровня продукции феназинов. Из результатов представленных на рисунке 1 видно, что наиболее высоким уровнем синтеза антибиотика обладают клетки мутанта В-162/255/15, продукция феназинов у которого соответствовала 2250 мг/л, что в 5,5 раза выше, чем у исходного варианта В-162/255 и в 30 раз выше, чем у бактерий дикого типа В-162. Наиболее высокий уровень продукции феназинов среди мутантов на основе штамма дикого типа В-162 обнаружен у штаммов В-162/2 (1950 мг/л) (рисунок 1б), который практически равнялся таковому для бактерий В-162/255/15 (рисунок 1а).

В ходе дальнейшей работы у полученных мутантов В-162/255/15 и В-162/2 была осуществлена проверка стабильности продукции феназинов. Поскольку полученные мутанты относительно быстро (4–5 пересевов) снижали повышенную продуктивность в условиях обычного культивирования в отсутствие селективного агента, возникла необходимость разработки дополнительного подхода, позволяющего стабилизировать продукционную способность созданных штаммов и обеспечить высокий уровень синтеза феназинов в ряду поколений. Длительное пассирование отобранных мутантных штаммов в присутствии пероксида водорода в концентрации 39 мМ (для штамма В-162/255/15) и 19,5 мМ (для штам

ма В-162/2) позволило стабилизировать продукционную способность штаммов В-162 /2 на уровне 1850 мг/л, штамма В-162/255/15 – 2100 мг/л. В результате проведенных экспериментов были получены штаммы-продуценты, обладающие стабильной продукцией на указанном уровне. Проверка уровня продукции феназиновых антибиотиков у полученных штаммов в течение длительного периода (1,5 лет) позволила заключить, что их продуктивность стабилизировалась и сохранялась на постоянном высоком уровне. Данные показатели у отобранных мутантов были в 5–15 раз выше, чем у контрольных штаммов В-162 и В-162/255, на основе которых они получены.

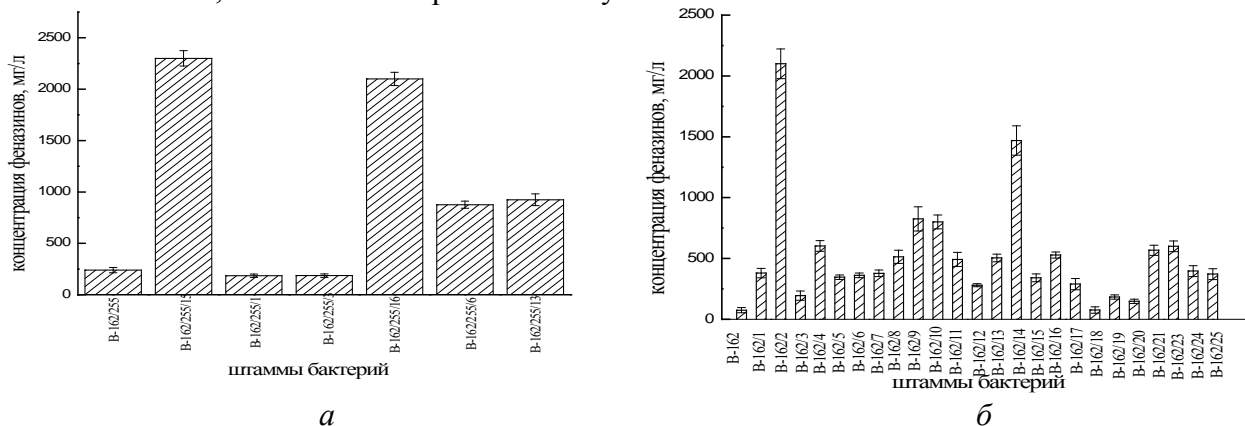


Рисунок 1 – Уровень продукции феназинов у мутантов *P. aurantiaca*, устойчивых к перексиду водорода в концентрации 39 мМ (а) и 19,5 мМ (б)

Известно, что условно патогенные микроорганизмы крайне требовательны к составу питательных сред. Одной из таких высоко специализированных сред для культивирования условных патогенов является среда Сабуро. Вместе с тем, оставалось неясным, могут ли штаммы *P. aurantiaca* синтезировать феназиновые антибиотики на среде Сабуро в концентрациях, сопоставимых с таковыми на стандартной среде ПСА. В предварительной серии экспериментов нами было продемонстрировано, что уровень синтеза феназиновых антибиотиков на этих средах практически не отличается, в связи с чем среда Сабуро была использована для дальнейших экспериментов по изучению антагонистических свойств бактерий *P. aurantiaca* и полученных на их основе мутантов в отношении некоторых условно патогенных бактерий и грибов.

Продемонстрировано, что бактерии *P. aurantiaca* В-162 и В-162/255 не проявляют выраженного антагонизма в отношении *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* и *K. pneumonia ozaenae* что может быть обусловлено недостаточной концентрацией феназинов, синтезируемых *P. aurantiaca* на плотных агаризованных средах. Эксперименты по изучению антагонистических свойств вновь полученных мутантных штамма В-162/2 и В-162/255/15 также продемонстрировали отсутствие антагонизма в отношении *K. pneumonia* и *P. aeruginosa*, тогда как рост *K. pneumonia ozaenae* был полностью подавлен.

Далее таким же образом было проведено изучение антагонистической активности исследуемых штаммов в отношении широко известных патогенов человека *A. niger* и *S. albicans*. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Антифунгальная активность штаммов *P. aurantiaca* в отношении *A. niger* и *S. albicans*

Патоген	Диаметр мицелия гриба, см				
	Контроль (без бактерий)	В-162	В-162/255	В-162/2	В-162/255/15
<i>S. albicans</i>	0,9±0,044	0,13±0,04	0,15±0,0288	0	0
<i>A. niger</i>	9,5	0	0	0	0

Наиболее чувствительными к действию всех штаммов бактерий *P. aurantiaca* оказались грибы рода *A. niger*, рост которых ингибировался на 100% даже штаммами дикого типа, тогда как *C. albicans* проявляла различную степень чувствительности, в зависимости от штамма.

На следующем этапе работы проводилась проверка антимикробных свойств выделенных по указанной выше методике перпаратов феназиновых комплексов исследуемых штаммов. Первоначально был осуществлен подбор оптимальных ингибирующих концентраций полученного препарата феназинового комплекса. Нами были проанализирована антимикробная активность препарата феназинов в концентрации 0,67 мкг/мл, 3,35 мкг/мл, 6,7 мкг/мл, поскольку именно они, согласно литературным источникам, являются основными действующими концентрациями для большинства противомикозных и некоторых антибактериальных препаратов. Изучение антибактериальной активности *P. aurantiaca* и полученных мутантных штаммов в отношении *K. pneumonia*, *K. pneumoniae ozaenae* и *P. aeruginosa* продемонстрировало относительно высокую устойчивость патогенов к феназиновым соединениям. Вместе с тем, более высокие концентрации антибиотиков (3,35 и 6,7 мг/л) из штаммов *P. aurantiaca* В-162/255, В-162/2 и В-162/255/15 заметно ингибировали рост *K. pneumonia*, тогда как в присутствии феназиновых комплексов двух последних штаммов уже в концентрации 0,67 мг/л, рост *K. pneumoniae ozaenae* был полностью подавлен. Данные полученные в опытах представлены в таблице 2.

Принимая во внимание то, что для исследований брались одинаковые концентрации феназиновых комплексов всех изучаемых штаммов, различия в биологической активности не могут быть объяснены большей концентрацией антибиотика, а скорее всего, обусловлены различным качественным составом комплексов. Ранее другими авторами было продемонстрировано, что различные представители бактерий рода *Pseudomonas* могут синтезировать до десяти производных феназин-1-карбоксилата, которые проявляют разную степень биологической активности в отношении различных патогенов [10, 11].

Анализ антифунгальной активности феназиновых комплексов изучаемых штаммов позволил выявить их относительно высокую эффективность в отношении условно патогенных для человека и животных грибов, сопоставимую в таковой для некоторых фитопатогенов. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

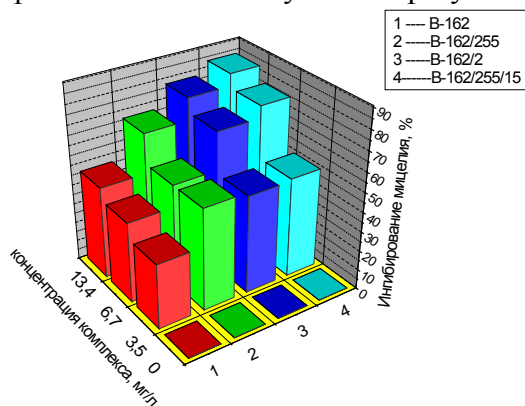


Рисунок 2 – Антифунгальная активность феназиновых комплексов штаммов *P. aurantiaca* в отношении условно патогенных грибов

Из полученных данных видно, что оптимальной антифунгальной концентрацией является концентрация 13,4 мкг/мл. Интересным оказался факт, что одинаковые концентрации феназиновых комплексов из разных штаммов проявляют разную степень биологической активности. Так показано, что в концентрации, равной 3,35 мкг/мл, антибиотики феназинового комплекса штамма В-162/255 вызывают более выраженную задержку роста мицелия *C. albicans* по сравнению с аналогичной концентрацией феназинового комплекса, выделенного из штамма В-162. Полученные данные могут быть объяснены тем, что у мутантного штамма В-162/255 вероятно происходит изменение не только количественного, но и качественного состава феназинового комплекса.

Таблица 2 – Антибактериальная активность феназиновых комплексов штаммов *P. aeruginosa* в отношении условно патогенных бактерий

Условно патогенный штамм	Концентрация феназинового комплекса, мг/л															
	В-162				В-162\255				В-162\2				В-162\255\15			
	контроль		опыт		контроль		опыт		контроль		опыт		контроль		опыт	
<i>K. pneumoniae</i>	1	2	0,67	3,35	6,7	1	2	0,67	3,35	6,7	1	2	0,67	3,35	6,7	
	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++	+++	++	++	6,7
<i>K. pneumoniae sensu lato</i>	1	2	0,67	3,35	6,7	1	2	0,67	3,35	6,7	1	2	0,67	3,35	6,7	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
<i>P. aeruginosa</i>	1	2	0,67	3,35	6,7	1	2	0,67	3,35	6,7	1	2	0,67	3,35	6,7	
	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+

Примечание:

1 – рост патогенна в отсутствии антибиотиков

2 – рост патогенна на среде с растворителем феназинов (ДМСО) в объеме 10 мкл

+ – отражают интенсивность роста культуры

-- – рост культуры отсутствует.

В результате чего увеличивается концентрация некой более биологически активной формы феназиновых антибиотиков. Ранее другими авторами было продемонстрировано, что спектр антимикробной активности феназин-продуцирующих штаммов в значительной мере зависит от качественного состава синтезируемых ими феназиновых антибиотиков [11, 12].

### Выводы

Таким образом, с помощью химического мутагенеза бактерий *P. aurantiaca* и последующей их селекции на устойчивость к пероксиду водорода впервые получены мутанты В-162/2 и В-162/255/15, продукция феназиновых антибиотиков у которых достигает значений 1850 мг/л 2100 мг/л соответственно. Этот способ селекции штаммов-продуцентов феназинов разработан впервые.

Продемонстрировано, что феназиновые антибиотики способны подавлять рост не только фитопатогенных микроорганизмов, но и могут быть достаточно эффективны в отношении условных патогенов человека.

Антибактериальная активность вновь полученных мутантных штаммов в отношении условно-патогенных микроорганизмов *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae ozaenae*, *P. aeruginosa* значительно выше, чем у бактерий дикого типа и штамма В-162/255, в отношении же *K. pneumonia ozaenae* зарегистрировано полное подавление роста патогена. Кроме того, все штаммы бактерий *P. aurantiaca* и выделенные из них очищенные комплексы феназиновых антибиотиков проявляют выраженную антифунгальную активность в отношении *C. albican* и *A. niger*.

### Благодарности:

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории внутрибольничных инфекций Белорусского государственного медицинского университета и лично с.н.с. лаборатории Слабко Ирине Николаевне за предоставление штаммов условно патогенных микроорганизмов.

### Список литературы

1. Laursen, J.B. Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues and Biological Activity / J.B. Laursen, J. Nielsen // Chem. Rev. – 2004. – Vol. 104. – P. 1663–1685.
2. Baxter, M. The occurrence of *Microsporium nanumas* a human pathogen and animal pathogen in New Zealand / M. Baxter, R.D. Pearson // New Zealand J. Med. Lab. Technol. – 1969. – Vol. 23. – P. 87–90.
3. Andriole, V.N. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents / V.N. Andriole // J. Antimicrob. Chemother. – 1999. – Vol. 44. – P. 151–162.
4. Веремеенко, Е.Г., Получение и характеристика мутантов *Pseudomonas aurantiaca* — продуцентов антибиотиков феназинового ряда / Е.Г. Веремеенко, М.Н. Федорович, И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Вестник БГУ. – 2009 – Серия 2, №2. – С. 44–48.
5. Анкирская, А.С. Генитальный кандидоз в структуре оппортунистических инфекций влагалища. Принципы лабораторной диагностики и значение мониторинга чувствительности грибов к антимикотикам / А.С. Анкирская, В.В. Муравьева // Акушерство и гинекология – 2009. – №5. – С. 31–36.
6. Levitch, M.E., A study of the biosynthesis of Phenazine-1-carboxylic acid / M.E. Levitch, E.R. Stadtman // Arch. Biochem. Biophys. – 1964. – Vol. 106. – P. 194–199.
7. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: 1976. 436 с.
8. Феклистова, И.Н. Бактерии *P. aurantiaca* В-162 как основа биопрепаратов для защиты растений / И.Н. Феклистова, Н.П. Максимова // Земляробства і ахова раслін. – 2006. – № 2. – С. 442–44.
9. Веремеенко, Е.Г. Активация антиоксидантного комплекса у бактерий *P. aurantiaca* – продуцентов феназиновых антибиотиков / Е.Г. Веремеенко, Н.П. Максимова // Микробиология – 2010. – Т. 79, №4. – С. 463–469.
10. Turner, J.M. Effect of Growth Conditions on Phenazine Production by *P. phenazinium* / J.M. Turner, A.J. Messenger // J. Gener. Microbiol. – 1983. – Vol. 129. – P. 1013–1018.
11. Homma, Y. Role of antibiotic production in suppression of radish [*Raphanus sativus*] damping-off by seed bacterization with *Pseudomonas cepacia* / Y. Homma, T. Suzui // Ann. Phytopath. Soc. Japan. – 1989. – Vol. 55, № 5. – P. 643–652.
12. Haas, D. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas spp.* and relevance for biological control of plant disease / D. Haas, C. Keel // Annu. Rev. Phytopathol. – 2003. – Vol. 41. – P. 117–153.