

## ВЛИЯНИЕ ПИОВЕРДИНОВ НА СИНТЕЗ ФЕНАЗИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ У РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

И.Н. Феклистова, Ю.М. Кулешова, Н.П. Максимова, В.В. Лысак

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь;

e-mail: feklitova\_iren@rambler.ru

### Введение

Синтез антибиотиков и антибиотико-подобных веществ зарегистрирован у представителей более 20-ти видов *Pseudomonas*. При этом большинство бактерий этого рода характеризуются способностью к образованию одновременно нескольких типов антибиотиков, а у некоторых из них, например, *P. fluorescens* и *P. aeruginosa*, число синтезируемых антибиотических веществ достигает 30-ти.

Известно, что антибиотики, образуемые бактериями рода *Pseudomonas*, обладают широким спектром действия и способны подавлять развитие различных патогенов животных и человека (в частности, бактерий *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Trichophyton* и *Mycobacterium*, а также некоторых вирусов) [1, 2 и др.], возбудителей болезней растений бактериальной и грибной этиологии [1, 3 – 6], фитопатогенных нематод [7].

Антибиотики феназинового ряда представляют собой содержащие азот ароматические соединения, синтезируемые бактериями *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Brevibacterium* и *Streptomyces*, и проявляющие активность против большинства фитопатогенных грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также низших грибов.

Высокая антимикробная активность феназинов объясняется их способностью блокировать окислительно-восстановительные реакции, вызывая нарушение клеточного дыхания [8], а также индуцировать накопление токсических радикалов в клетках чувствительных к ним организмов [8, 9]. Например, образуемый бактериями *P. aeruginosa* пиоцианин индуцирует у ряда бактерий синтез супероксид-дисмутазы, что приводит к накоплению  $H_2O_2$ ,  $HO\cdot$  и  $O_2\cdot^-$  и, как следствие этого, гибели клеток [8, 10]. При этом сами бактерии-продуценты антибиотика способны инактивировать продукты восстановления кислорода с помощью высокоактивных ферментов – каталаз и пероксидаз, что делает их нечувствительными к действию феназиновых соединений.

Ризосферные и почвенные бактерии «флуоресцирующей группы» – *P. fluorescens*, *P. aureofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, продуцирующие феназины, известны, кроме того, как продуценты желто-зеленых флуоресцирующих пигментов (пиовердинов или псевдобактинов) [1, 11]. Одной из важных функций пиовердинов, помимо биопестицидной, биоремедиационной, антибактериальной и пр., является их способность проявлять антиоксидантную активность путем связывания перекисных радикалов.

Нами выдвинуто предположение, что внесение пиовердинов в среду для роста бактерий-продуцентов может снижать количество активных радикалов, таким образом, опосредованно способствуя накоплению антибиотиков феназинового ряда. Флуоресцирующие бактерии *P. putida* КМБУ4308, *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449 способны синтезировать пиовердины, а *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449, кроме того, и феназиновые антибиотики. В связи с этим интересным представлялось исследовать влияние очищенных пиовердинов, синтезируемых указанными бактериями, на синтез антибиотиков феназинового ряда бактериями *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449.

### Методы исследования

Выделение препаратов антибиотиков ароматической природы и их количественную оценку проводили согласно [12]. Выделение пиовердинов проводили согласно [13]. В работе использованы штаммы бактерий *P. putida* КМБУ4308 и *P. aurantiaca* В-162, выделенные в НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии кафедры генетики биологического факультета

БГУ, а также штамм *P. chlororaphis* 449, любезно предоставленный профессором, доктором биол. наук, заведующей НИЛ регуляции экспрессии генов Института молекулярной генетики РАН Хмель И.А.

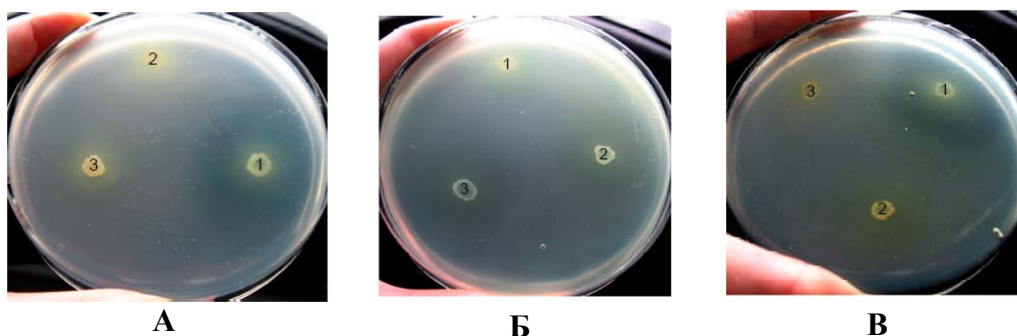
### Результаты и обсуждение

Ранее была осуществлена идентификация синтезируемых бактериями *P. aurantiaca* В-162 антибиотиков феназинового ряда. Установлено, что феназиновый комплекс изучаемых бактерий представлен феназином ( $C_{12}H_8N_2$ ), 1-оксифеназином ( $C_{12}H_7N_2OH$ ) и их общим предшественником феназин-1,6-дикарбоксилатом ( $C_{14}H_8N_2O_4$ ) [14]. Клетки бактерий *P. chlororaphis* 449 также продуцируют 3 типа антибиотиков: феназин-1-карбоксилат (РСА), 2-гидроксифеназин-1-карбоксилат (2-ОН-РСА) и 2-гидроксифеназин (2-ОН-РНЗ) [15].

Нами было выделено три типа пиовердинов, синтезируемых бактериями *P. putida* КМБУ4308, *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449, и оценено влияние пиовердинов на уровень продукции антибиотиков феназинового ряда у бактерий *P. putida* КМБУ4308, *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449.

На первом этапе работы проведено исследование перекрестного влияния трех различных типов пиовердина на рост бактерий *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449. Установлено, что внесение в ростовую среду *P. chlororaphis* 449 пиовердинов, синтезируемых *P. putida* КМБУ4308, приводит, как показано на рисунке 1А, к существенному подавлению роста тест-культуры, тогда как внесение пиовердинов *P. aurantiaca* В-162 вызывает незначительное замедление роста *P. chlororaphis* 449.

При использовании в качестве тест-культуры штамма *P. aurantiaca* В-162 также наблюдается существенное ингибирование роста в случае внесения экзогенного пиовердина *P. putida* КМБУ4308, см. рисунок рис. 1В. Данный феномен может быть объяснен сходным строением как самих пиовердинов, так и рецепторов к ним у *P. chlororaphis* 449 и *P. aurantiaca* В-162, что позволяет рецепторам этих двух штаммов успешно узнавать и усваивать пиовердины друг друга. Внесение же пиовердинов как *P. chlororaphis* 449, так и *P. aurantiaca* В-162 в ростовую среду *P. putida* КМБУ4308 вызывает ингибирование роста тест-культуры, см. рисунок 1Б, свидетельствуя об отсутствии рецепторов, соответствующих экзогенным пиовердинам *P. chlororaphis* 449 и *P. aurantiaca* В-162.



Примечание: источник пиовердинов: 1 – *P. putida* КМБУ4308; 2 – *P. chlororaphis* 449; 3 – *P. aurantiaca* В-162.

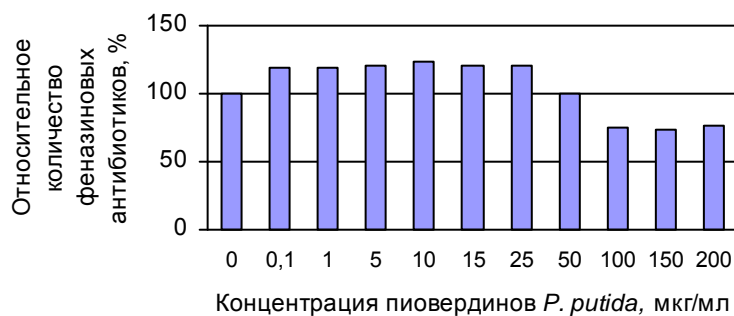
Тест-культуры: А – *P. chlororaphis* 449; Б – *P. putida* КМБУ4308; В – *P. aurantiaca* В-162

Рисунок 1 – Перекрестное влияние трех различных типов пиовердина на рост бактерий *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449

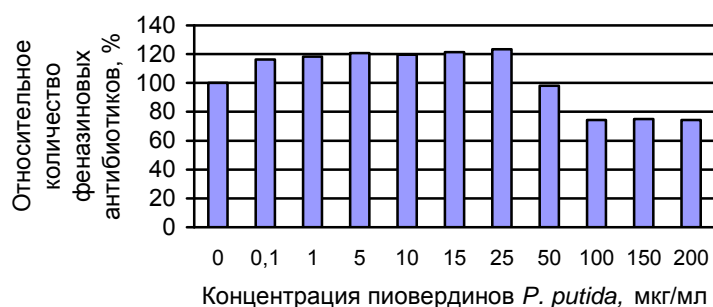
Установлено, что внесение пиовердинов бактерий *P. putida* КМБУ4308 в концентрациях выше 50 мкг/мл приводит к снижению концентрации в среде феназиновых антибиотиков у бактерий *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449, что показано на рисунке 2. Нами выдвинуто несколько гипотез, объясняющих данный факт. В первую очередь, следует принимать во внимание наличие прямой антибактериальной активности

пиовердина *P. putida*, проявляющейся уже в диапазоне концентраций 50–200 мкг/мл. Во-вторых, установлено, что рецепторы бактерий *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449 не способны узнавать и использовать пиовердин *P. putida* КМБУ4308, что приводит к угнетению роста *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449.

В низких концентрациях (0,1–50 мкг/мл) пиовердин, очевидно, не способен угнетать рост *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449, но является для них индикатором присутствия в среде культивирования потенциально конкурентных микроорганизмов, тем самым активируя защитные механизмы *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449, а, следовательно, и синтез феназиновых антибиотиков. Уровень продукции феназинов при этом повышается до 123,3% относительно контрольного варианта у *P. aurantiaca* В-162 и 121,2% у *P. chlororaphis* 449.



А



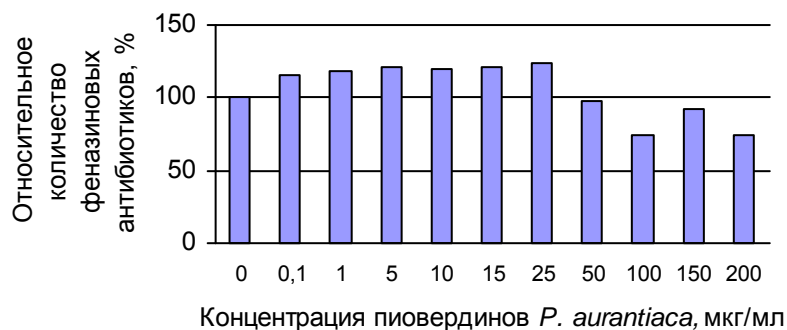
Б

Рисунок 2 – Влияние пиовердина *P. putida* КМБУ4308 на уровень синтеза феназиновых антибиотиков бактериями *P. aurantiaca* В-162 (А) и *P. chlororaphis* 449 (Б)

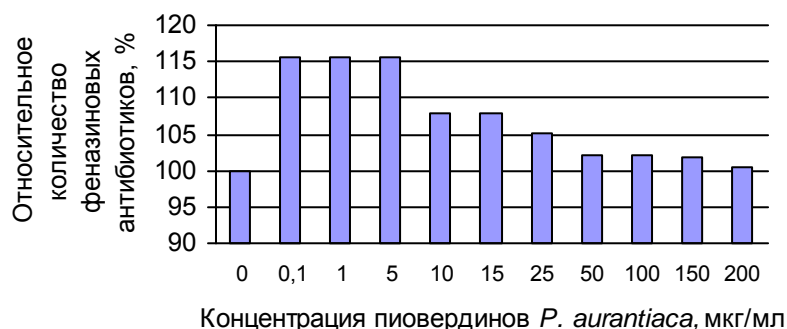
На следующем этапе исследовано влияние пиовердинов *P. aurantiaca* В-162 на синтез антибиотиков собственно клетками бактерий *P. aurantiaca* В-162, а также клетками бактерий *P. chlororaphis* 449. Аналогичный эксперимент проведен с пиовердинами *P. chlororaphis* 449. Установлено, что собственные (аутогенные) и близкородственные пиовердины не ингибируют синтез феназинов клетками бактерии-хозяина, см. рисунки 3 и 4. В то же время, наличие в питательной среде комплекса «эндогенный пиовердин-железо» является дополнительным источником жизненно необходимых ионов, что также может активировать рост бактерий и, соответственно, приводить к увеличению общего количества антибиотика в среде.

С другой стороны, пиовердины вырабатываются при недостатке железа в среде (неблагоприятные условия); соответственно, наличие «своего» пиовердина в среде является индикатором неблагоприятных условий и может запускать защитные механизмы *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449; в том числе, синтез феназиновых антибиотиков, см. рисунки 3б и 4б.

Пиовердины *P. aurantiaca* В-162 вызывают 15,6%-ное увеличение продукции антибиотиков у *P. chlororaphis* 449, тогда как пиовердины *P. chlororaphis* 449 практически не оказывают влияния на уровень образования феназинов у *P. aurantiaca* В-162.

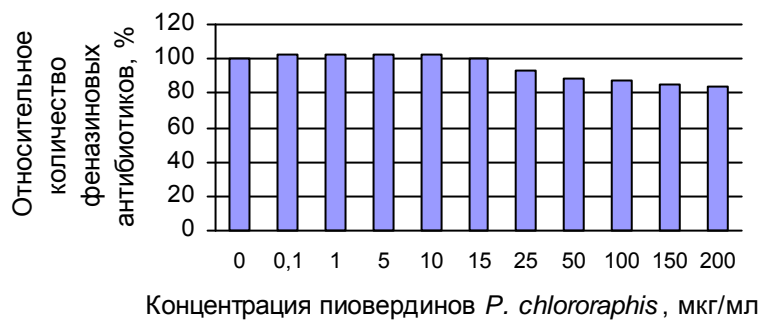


А

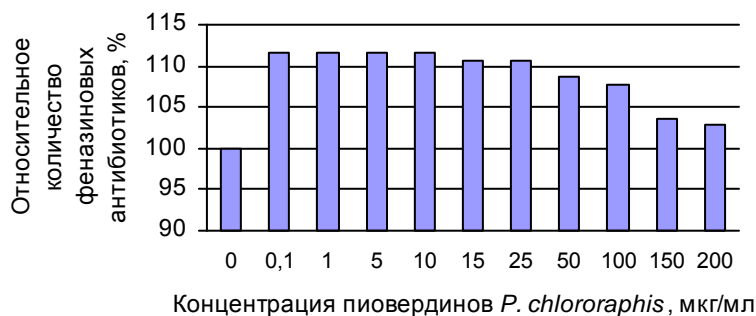


Б

Рисунок 3 – Влияние пиовердина *P. aurantiaca* В-162 на уровень синтеза феназиновых антибиотиков бактериями *P. aurantiaca* В-162 (А) и *P. chlororaphis* 449 (Б)



А



Б

Рисунок 4 – Влияние пиовердина *P. chlororaphis* 449 на уровень синтеза феназиновых антибиотиков бактериями *P. aurantiaca* В-162 (А) и *P. chlororaphis* 449 (Б)

При внесении же аутогенных пиовердинов уровень синтеза антибиотиков феназинового ряда возрастает на 12,2% и 11,7% в случае *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449 соответственно.

### Выводы

Таким образом показано, что в низких концентрациях (0,1–50 мкг/мл) пиовердин бактерий *P. putida* КМБУ4308, очевидно, не способен угнетать рост *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449, но является для них индикатором присутствия в среде культивирования потенциально конкурентных микроорганизмов, тем самым активируя защитные механизмы *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449, а, следовательно, и синтез феназиновых антибиотиков. Внесение пиовердинов бактерий *P. putida* КМБУ4308 в концентрациях выше 50 мкг/мл приводит к снижению концентрации в среде феназиновых антибиотиков у бактерий *P. aurantiaca* В-162 и *P. chlororaphis* 449. Установлено, что собственные (аутогенные) и близкородственные пиовердины не ингибируют синтез феназинов клетками бактерии-хозяина.

### Список литературы

1. Budzikiewicz, H. Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads / H. Budzikiewicz // *Fems microb. Rev.* – 1993. – vol. 104, № 1. – P. 209–228.
2. Denning, G.M. Phenazine-1-carboxylic acid a secondary metabolite of pseudomonas aeruginosa alters expression in immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells / G.M. Denning, S.S. Iyer, K.J. Reszka, Y. O'malley, G.T. Rasmussen, B.E. Britigan // *Am. J. Physiol. Lung cell mol. Physiol.* – 2003. – Vol. 285, I. 3. – P. 584–592.
3. Mavrodi, D.V. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by pseudomonas fluorescens 2-79 / D.V. Mavrodi, V.N. Ksenzenko, R.F. Bonsall, R.J. Cook, A.M. Boronin, L.S. Thomashow // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180, № 9. – P. 2541–2548.
4. Powell, J.F. Management of dollar spot on creeping / J.F. Powell, J.M. Vargas, M.G. Nair // *Plant Disease.* – 2000. – Vol. 84, № 1. – P. 19–24.
5. Cook, R.J. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease / R.J. Cook, S. Thomashow, D.M. Weller, D. Fujimoto, M. Mazzola, G. Bangera, D.S. Kim // *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* – 1995. – Vol. 92, № 10. – P. 4197–4201.
6. Dwivedi, D. Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation / D. Dwivedi, B.N. Johri // *Current Science.* – 2003. – Vol. 85, № 12. – P. 1693–1703.
7. Gallagher, L.A. Pseudomonas aeruginosa paol kills gaenorhabditis elegans by cyanide poisoning / L.A. Gallagher, C. Maniol // *J. Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183, № 21. – P. 6207–6214.
8. Meyer, J. The fluorescent pigment of pseudomonas fluorescent: biosynthesis, purification and physicochemical properties / J. Meyer, M. Abdallah // *J. Gen. Microbiol.* – 1978. – Vol. 107, № 2. – P. 319–328.
9. Leisinger, Th. Secondary metabolism of the fluorescent pseudomonads / Th. Leisinger, R. Margraff // *Microbiol. Rev.* – 1979. – Vol. 43, № 3. – P. 422–442.
10. Hassan, H.M. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine / H.M. Hassan, I. Fridovich // *J. Bacteriol.* – 1980. – Vol. 141, № 1. – P. 156–163.
11. Rabaey, K. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells / K. Rabaey, N. Boon, M. Hofte, W. Verstraete // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. – Vol. 39, № 9. – P. 3401–3408.
12. Levitch, M.E. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis in phenazine-producing strains / M.E. Levitch // *J. Bacteriol.* – 1970. – Vol. 103. – P. 16–19.
13. Кулешова Ю.М. Биологическая активность пиовердина ртм бактерий *Pseudomonas putida*, получение и характеристика штаммов-продуцентов. Дис. Канд.биол.наук: 03.02.03. – мн., 2011.

14. Feklistova, I. N. Obtaining pseudomonas aurantiaca strains capable of overproduction of phenazine antibiotics / I. N. Feklistova, Maksimova N. P. // Microbiology (rus). – 2008. – Vol. 77. – P. 207–212.

15. Veselova, M.A. quorum sensing systems of regulation, synthesis of phenazine antibiotics, and antifungal activity in rhizospheric bacterium pseudomonas chlororaphis 449 / M.A. Veselova, I.A. Bass, V.A. Lipasova, A.Z. Metlitskaya, I.A. Khmel, Sh. Klein, M.I. Ovadis, L.S. Chernin // Russian journal of genetics. – 2008. – Vol. 44. – P. 1400–1408.

**THE INFLUENCE OF PYOVERDINES ON THE SYNTHESIS OF PHENAZINE  
ANTIBIOTICS IN RHIZOSPHERE *PSEUDOMONAS SPP***

**I.N. Feklistova, Y. Kuleshova, N.P. Maximova, V.V. Lysak**

*Belarusian state university, Minsk, Republic of Belarus*

*e-mail: feklistova\_iren@rambler.ru*

Thus, it has been shown that pyoverdin of bacteria *P. putida* KMBU4308 at low concentrations (0.1-50 µg/ml) is obviously not able to inhibit *P. aurantiaca* B-162 and *P. chlororaphis* 449 growth but it may indicate the presence of potentially competitive microorganisms in the culture medium, thereby activating protective mechanisms of *P. aurantiaca* B-162 and *P. chlororaphis* 449 and consequently the synthesis of phenazine antibiotics. Injection of pyoverdins of *P. putida* KMBU4308 at concentrations over 50 µg/ml results in decreasing of phenazine antibiotics concentration in the medium with *P. aurantiaca* B-162 and *P. chlororaphis* 449. It was found that the own (autogenic) and closely relative pyoverdins do not inhibit phenazine synthesis of host bacteria cells.