

УДК 577.181.4

DOI: 10.20535/1810-0546.2017.3.87281

В.В. Клочко*

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна

БІОСИНТЕЗ АНТИБІОТИКІВ ЯК ТАКСОНОМІЧНИЙ МАРКЕР ДЕЯКИХ ВИДІВ *PSEUDOMONAS*

Background. The ability to biosynthesis of antibiotics was established for 20 of 250 species of *Pseudomonas*. The value of the biosynthesis of antibiotics as a taxonomic characteristic for the genus *Pseudomonas* is not studied. This issue will be analyzed using the experimental results.

Objective. The aim of the paper is to identify the ability of usage of antibiotics synthesized by certain types of bacteria of the genus *Pseudomonas*, as a taxonomic marker.

Methods. Methods of thin-layer chromatography (TLC) and LC/MS-analysis were used to determine the synthesis of antibiotics.

Results. A unique set of antibiotics was determined for some types of bacteria *Pseudomonas*, which are specific for them only: pyocyanin – *P. aeruginosa*, 2,4-diacetylphloroglucinol – *P. brassicacearum*, 2-hydroxyphenazine-1-carboxylic acid – *P. chlororaphis subsp. aureofaciens*, pyrrolnitrin and 2,4-diacetylphloroglucinol – *P. protegens*, batumin – *P. batumici*.

Conclusions. The ability to synthesize certain antibiotic substances may serve as a taxonomic marker and be used to identify certain species of *Pseudomonas*. However, the biosynthesis of antibiotics did not show specificity for several species. This problem requires a deeper study of different types of *Pseudomonas*.

Keywords: species of the genus *Pseudomonas*; antibiotics; taxonomy.

Вступ

На сьогодні мікробна таксономія перебуває в процесі еволюції і вивчає нові методи та критерії для розмежування родів і видів бактерій. Рід *Pseudomonas* з моменту свого відкриття у XIX ст. зазнав численних таксономічних змін. У 2002 р. проводилася реіндентифікація низки бактерій, у т.ч. і роду *Pseudomonas*, який тепер включає понад 200 представників. У поточному випуску визначника бактерій Bergey's 2005 року наводиться вичерпний перелік методів, що використовуються в таксономії роду *Pseudomonas*. Ці методи включають у себе морфологію і будову клітин, склад клітинної стінки, метаболічні характеристики, продукування антибіотиків, патогенність для інших організмів, антигенну структуру, генетичну й екологічну характеристики. Відомо, що фенотипічні ознаки традиційно використовувалися як відносно легкий і доступний спосіб ідентифікації бактеріальних ізолятів [1–3].

Здатність до біосинтезу антибіотичних речовин встановлена тільки для близько 20 серед описаних на сьогодні видів псевдомонад. І це при тому, що деякі детально досліджені види роду *Pseudomonas* являють собою справжні “фабрики антибіотиків” [4]. У цілому ж цінність антибіотикоутворення як таксономічної ознаки для представників роду *Pseudomonas* практично не вивче-

на. Це пов'язано насамперед із тим, що робота виконувалася в основному лише з одним виділеним штамом-продуцентом нової активної речовини, а структура антибіотиків встановлювалася хіміками, зазвичай далекими від проблем систематики. До того ж до недавнього часу структура геному бактерій в цьому плані взагалі не розглядалася. Опираючись на експериментальні результати вивчення нами деяких видів псевдомонад, проаналізуємо названу проблему, використовуючи дані генетичного та хроматографічного аналізів, без яких не обходяться сучасні дослідження в систематиці бактерій.

Постановка задачі

Мета роботи – на основі результатів експериментальних мікробіологічних і хімічних досліджень та генетичного аналізу встановити можливість використання антибіотиків, утворюваних бактеріями роду *Pseudomonas*, як таксономічних маркерів.

Матеріали і методи досліджень

Об'єктами досліджень були штами бактерій роду *Pseudomonas* з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України: *P. batumici*

* corresponding author: vvklochko@ukr.net

B-321, *P. gingeri* B-386, *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-111, *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-306.

Культивування штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-111 і B-306 проводили в 100 мл середовища Кінг Б (пептон – 2,0 %; K_2HPO_4 – 0,15 %; $MgSO_4$ – 0,15 %; гліцерин – 1,0 %), штамів *P. batumici* B-321 і *P. gingeri* B-386 на середовищі [5] у колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл на круговій качалці (220 хв^{-1}) за температури $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 72 год.

Виділення феназинових антибіотиків з фугату культуральної рідини проводили методом екстракції хлороформом згідно з методикою [4]. Визначення антибіотиків феназинового ряду проводили у фугаті культуральної рідини методом хромато-мас-спектрометрії на рідинному хроматографі "Agilent 1200" з використанням мас-спектрометричного детектора "Agilent G1956B" (хроматографічна колонка Ascentis RP-amide C18 (150 мм \times 4,6 мм \times 5 мкм), система метанол–вода з додаванням 0,1 %-ної оцтової кислоти, градієнтний режим). Визначали спектри поглинання (довжини хвиль λ) виділених антибіотичних сполук. Мас-спектрометричний аналіз проводили з реєстрацією позитивних і негативних іонів зі співвідношенням маса/заряд (m/z) у діапазоні 50–300.

Повний сіквенс гена 16S рРНК і поліфазний таксономічний аналіз типового штаму *P. batumici* УКМ B-321 проводили методами, описаними раніше [6].

Результати і їх обговорення

Ще наприкінці XIX ст. був описаний перший представник псевдомонад – типовий вид *P. aeruginosa* та описано утворюваний цим видом синій пігмент – піоціанін (рис. 1), активний проти широкої низки мікроорганізмів.

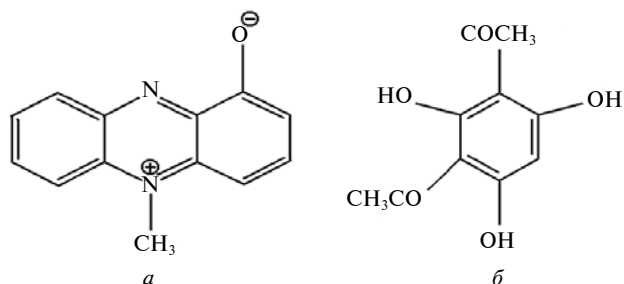


Рис. 1. Структурні формули піоціаніну (а) та 2,4-діацетилфлороглюцину (б) [4]

Свого часу цей антибіотик навіть використовувався для лікування очних захворювань і ви-

разкових стоматитів. Крім того, піоціанін – це надійний таксономічний маркер. Утворення бактеріями цього феназинового пігменту надійно свідчить про їх приналежність до виду *P. aeruginosa* [3, 4]. Проблемою використання антибіотикоутворення як таксономічного маркера для ідентифікації псевдомонад займалися й у відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. В роботах з вивчення похідних флороглюцину було показано, що ці сполуки, раніше знайдені тільки в папороті, синтезуються поширеним видом *P. brassicacearum* і тільки ним. Антибіотик 2,4-діацетилфлороглюцин (див. рис. 1) виявився активним щодо грам-позитивних бактерій (стрептококів, стафілококів і бацил) [4].

У 2011 р. нами було описано вид *Pseudomonas batumici*, всі чотири штами якого синтезували антистафілококовий антибіотик батумін. У попередніх наших роботах на основі аналізу послідовностей гена 16S рРНК встановлено, що штам *P. batumici* B-321 утворює окрему гілку всередині роду *Pseudomonas* з еволюційно близькими до нього видами *P. gingeri* і *P. baetica* – 98 % подібності послідовностей гена 16S рРНК (рис. 2).

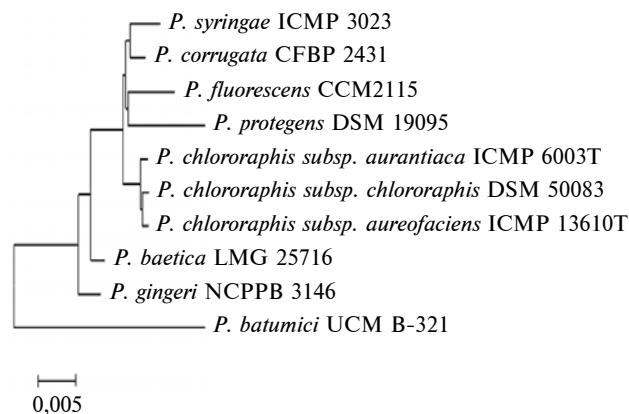


Рис. 2. Філогенетичне дерево, побудоване за даними сіквенсу гена 16S рРНК штаму *Pseudomonas batumici* B-321

Відмінності між зазначеними видами, встановлені поліфазним таксономічним аналізом, полягали в наявності низки ферментів, здатності до пігментоутворення, спектрах вуглецевого живлення, вмісті жирних кислот й антагоністичній активності. Синтез антистафілококового антибіотика батуміну був виявлений тільки у *P. batumici* і, вірогідно, є унікальною особливістю штамів цього виду.

Трохи далі, але досить еволюційно близькими, сусідами *P. batumici* на дендрограмі є три підвиди *P. chlororaphis*. Ці штами є антибіотично активними і пригнічують розвиток бактерій та

грибів. Усі вони синтезують пігменти феназинового ряду, основним із яких є феназин-1-карбонова кислота. Дані, отримані останніми роками, свідчать про те, що роль феназинів для клітин штаму-продуцента далеко не вичерпується їх антимікробною активністю, а полягає також і в участі у формуванні біоплівки, регуляції експресії генів, окисно-відновних властивостях, індукції системної стійкості рослин до збудників захворювань та інших важливих ефектів [7].

Цей пігмент синтезується не тільки підвидами *P. chlororaphis*, але й *P. batumici* і деякими штамами *P. fluorescens* (рис. 3). Таким чином, цю сполуку не можна розглядати як таксономічний маркер певного виду.

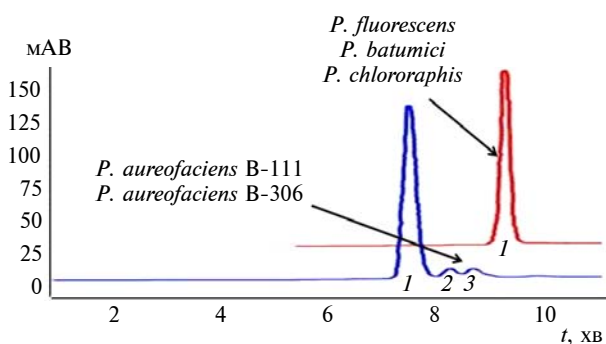


Рис. 3. LC/MS-аналіз синтезу феназинів різними видами роду *Pseudomonas*: 1 – феназин-1-карбонова кислота ($M_r = 224$, $\lambda = 250/364$ нм); 2 – гідроксифеназин ($M_r = 196$, $\lambda = 260/370$ нм); 3 – 2-гідроксифеназин-1-карбонова кислота ($M_r = 240$, $\lambda = 263/374$ нм)

У той же час, крім феназин-1-карбонової кислоти, підвид *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* здатен також синтезувати і 2-гідроксифеназин-1-карбонову кислоту – червоно-помаранчевий пігмент з антибіотичною дією. Всі 9 штамів цього підвиду з нашої колекції (в т.ч. компоненти препарату гаупсин) синтезували цей пігмент. Отже, базуючись на даних літератури [4, 8], а також на результатах наших власних досліджень, можемо стверджувати, що 2-гідроксифеназин-1-карбонову кислоту можна розглядати як таксономічний маркер.

За даними LC/MS-аналізу при вирощуванні на середовищі з d-триптофаном штамів *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-111 і B-306 тільки у останнього була виявлена ще одна високоактивна антифунгальна сполука – піролнітрин. Інший штам такої сполуки не синтезував. Тобто сам піролнітрин не можна розглядати як таксономічний маркер. У 2011 р. було описано новий вид псевдомонад – *P. protegens* [9]. Відмінність цих бактерій, яка включена до діагнозу виду, полягає в одночасному біосинтезі двох анти-

біотичних речовин, які належать до різних хімічних класів – гетероциклічного антибіотика піролнітрину та названої раніше ароматичної сполуки 2,4-діацетилфлороглюцину (рис. 4).

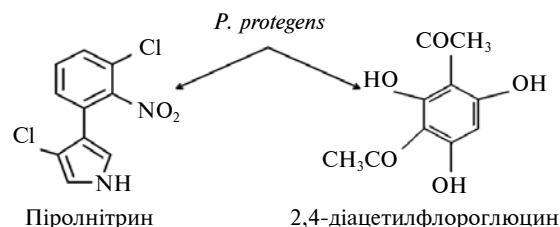


Рис. 4. Антибіотики, що синтезуються видом *P. protegens* [9]

Тобто таксономічним маркером виду *P. protegens* є комбінація з двох антибіотиків. Дотепер у переважній більшості описаних видів псевдомонад утворення антибіотично активних метаболітів і їх таксономічна значимість ще просто не вивчені і є цікавими об'єктами для подальших досліджень. І тут можна йти різними шляхами: аналізувати дані літератури, займатися пошуком оперону, відповідального за синтез певного антибіотика, виділяти антибіотик препаративно з кожного штаму або проводити аналіз геномів бактерій методами біоінформатики (*in silico*).

Висновки

Здатність до синтезу антибіотичних речовин, а іноді й комбінацій із декількох таких сполук, може слугувати таксономічним маркером і бути використана для ідентифікації певних видів бактерій роду *Pseudomonas*. Еволюційно найближчі до *P. batumici* види *P. gingeri* і *P. baetica* не здатні до біосинтезу батуміну. Антибіотичні сполуки, що синтезуються кількома видами псевдомонад, наприклад феназин-1-карбонова кислота, не є таксономічними маркерами. Утворення таких антибіотиків, як батумін, піоціанін, 2-гідроксифеназин-1-карбонова кислота, 2,4-діацетилфлороглюцин, похідні флороглюцину в комбінації з піролнітрином можна розглядати як таксономічний маркер певних видів *Pseudomonas*. Ця проблематика і наведені вище шляхи її вирішення відкривають нові можливості для відповіді на поставлені в роботі питання. Оскільки низка видів псевдомонад широко використовуються в різних біотехнологіях (контроль фітопатогенів, стимуляція росту рослин, синтез антибіотиків і фітогормонів, біоремедіація води і ґрунту), то розробка простих і точних методів ідентифікації штамів-продуцентів залишається важливою проблемою сучасної мікробіології.

Список літератури

1. Palleroni N. The *Pseudomonas* story // Environ. Microbiol. – 2010. – 6, № 12. – P. 1377–138.
2. Peix A., Ramirez-Bahena M., Velazquez E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas* // Infection, Genetics and Evolution. – 2009. – 9. – P. 1132–1147.
3. Bernd H., Rehm A. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. Verlag GmbH: Wiley-VCH, 2008. – 403 p.
4. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – К.: Наук. думка, 1990. – 264 с.
5. Штам *Pseudomonas batumici* IMV B-7532 – продуцент антибіотика батуміну: Пат. 107822 Україна, МПК C12Q 1/04 / Л.М. Чуркіна, О.А. Кіпріанова, В.В. Клочко, Л.В. Авдєєва. – Опубл. 24.06.2016, Бюл. № 12. – 4 с.
6. *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast / E.A. Kiprianova, V.V. Klochko, L.B. Zelena et al. // Мікробіол. журнал. – 2011. – 73, № 5. – С. 3–8.
7. Leland S., Pierson L., Pierson E. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2010. – № 86. – P. 1659–1670.
8. *Microbial Phenazines* / S. Chincholkar, L. Thomashow, eds. – Springer-Verlag Berlin: Heidelberg, 2013. – 248 p.
9. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin / A. Ramette, M. Frapolli, M. Fischer-Le Saux et al. // Syst. Appl. Microbiol. – 2011. – № 34. – P. 180–188.

References

- [1] N. Palleroni, “The *Pseudomonas* story”, *Environ. Microbiol.*, vol. 6, no. 12, pp. 1377–1383, 2010. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02041
- [2] A. Peix et al., “Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*”, *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 9, pp. 1132–1147, 2009. doi:10.1016/j.meegid.2009.08.001
- [3] H. Bernd et al., *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. Verlag GmbH: Wiley-VCH, 2008. doi: 10.1002/9783527622009.
- [4] V.V. Smirnov and E.A. Kiprianova, *Bacteria of the Genus Pseudomonas*. Kyiv, Ukraine: Naukova Dumka, 1990 (in Russian).
- [5] L.N. Churkina et al., “*Pseudomonas batumici* IMV B-7532 – the antibiotic-producing strain”, UA Patent 107822, June 24, 2016 (in Ukrainian).
- [6] E.A. Kiprianova et al., “*Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast”, *Microbiol. Zhurnal*, vol. 73, no. 5, pp. 3–8, 2011.
- [7] S. Leland et al., “Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, no. 86, pp. 1659–1670. 2010. doi: 10.1007/s00253-010-2509-3
- [8] *Microbial Phenazines*, S. Chincholkar and L. Thomashow, eds. Springer-Verlag Berlin: Heidelberg, 2013. doi: 10.1007/978-3-642-40573-0
- [9] A. Ramette et al., “*Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin”, *Syst. Appl. Microbiol.*, no. 34, pp. 180–188, 2011. doi: 10.1016/j.syapm.2010.10.005

В.В. Клочко

БІОСИНТЕЗ АНТИБІОТИКІВ ЯК ТАКСОНОМІЧНИЙ МАРКЕР ДЕЯКИХ ВИДІВ *PSEUDOMONAS*

Проблематика. Здатність до біосинтезу антибіотичних речовин встановлена тільки для 20 серед описаних 250 видів псевдомонад. Значення антибіотикоутворення як таксономічної ознаки для представників роду *Pseudomonas* практично не вивчена. З використанням експериментальних результатів вивчення низки видів псевдомонад буде проаналізовано цю проблему.

Мета дослідження. Показати можливість використання антибіотиків, що синтезуються деякими видами бактерій роду *Pseudomonas*, як таксономічних маркерів.

Методика реалізації. Для визначення синтезу антибіотиків використовували хроматографічні методи тонкошарової хроматографії (TLC) та хромато-мас-спектрометричного (LC/MS) аналізу.

Результати дослідження. Для низки видів бактерій *Pseudomonas* виявлено унікальні антибіотики, утворені лише ними: піоцанін – *P. aeruginosa*, 2,4-діацетилфлороглюцин – *P. brassicacearum*, 2-гідроксифеназин-1-карбонову кислоту – *P. Chlororaphis subsp. aureofaciens*, піролнітрин і 2,4-діацетилфлороглюцин – *P. protegens*, батумін – *P. batumici*.

Висновки. Здатність до синтезу певних антибіотичних речовин може слугувати таксономічним маркером і бути використана для ідентифікації деяких видів псевдомонад. Однак біосинтез антибіотиків, виявлений у кількох представників *Pseudomonas*, не характеризується видовою специфічністю. Ця проблематика потребує більш широкого дослідження різних видів псевдомонад.

Ключові слова: види *Pseudomonas*; антибіотики; таксономія.

В.В. Клочко

БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКОВ КАК ТАКСОНОМИЧЕСКИЙ МАРКЕР НЕКОТОРЫХ ВИДОВ *PSEUDOMONAS*

Проблематика. Способность к биосинтезу антибиотических веществ установлена только для 20 среди описанных 250 видов псевдомонад. Значение антибиотикообразования как таксономического признака для представителей рода *Pseudomonas* практически не изучена. С использованием экспериментальных результатов, полученных для ряда видов псевдомонад, будет проанализирована данная проблема.

Цель исследования. Определить возможность использования антибиотиков, синтезирующихся некоторыми видами бактерий рода *Pseudomonas*, как таксономических маркеров.

Методика реализации. Для изучения синтеза антибиотиков использовали хроматографические методы тонкослойной хроматографии (TLC) и хромато-масс-спектрометрического (LC/MS) анализа.

Результаты исследований. Для ряда видов бактерий *Pseudomonas* установлены уникальные антибиотики, синтезирующиеся только ими: пиоцианин – *P. aeruginosa*, 2,4-диацетилфлороглюцин – *P. brassicacearum*, 2-гидроксифеназин-1-карбоновая кислота – *P. chlororaphis subsp. aureofaciens*, пирролнитрин и 2,4-диацетилфлороглюцин – *P. protegens*, батумин – *P. batumici*.

Выводы. Способность к синтезу определенных антибиотических веществ может служить таксономическим маркером и быть использована для идентификации некоторых видов псевдомонад. Однако биосинтез антибиотиков у некоторых представителей *Pseudomonas* не характеризуется специфичностью. Данная проблематика требует более широких исследований различных видов псевдомонад.

Ключевые слова: виды *Pseudomonas*; антибиотики; таксономия.

Рекомендована Радюю
факультету біотехнології і біотехніки
КПІ ім. Ігоря Сікорського

Надійшла до редакції
21 грудня 2016 року