

УДК 579.25+575.224

*А. А. МУРАТОВА, М. Н. МАНДРИК-ЛИТВИНКОВИЧ, Т. Л. НОСОНОВА,  
Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ, Э. И. КОЛОМИЕЦ, М. А. ТИТОК*

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЕТЕРМИНАНТ,  
ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ  
*PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* БИМ В-446**

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,  
e-mail: Anutik-2041@ya.ru*

В результате транспозонного мутагенеза бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 отобрано более 100 мутантов, характеризующихся отличной от исходного штамма антимикробной активностью, синтезом флуоресцирующих пигментов и подвижностью. Молекулярно-генетический анализ четырех мутантов позволил установить, что изменения исследованных признаков обусловлены встраиванием транспозона mini-Tn5 в регуляторные гены (транскрипционные факторы), обеспечивающие регуляцию общего метаболизма бактериальной клетки.

*Ключевые слова:* мутагенез, антимикробная активность, флюоресценция, *Pseudomonas brassicacearum*, секвенирование.

*A. A. MURATOVA, M. N. MANDRYK-LITVINKOVICH, T. L. NASONOVA,  
L. N. VALENTOVICH, E. I. KOLOMIETS, M. A. TITOK*

**MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF THE DETERMINANTS ASSOCIATED OF ANTIMICROBIAL  
PROPERTIES OF BACTERIA *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* BIM B-446**

*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,  
e-mail: Anutik-2041@ya.ru*

As a result of transposon mutagenesis of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446, more than 100 mutants were selected and characterized with different antimicrobial activity, the synthesis of fluorescent pigments and mobility, comparing with original strain. Molecular genetic analysis of four mutants revealed that changing's in studied properties were caused by inserting a mini-Tn5 transposon in the regulatory genes (transcription factors), that determinate regulation of the general metabolism of the bacterial cell.

*Keywords:* mutagenesis, antimicrobial activity, fluorescence, *Pseudomonas brassicacearum*, sequencing.

**Введение.** Повсеместно распространенные бактерии рода *Pseudomonas* продуцируют во внешнюю среду широкий спектр биологически активных соединений (антибиотики, сидерофоры, гормоны, ферменты), которые обладают способностью подавлять патогенную микрофлору и стимулировать рост и развитие растений [1]. Наиболее активные штаммы-продуценты являются перспективными при создании биопрепаратов для получения экологически чистых продуктов сельского хозяйства.

Молекулярно-генетический анализ бактерий позволяет не только изучать механизмы синтеза первичных и вторичных метаболитов, но и управлять этими процессами для создания штаммов с улучшенными свойствами.

Цель настоящей работы – молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих антимикробные свойства бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446.

**Объекты и методы исследования.** Объектом исследования являлись природные бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446, антагонисты фитопатогенов сельскохозяйственных культур [2, 3]. Глубинное культивирование бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 осуществляли на питательной среде LB и Мейнелла [4] в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин) при температуре 28–30 °С. Продолжительность культивирования составляла 24–48 ч.

Для получения мутантов бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 использовали метод транспозонного мутагенеза. Перенос транспозона *mini-Tn5xylE* в бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446 осуществляли методом конъюгации [5]. Для этого клетки донора *E. coli* BW19851 (*recA*,  $\Omega$ RP4 *tra*, *uidA::pir*<sup>+</sup>), содержащие суицидный вектор *pUT::mini-Tn5xylE*, и клетки реципиента *P. brassicacearum* БИМ В-446, находящиеся в стационарной фазе роста, сгущали в 5 раз, смешивали в соотношении 1:1 и полученную смесь наносили на стерильные мембранные фильтры (*Synpor 6*, размер пор 0,45 мкм), размещенные на поверхности полноценной агаризованной среды в чашках Петри. Скрещиваемые бактерии инкубировали в течении 18 ч при 30°C, после чего клетки смывали физиологическим раствором и из соответствующих разведений высевали на селективные среды.

Оценку антимикробной активности проводили с помощью метода лунок [6]. В качестве тест-культур использовали штамм фитопатогенных бактерий *P. syringae* БИМ В-280 из фонда Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Культуры фитопатогенных бактерий выращивали на мясопептонном бульоне в колбах Эрленмейера на качалке (200 об/мин) при 28 °C в течение 24 ч.

Подвижность исследуемых бактерий определяли с использованием 0,5 %-ной агаризованной LB-среды, наличие флуоресценции регистрировали на агаризованной среде Кинг В [7].

Анализ на присутствие в клетках катехол-2,3-диоксигеназы осуществляли путем обработки клеток катехолом в концентрации 0,5 %. При наличии фермента катехол превращался в 2-гидроксимуконный семиальдегид, в результате чего клетки окрашивались в желтый или оранжевый цвет в зависимости от силы промотора, обеспечивающего экспрессию гена *xylE*.

Тотальную ДНК выделяли саркозидовым методом [8], плазмидную ДНК – с использованием набора реактивов набора Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Литва). Рестриктию плазмидной и тотальной ДНК, лигирование осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем (Thermo Scientific, Литва). Трансформацию бактерий *E. coli* XL1-Blue осуществляли согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве J. Sambrook и соавт. [9].

Для реакции секвенирования ДНК использовали набор реактивов Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (USB, Affymetrix, США). Результаты анализировали с помощью компьютерных программ BLASTN2.2.1 (NCBI сайт: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), программного пакета eSeq V.3.1. (Li-COR Biosciences).

**Результаты и их обсуждение.** Известно, что свойство почвенных псевдомонад стимулировать рост и развитие растений (PGPR – plant growth-promoting rhizobacteria) обусловлено их способностью вступать в плотный контакт с корневой системой, выделяя во внешнюю среду широкий спектр биологически активных соединений различной химической природы (антибиотики, фитогормоны, пигменты) [1]. При этом высокая колонизирующая активность и антимикробные свойства обеспечивают данным микроорганизмам селективное преимущество в природной среде обитания.

В результате введения в клетки *P. brassicacearum* БИМ В-446 суицидного вектора *pUT::mini-Tn5xylE* отобрано более 100 транспозонных мутантов, после чего были изучены их антимикробная активность, наличие флуоресцирующего пигмента и подвижность. Поскольку в состав транспозона входил репортерный ген *xylE* без промотора, отобранные мутантные варианты дополнительно проверяли на экспрессию последнего. Наличие продукта данного гена (катехол-2,3-диоксигеназы) могло свидетельствовать о его встраивании в состав хромосомы непосредственно за промоторной последовательностью инактивированной генетической детерминанты и служить дополнительным маркером, характеризующим сайт встраивания. Анализ транспозонных мутантов *P. brassicacearum* БИМ В-446 (всего проверено 100 вариантов) позволил условно разделить их на несколько фенотипических групп, отличающихся от штамма дикого типа различными комбинациями исследуемых признаков (см. таблицу). Например, среди мутантов, характеризующихся более выраженной, чем у исходного штамма, антимикробной активностью, отобраны варианты (в частности, мутант № 66), у которых отсутствовала подвижность, но увеличивался синтез флуоресцирующего пигмента и, наоборот, подвижность возрастала, но отсутствовал флуоресцирующий пигмент (мутанты № 15 и 70). Отличались мутанты и сайтами локализации

mini-Tn5. В частности, у мутантов с более выраженной антимикробной активностью транспозон встраивался либо в структурную часть гена, либо за промотором с низкой активностью (колонии, обработанные катехолом, окрашивались в желтый цвет или оставались неокрашенными). Большинство отобранных мутантов (73 варианта) не обладали антимикробной активностью по отношению к патогену *P. syringae* БИМ В-280. При этом ряд мутантных вариантов характеризовался диаметрально противоположными свойствами. В частности, у 34 мутантов отсутствовал флуоресцирующий пигмент, а у 17 мутантов синтез пигмента, наоборот, увеличивался. При этом встраивание транспозона у всех вышеуказанных вариантов происходило за активной промоторной областью, что фиксировали по окрашиванию колоний в желтый цвет при обработке катехолом. Полученные результаты свидетельствовали, что транспозон mini-Tn5, встраиваясь в разные участки бактериальной хромосомы, приводит к изменению нескольких признаков одновременно, следовательно, происходит инактивация не структурных генов, а регуляторных, влияющих на целый ряд биохимических процессов, в том числе на антимикробные свойства, подвижность и синтез пигментов.

#### Сравнительная характеристика транспозонных мутантов *P. brassicacearum* БИМ В-446

Мутанты	Анализ мутантов на наличие			
	антимикробной активности	подвижности	флуоресцирующего пигмента	катехол-2,3-диоксигеназы*
31, 33	+	+/-	+	+
15, 67	+	+	-	+/-
68	+	+	+	-
65, 91, 98	+	+/-	+	+/-
18, 64, 81, 83, 89	+	+/-	-	-
66	+	-	+	+/-
11	+/-	+	-	+
17, 20, 25, 28, 38, 41	+/-	+/-	-	+/-
26, 49, 71, 92	+/-	+/-	+	+/-
21, 63	+/-	+/-	-	+
22, 29, 37, 39, 42, 45, 46, 52, 54, 56	+/-	+/-	+	-
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 19, 44, 47, 48, 53, 55, 57, 58, 59, 60, 69, 72, 73, 75, 76, 77, 79, 80, 93, 95, 97	-	+/-	+	+/-
24, 27, 30, 32, 34, 35, 40, 61, 78, 82, 84, 85, 90, 94, 96, 99, 100	-	+/-	-	+/-
16, 43	-	+/-	-	+
23, 74	-	+/-	+	+
36, 50, 88	-	+/-	-	-
51, 62	-	-	+	+
70	-	+	-	+
86, 87	-	-	-	+/-

П р и м е ч а н и е. «+» – признак выражен сильнее, чем у исходного штамма; «+/-» – признак соответствует исходному штамму; «-» – признак отсутствует или выражен крайне слабо; « » – результаты окраски колоний при обработке катехолом: «+» – колонии окрашены в оранжевый цвет, «+/-» – колонии окрашены в желтый цвет, «-» – колонии не окрашены.

Для 4 мутантов, характеризующихся разными свойствами (мутанты № 31, 70, 51 и 67), определяли нуклеотидные последовательности, в пределах которых произошло встраивание транспозона mini-Tn5. Для этого из клеток выделяли тотальную ДНК, обрабатывали рестриктазой PstI (сайт отсутствовал в пределах транспозона mini-Tn5) и лигировали с плазмидой pUC19, предварительно обработанной этой же рестриктазой. Гибридные конструкции, содержащие транспозон mini-Tn5 и окаймляющие его фрагменты хромосомы, отбирали в клетках *E. coli* XL1-Blue на среде с канамицином (транспозон mini-Tn5 детерминировал устойчивость к канамицину), добавляя X-gal и IPTG. Отобранные гибриды, содержащие фрагменты хромосомы размером до 12 т. п. н., использовали в качестве матриц для секвенирующей реакции с праймерами, отжигающимися на концах транспозона и направленными наружу. Анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей, примыкающих к транспозону, позволил установить, что транспозон

mini-Tn5 у мутантов с увеличенной антимикробной активностью (мутанты № 31 и 67) встроился в гены, которые соответственно детерминируют транскрипционный регулятор семейства *LysR* и транскрипционный фактор, регулирующий углеводный обмен (ближайшие гомологи из штамма *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421, CP002585.1). У мутантов с отсутствием антимикробной активности (мутанты № 51 и 70) инсерция mini-Tn5 инактивировала гены, которые соответственно детерминируют синтез Zeta-токсина и S-аденозилметионин-зависимую метилтрансферазу, являющуюся глобальным регулятором многих биохимических процессов в клетке (ближайшие гомологи из штамма *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421, CP002585.1).

**Заключение.** Таким образом, проведенный сиквенс-анализ не выявил вставок транспозона mini-Tn5 в область генов, детерминирующих синтез вторичных метаболитов, пигментов и жгутиков. Тем не менее, обнаружен ряд регуляторных генов, детерминирующих транскрипционные факторы и обеспечивающих регуляцию общего метаболизма, нарушения в которых приводят к изменению антимикробных свойств и синтеза флуоресцирующих пигментов, а также влияют на подвижность исследуемых бактерий.

### Список использованной литературы

1. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable / M. W. Silby [et al.] // FEMS Microbiol Rev. FEMS Microbiol Rev. – 2011. – Vol. 35, N 4. – P. 652.
2. Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture / A. Epavier [et al.] // FEMS Microbiol. Ecol. – 1991. – Vol. 86. – P. 177–184.
3. Effect of *Pseudomonas chlororaphis* on *Pythium aphanidermatum* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponics troughs / A. Khan [et al.] // Biocontrol Sci. Technol. – 2003. – Vol. 13. – P. 615–630.
4. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers / S. Chatterton [et al.] // Biol. Control. – 2004. – Vol. 30. – P. 360–373.
5. Mini Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing- and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative Eubacteria / V. de Lorenzo [et al.] // J. Bacteriol. – 1990. – Vol. 172. – P. 6568–6572.
6. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М.: Колос. – 1983. – С. 253.
7. King, E. O. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein / E. O. King, M. K. Ward, D. E. Raney // J. Lab. Clin. Med. – 1954. – Vol. 44. – P. 301–307.
8. Te Riele, H. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* / H. te Riele, B. Michel, S. D. Ehrlich // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – Vol. 83, N 8. – P. 2541–2545.
9. Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. / J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis // Cold Spring Harbor Publications. – N. Y., 1989. – P. 468.

Поступила в редакцию 21.03.2016