



УДК 579.68.8

В. В. Клочко

Сравнительный таксономический анализ *Pseudomonas batumici* и эволюционно близких ему видов

(Представлено академиком НАН Украины В. С. Подгорским)

На основании анализа последовательностей гена 16S рРНК установлено, что штамм *Pseudomonas batumici* УКМ В-321 образует отдельную ветвь внутри рода *Pseudomonas* с эволюционно наиболее близкими ему видами *P. gingeri* и *P. baetica* — 98% сходства последовательностей гена 16S рРНК. Отличия между названными видами, определенные путем полифазного таксономического анализа, состоят в наличии некоторых ферментов, способности к пигментообразованию, спектрах потребляемых источников углерода, содержании жирных кислот, антагонистической активности. Синтез антистафилококкового антибиотика батумина обнаружен только у *P. batumici* и, по-видимому, является уникальной особенностью штаммов этого вида.

Бактерии обширного рода *Pseudomonas* представлены к настоящему времени более чем двумястами видами, список которых постоянно пополняется. Высоко активные метаболически и крайне пластичные генетически, что определяет их перспективы для биотехнологии, псевдомонады включают как множество сапрофитных микроорганизмов, населяющих разнообразные экологические ниши, так и возбудителей болезней животных, растений, насекомых и других представителей биоты нашей планеты [1, 2].

В 2011 г. на основании изучения четырех штаммов сапрофитных бактерий, выделенных из почвы влажных субтропиков (Черноморское побережье Кавказа), нами был описан новый вид *Pseudomonas batumici* [3].

Полифазный таксономический анализ и результаты секвенса гена 16S рРНК показали, что *P. batumici* образует отдельную ветвь внутри рода *Pseudomonas*. Единственным эволюционно наиболее близким ему видом (98% сходства последовательностей гена 16S рРНК) оказался выделенный ранее в Австралии вид *Pseudomonas gingeri* [4]. Однако в 2012 г. список новых видов псевдомонад пополнился еще одним, по нашим данным, генетически близкородственным *P. batumici*. Им оказался изолированный в Испании патоген камбалы *Pseudomonas baetica* [5].

Отличительной особенностью штаммов *P. batumici* является их способность к образованию поликетидного антибиотика батумина с уникальной избирательной активностью

© В. В. Клочко, 2015

в отношении стафилококков, в том числе и клинических штаммов, полирезистентных к антибиотикам, что определило перспективы его использования в медицине для борьбы со стафилококковыми инфекциями [6].

Цель настоящей работы — сравнительный таксономический анализ штаммов *P. batumici*, *P. gingeri* и *P. baetica*, а также выяснение вопроса о том, не обладают ли эволюционно близкие продуценту батумина виды сходной антибиотической активностью, способны ли они к образованию антибиотических веществ, идентичных батумину или его аналогам.

Материалы и методы. Объектами исследований служили типовой штамм *P. batumici* УКМ В-321 и типовой штамм *P. gingeri* УКМ В-386, полученный нами из бельгийской коллекции микроорганизмов LMG под номером 5327^T. Полный сиквенс гена 16S рРНК, а также полифазный таксономический анализ бактерий проводили методами, описанными ранее [3]. Общий жирнокислотный состав клеток бактерий изучали методом газожидкостной хроматографии метиловых эфиров жирных кислот. Анализ проводили на газовом хроматографе Agilent 6890N с масс-спектрометрическим детектором Agilent 5973 с использованием капиллярной колонки HP-5MS (“Agilent”, США). Пики метиловых эфиров жирных кислот идентифицировали с помощью базы данных масс-спектров NIST 02, а также путем их сравнения со стандартом бактериальных жирных кислот (Supelco, № 4708-U, США).

Антагонистическую активность штаммов изучали на твердой агаризованной среде Гаузе № 2 методом радиальных штрихов. В качестве тест-культур использовали референс-штаммы из Украинской коллекции микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* В-918, *Escherichia coli* В-926, *Pseudomonas aeruginosa* В-900, *Bacillus subtilis* В-901, *Candida albicans* Y-2681.

Синтез антибиотиков изучали при культивировании штаммов на круговой качалке: в колбы Эрленмейера вносили 100 мл жидкой питательной среды, содержащей глюкозу, неорганические соли и микроэлементы [7]; процесс вели при 25 °С в течение 72 ч.

Сравнительный анализ секвенированных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast. Филогенетический анализ и сравнение нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК представителей различных видов *Pseudomonas* осуществляли с использованием программы MEGA 5 согласно методикам, описанным в работах [8, 9].

Наличие антибиотических веществ определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), используя жидкостной хроматограф Agilent 1200 (Agilent Technologies): колонка — XDB-C18 (Zorbax 150 мм × 4,6 мкм × 5 мкм), подвижная фаза — ACN : H₂O (55 : 45) с добавлением 0,5 мМ раствора ацетата аммония, температура колонки 30 °С, скорость потока — 1 мл/мин, инъекция 5 мл, изократический режим.

В таблицах приведены средние значения, являющиеся достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований. Согласно результатам сиквенс гена 16S рРНК наиболее близкими к *P. batumici* видами оказались *P. gingeri* и *P. baetica*. Уровень родства этих трех видов, согласно данным Genbank, составил 98%. На филогенетическом дереве (рис. 1) *P. batumici*, *P. gingeri* и *P. baetica* образуют ветви, объединенные в отдельный от остальных псевдомонад кластер. Полифазный таксономический анализ обнаруживает много сходного в свойствах трех рассматриваемых видов. Все они лофотрихи, оксидазоположительны, обладают аргининдигидролазой (но не лизин- и орнитиндекарбоксилазой), ассимилируют глюкозу и многие другие углеводы, органические кислоты, полиспирты и аминокислоты в качестве единственных источников углеродного питания. В табл. 1 представлены отличия в ферментативной активности штаммов *P. batumici*, *P. gingeri* и *P. baetica*, а также в спектрах их углеродного питания. Виды *P. gingeri* и *P. baetica* принадлежат к флюоресцирующей группе рода *Pseudomonas*. При этом способность к синтезу зеленого флюоресци-

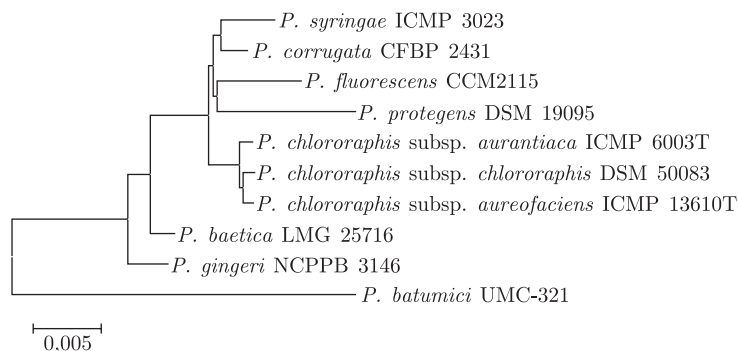


Рис. 1. Филогенетическое дерево штамма *P. batumici* УКМ В-321. Цифрами указана частота группировки штаммов в кластеры в 100 репликах исходного набора последовательностей ДНК, случайно измененных методом boot-strap

рующего пигмента наблюдается только у слизистых S-, но не R-форм *P. gingeri*. Штаммы *P. batumici* вообще не способны к флюоресценции.

Жирнокислотные спектры анализируемых видов в целом укладываются в стандарты рода *Pseudomonas*, хотя отличаются количественным содержанием отдельных компонентов жирнокислотного пула (табл. 2). Содержание жирной кислоты C16 : 0 у штамма *P. batumici* в полтора раза превышало таковое у штаммов *P. gingeri* и *P. baetica* и составляло около 46%. В то же время такие минорные кислоты, как C12 : 0, 2ОНC12 : 0 и transC18 : 1 у *P. batumici* находились в значительно меньшем количестве, чем у остальных двух видов.

Таблица 1. Некоторые фенотипические отличия между штаммами *P. batumici*, *P. gingeri* и *P. baetica*

Признак	Вид, номер штамма		
	<i>P. batumici</i> В-321 ^Т	<i>P. gingeri</i> УКМ В-386 ^Т	<i>P. baetica</i> LMG 25716 ^Т [5]
Зеленый флюоресцирующий пигмент	—	+	+
Денитрификация	—	—	+
Левансахараза	+	+	н/д
Гидролиз			
желатина	—	+	+
твина 80	+	—	—
Усвоение			
сахарозы	+	—	—
трегалозы	+	+	—
l-арабинозы	+	—	+
ацетата	—	+	+
пропионата	—	+	+
итаконата	+	+	—
α-кетоглутарата	+	—	+
тартрата	—	+	—
хината	+	—	+
инозита	+	+	—
сорбита	—	+	—
адонита	—	+	—
l-лейцина	—	+	+
l-лизина	—	+	+
l-серина	—	+	+

Примечание. н/д — нет данных.

Интересно, что рассматриваемые представители псевдомонад, весьма близкие эволюционно, существенно отличаются по своей экологии. Изолированный из почвы штамм *P. batumici* является, по нашим данным, сапрофитом — обитателем ризосферы растений. Штаммы *P. gingeri* выделены из тканей гриба *Agaricus bisporus*, пораженных бурой пятнистостью (ginger blotch), и являются патогенами культивируемых грибов [4, 10]. Вид *P. baetica* вызывает заболевания рыб и был выделен при их массовой гибели из печени погибшей камбалы *Dicologlossa cuneata* (побережье Испании, Хуэльва). Способность к росту в присутствии 6% NaCl сближает эти микроорганизмы с морскими протеобактериями [5]. Интересно, что не только типовой, но и другие изученные нами штаммы вида *P. batumici*, а также штамм *P. gingeri* росли при указанной выше концентрации хлорида натрия.

Как ранее упоминалось, штаммы *P. batumici* являются продуцентами батумина — антибиотика, высоко активного в отношении стафилококков. Одновременно с батумином они синтезируют желтый пигмент — феназин-1-карбоновую кислоту — широко распространенное среди экзометаболитов псевдомонад соединение феназинового ряда, обладающее антибактериальной и антифунгальной активностью. У представителей *P. gingeri* и *P. baetica* подобные антибиотические вещества не описаны. Нас интересовало, обладают ли названные виды антибиотической активностью, сходной со свойствами *P. batumici*.

Исходя из данных антагонистической активности *P. batumici* и *P. gingeri* (табл. 3), можно сделать вывод о принципиальных отличиях в антагонизме этих штаммов.

Штамм *P. batumici* вызывал полное угнетение стафилококка, а также был активным против *E. coli*. В тоже время *P. gingeri* проявлял высокую антагонистическую активность в отношении видов *P. aeruginosa* и *B. subtilis*.

Нами был проведен HPLC-анализ культуральных жидкостей штаммов *P. batumici* B-321 и *P. gingeri* B-386 (рис. 2). Присутствие двух пиков, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии как батумин и его минорный аналог дескарбамоилбатумин, объясняет высокую антибиотическую активность *P. batumici* в отношении стафилококков. Заметим,

Таблица 2. Жирнокислотный состав видов *Pseudomonas*

Жирные кислоты	Содержание жирных кислот в штаммах, %		
	<i>P. batumici</i> УКМ B-321 ^T	<i>P. gingeri</i> УКМ B-386 ^T	<i>P. baetica</i> LMG 25716 ^T [5]
C12 : 0	0,25	2,1	1,68
2ОНC12 : 0	0,96	7,2	5,54
C14 : 0	0,69	0,5	0,48
C16 : 0	46,10	29,3	29,43
C16 : 1	27,50	25,5	39,5
C17 : 0	0,19	0,2	0,14
ΔC17 : 0	14,90	16,3	3,15
C18 : 0	4,69	0,5	0,34
transC18 : 1	4,91	8,3	12,22

Таблица 3. Антагонистические свойства штаммов *P. batumici* и *P. gingeri*

Штамм	Зоны задержки роста тест-штаммов, мм				
	<i>S. aureus</i> B-918	<i>E. coli</i> B-926	<i>P. aeruginosa</i> B-900	<i>B. subtilis</i> B-901	<i>C. albicans</i> Y-2681
<i>P. batumici</i> УКМ B-321	Полное угнетение	17	0	3	10
<i>P. gingeri</i> УКМ B-386	0	0	20	16	5

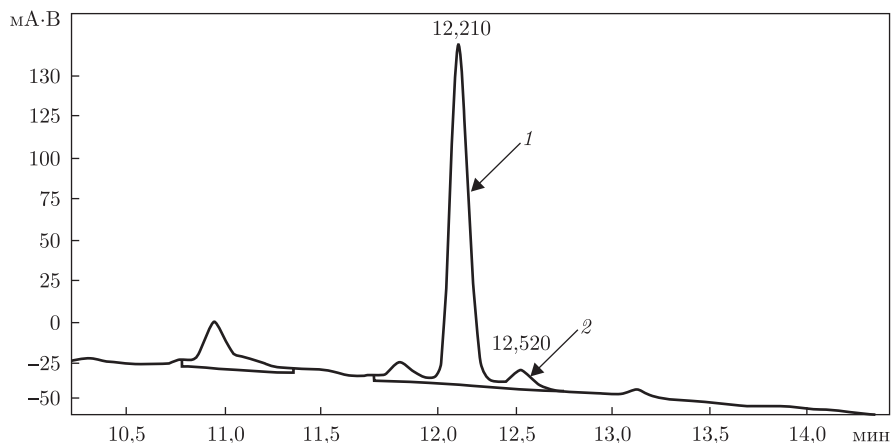


Рис. 2. HPLC-анализ культуральной жидкости штамма *P. batumici* УКМ В-321: 1 — батумин; 2 — дескарбамоилбатумин

что к синтезу батумина способны все штаммы этого вида, поддерживаемые в Украинской коллекции микроорганизмов. В культуральной жидкости *P. gingeri* подобные пики не были обнаружены. Данные о синтезе штаммом *P. baetica* LMG 25716 каких-либо антибиотических веществ в доступной нам литературе отсутствуют.

Таким образом, анализ сиквенса гена 16S рРНК — наиболее консервативной части бактериального генома — позволил обнаружить генетически наиболее близкие к *P. batumici* виды псевдомонад — *P. gingeri* и *P. baetica*. Применение полифазного таксономического анализа показало, что виды *P. gingeri* и *P. baetica* существенно отличаются от *P. batumici* по своим фенотипическим свойствам (ферментативной активности, спектрам потребляемых источников углерода), общему жирнокислотному составу, антибиотической активности. Результаты исследований и анализ литературных данных позволяют предположить, что способность к синтезу поликетидного антибиотика батумина является уникальной особенностью *P. batumici* и не свойственна другим представителям рода *Pseudomonas*.

Автор выражает благодарность научному сотруднику Института микробиологии и вирусологии НАН Украины, канд. биол. наук Л. Б. Зеленой за помощь в обработке генетических данных.

1. Silby M., Winstanley C., Godfrey S. et al. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable // FEMS Microbiol. Rev. — 2011. — **35**, No 4. — P. 652–680.
2. Palleroni N. The *Pseudomonas* Story // Environ. Microbiol. — 2010. — **12**, No 6. — P. 1377–1383.
3. Kiprianova E. A., Klochko V. V., Zelena L. B. et al. *Pseudomonas batumici* sp. nov., the antibiotic-producing bacteria isolated from soil of the Caucasus Black Sea coast // Мікробіол. журн. — 2011. — **73**, No 5. — С. 3–8.
4. Wong W., Fletcher J., Unsworth B., Preece T. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* // J. Appl. Bacteriol. — 1982. — No 52. — P. 43–48.
5. Lopez J., Dieguez A., Doce A. et al. *Pseudomonas baetica* sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau) // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2012. — No 62. — P. 874–882.
6. Кіпріанова Е. А., Чуркіна Л. Н., Клочко В. В., Приходько В. А. Оригінальний отечественний антибіотик батумин: структура і активність, біотехнологія, перспективи використання в медицині // Матеріали VI Нац. з'їзду фармацевтів України “Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України”. — Харків, 2005. — С. 346–347.
7. Пат. 23609 А Україна, МКІ⁴ С 12 № 1/20. Штам *Pseudomonas batumici* 17 — продуцент нового антистафілококового антибіотика батуміну / В. В. Смірнов, О. А. Кіпріанова, Л. М. Чуркіна. — Опубл. 31.08.98, Бюл. № 31. — 3 с.

8. Safronova L. A., Zelena L. B., Klochko V. V., Reva O. N. Does the applicability of *Bacillus* strains in probiotics rely upon their taxonomy? // Can. J. Microbiol. – 2012. – **58**. – P. 212–219.
9. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony // Meth. Mol. Biol. and Evol. – 2011. – No 28. – P. 2731–2739.
10. Cutri S., MacCauley B., Roberts W. Characteristics of pathogenic non-fluorescent (smooth) and non-pathogenic fluorescent (rough) forms of *Pseudomonas tolaasii* and *P. gingeri* // J. Appl. Bacteriol. – 1984. – No 57. – P. 291–298.

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 24.10.2014

В. В. Ключко

Порівняльний таксономічний аналіз *Pseudomonas batumici* та еволюційно близьких до нього видів

На основі аналізу послідовностей гена 16S рРНК встановлено, що штам *Pseudomonas batumici* УКМ В-321 утворює окрему гілку всередині роду *Pseudomonas* з еволюційно близькими до нього видами *P. gingeri* і *P. baetica* — 98% подібності послідовностей гена 16S рРНК. Відмінності між наведеними видами, встановлені поліфазним таксономічним аналізом, полягають в наявності ряду ферментів, здатності до пігментоутворення, спектрах вуглецевого живлення, вмісту жирних кислот, антагоністичній активності. Синтез антистафілококового антибіотика батуміну виявлений тільки у *P. batumici* і, вірогідно, є унікальною особливістю штамів цього виду.

V. V. Klochko

Comparative taxonomic analysis of *Pseudomonas batumici* and evolutionally related species

Results of 16S rRNA gene sequences analysis have been shown that strain *Pseudomonas batumici* UCM B-321^T forms a separate branch within the genus *Pseudomonas* and has 98% of 16S rRNA gene sequence similarity with evolutionally most related species *P. gingeri* and *P. baetica*. The differences between the mentioned species determined by the polyphasic taxonomic analysis include the presence of some enzymes, pigments production, spectra of assimilated carbon sources, fatty acid profiles, and antagonistic activity. Synthesis of antistaphylococcal antibiotic batumin was found only in *P. batumici* strains and is, probably, the unique peculiarity of this species.