

В. В. Ключко, Л. Б. Зелена, К. О. Чугунова, П. М. Царенко,
Л. О. Крючкова, Л. А. Пасічник, Л. В. Авдєєва,
академік НАН України В. С. Підгорський

Штам *Pseudomonas* sp. 2303 — активний антагоніст фітопатогенів та його антибіотичні властивості

В результаті скринінгу серед штамів Української колекції мікроорганізмів відібрано штам *Pseudomonas* sp. 2303 з високою антибактеріальною і антифунгальною активністю. Зона затримки росту фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens* становила 18–39 мм; індекси пригнічення мікроміцетів, представників родів *Fusarium*, *Bipolaris*, *Pythium*, *Gaeumannomyces*, знаходилися в діапазоні 39–51%. Також штам *Pseudomonas* sp. 2303 характеризувався високою альгіцидною активністю — фугат культуральної рідини при розведенні 1 : 5 пригнічував ріст ціанобактерій *Anabaena variabilis*, *Nostoc linckia* і *Microcystis aeruginosa* на 85–90%. За даними HPLC-аналізу в культуральній рідині *Pseudomonas* sp. 2303 ідентифіковано антибіотично активну сполуку — феназин-1-карбонову кислоту. Молекулярно-генетичний аналіз — ампліфікація з праймерами до гена *phzD* — підтвердив наявність у штаму феназинового оперону. Штам *Pseudomonas* sp. 2303 можна розглядати як перспективну основу біопрепаратів для захисту сільськогосподарських культур, а також водоймищ від “цвітіння”.

Бактерії роду *Pseudomonas* завдяки своєму потужному метаболічному потенціалу щодо здатності до синтезу як біополімерів, так і низькомолекулярних продуктів є привабливим об’єктом для комплексних досліджень [1]. Серед низькомолекулярних сполук псевдомонад значну групу складають феназинові пігменти — азотовмістні гетероциклічні речовини з широким спектром антибіотичної дії по відношенню до бактерій і грибів.

Феназини відіграють важливу роль у функціонуванні псевдомонад, беручи участь в їх окисно-відновних реакціях, вірулентності бактерій, гальмуванні розвитку фітопатогенів, енергоефективності мікробної клітини та її сигнальних функціях [1]. Останнім часом штами-продуценти феназинів все ширше використовуються для біоконтролю хвороб сільськогосподарських культур [1, 2]. На основі псевдомонад створено низку біопрепаратів для сільського господарства: Progradix (Німеччина), Sedomon (Швеція), Псевдобактерин (Росія), Планриз (Білорусь), Гаупсин (Україна), призначених для захисту рослин від кореневих гнилей і листових плямистостей.

Відомо, що біопрепарати, зокрема і на основі псевдомонад, використовуються для боротьби з “цвітінням” води. Ціанобактерії родів *Anabaena*, *Nostoc*, *Microcystis* є основними збудниками “цвітіння” водоймищ різного типу. Крім “цвітінням” води, вони здатні викликати токсичні отруєння. Наприклад, штами *Microcystis aeruginosa* синтезують такі токсини, як мікроцистин, гепатотоксин, ціанопептолін, інгібітор хімотрипсину, що спричиняють порушення обміну речовин і ураження м’язів серця у тварин та людини [3], алергічні реакції та кишково-шлункові захворювання [4].

Проблема цвітіння води є актуальною не тільки для України. В Англії, Норвегії, Швейцарії і Фінляндії створені спеціальні служби для моніторингу екологічного стану водних сис-

тем. Для боротьби з масовим розмноженням ціанобактерій сьогодні застосовують фізичні, хімічні та біологічні методи боротьби. Зауважимо, що фізичні методи є енергозатратними, а хімічні альгіциди викликають резистентність ціанобактерій за один вегетаційний період та потребують збільшення внесеної концентрації. Тому використання природних альгіцидів можна розглядати як ефективну і екологічно безпечну альтернативу в боротьбі з “цвітінням” води [5].

У відділі антибіотиків Інституту мікробіології і вірусології НАН України знаходиться велика колекція бактерій роду *Pseudomonas*, зібрана протягом декількох десятиріч. Далеко не всі штами цієї колекції детально вивчені з погляду їх здатності до синтезу певних антимікробно-активних сполук, зокрема феназинів.

Ми ставили за мету виявити серед найбільш активних штамів *Pseudomonas* продуцентів феназинів та охарактеризувати їх біологічну дію.

Матеріали і методи. Скринінг продуцентів феназинів проводили серед штамів з колекції відділу антибіотиків ІМВ НАН України та Української колекції мікроорганізмів (УКМ): *Pseudomonas chlororaphis* В-106, *P. chlororaphis* В-107, *P. putida* В-115, *P. fluorescens* 2235, *P. fluorescens* 5175, *Burkholderia* (раніше *Pseudomonas*) *cepacia* В-317, *B. cepacia* В-323, *B. cepacia* В-324. Також досліджували групу штамів з нечітко визначеною видовою належністю: *Pseudomonas* sp. 2302, *Pseudomonas* sp. 2303 і *Pseudomonas* sp. 2305, які за результатами наших попередніх фенотипних досліджень, були віднесені до виду *Pseudomonas fluorescens*. Для порівняння використовували досліджені нами раніше на синтез феназинів штами *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-306 — складові препарату гаупсин [6].

Антагоністичні властивості штамів вивчали на твердому поживному середовищі Гаузе № 2 методом радіальних штрихів. Для кількісної оцінки фунгіцидної дії розраховували індекс пригнічення за методикою В. Н. Ownley [7]. У таблиці і на рисунках наведені середні значення, що є достовірними при $p < 0,05$.

Як тест-об'єкти використовували штами:

а) фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 8511, *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, *Pectobacterium carotovorum* 8982, *Xantomonas campestris* 80036, *Clavibacter michiganensis* 102, *Agrobacterium tumefaciens* 8626 (з колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України);

б) фітопатогенних грибів: *Fusarium graminearum* 08G, *F. poae* 09G, *F. solani* 11Z, *Bipolaris sorokiniana* 10Z, *Pythium sylvaticum* 11Z, *Gaeumannomyces graminis* 10Z (з колекції відділу антибіотиків ІМВ НАН України);

в) ціанобактерій: *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena variabilis*, *Nostoc linckia* (з колекції відділу фікології Інституту ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України). Ціанобактерії вирощували на рідкому середовищі Фітцджеральда [8] у колбах Ерленмейєра (150 мл поживного середовища), при 25 °С, без аерації, з цілодобовим освітленням люмінесцентними лампами денного світла СВЕ ЛБУ-30 (інтенсивність освітлення — 100 мкмоль/(м² · с), тривалість культивування — 10 діб. Культуральну рідину штамів-продуцентів розводили в 5, 10, 20, 50 і 100 разів, додавали до культур ціанобактерій, через 10 діб визначали їх оптичну густину. Контролем були штами ціанобактерій без внесення культуральної рідини продуцентів [9].

Штами-продуценти феназинів вирощували в глибинних умовах на качалках, у колбах Ерленмейєра, що містили 100 мл поживного середовища Кінга А, при 28 °С, частоті обертів 230 об/хв протягом 72 год.

Визначення антибіотиків феназинового ряду проводили у фугатах культуральних рідин методом хромато-мас-спектрометрії на рідинному хроматографі “Agilent 1200” з використанням мас-спектрометричного детектора “Agilent G1956B”. Хроматографічна колонка Ascentis RP-amide C18, система метанол–вода з додаванням 0,1% оцтової кислоти, градієнтний режим.

З метою визначення наявності в геномах досліджуваних видів гена *phzD*, що кодує ізохоризматазу, один із ферментів синтезу феназину, виконували ампліфікацію з праймерами до цього гена. Умови проведення ПЛР-аналізу описані в роботі [6].

Результати досліджень. За результатами проведеного скринінгу, найбільш активними щодо фітопатогенних бактерій виявилися штами з невизначеною видовою належністю (табл. 1).

Найбільшим антагонізмом характеризувався штам *Pseudomonas sp.* 2303, який виявився значно активнішим за штами *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-111 та *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-306, що входять до складу гаупсину. Зазначимо, що штам *Pseudomonas sp.* 2303 характеризувався бактеріостатичною дією на фітопатогенні бактерії.

Також нами перевірена антагоністична активність всіх штамів до фітопатогенних грибів. За даними В.Н. Ownley [7], активними антагоністами грибів вважаються штами-продуценти, які мають індекс пригнічення в межах 25–40%. Як щодо фітопатогенних бактерій, так і до фітопатогенних грибів найбільш активними знову виявилися штами з групи *Pseudomonas sp.*, зокрема *Pseudomonas sp.* 2303, індекс пригнічення для останнього знаходився в діапазоні 39,1–51,8 %. Найбільший індекс пригнічення відзначався відносно збудника офіобольозної кореневої гнилі, викликаної *Gaeumannomyces graminis var. tritici* 10Z і становив 51,8%.

Як зазначалося вище, однією з актуальних проблем розробки біопрепаратів є перевірка їх альгіцидних властивостей. З цією метою нами використано три штами ціанобактерій *Anabaena variabilis*, *Nostoc linckia*, *Microcystis aeruginosa* — саме ці культури є основною причиною “цвітіння” водоймищ.

У наших дослідках культуральна рідина штаму *Pseudomonas sp.* 2303 пригнічувала розвиток всіх представників ціанобактерій (рис. 1).

При розведенні 1 : 5 фугату культуральної рідини *Pseudomonas sp.* 2303 культури всіх ціанобактерій пригнічувалися на 85–90%, а при розведенні 1 : 50 — на 40–60%. Навіть при розведенні 1 : 100 культуральна рідина штаму гальмувала ріст *Nostoc linckia* і *Microcystis aeruginosa* в середньому на 45%. Оскільки активними вважаються штами-продуценти, не-

Таблиця 1. Антагонізм штамів *Pseudomonas* щодо фітопатогенних бактерій

Штами-антагоністи	Зона затримки росту, мм					
	Тест-штами					
	<i>Pseudomonas syringae pv. syringae</i> 8511	<i>P. syringae pv. atrofaciens</i> 9400	<i>Pectobacterium carotovorum</i> 8982	<i>Xantomonas campestris</i> 80036	<i>Clavibacter michiganensis</i> 102	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 8626
<i>Pseudomonas sp.</i> 2302	19	17	16	34	31	21
<i>Pseudomonas sp.</i> 2303	22	20	18	39	33	23
<i>Pseudomonas sp.</i> 2305	15	13	14	27	20	14
<i>P. aureofaciens</i> B-111	9	8	0	14	16	0
<i>P. aureofaciens</i> B-306	8	5	0	12	13	0

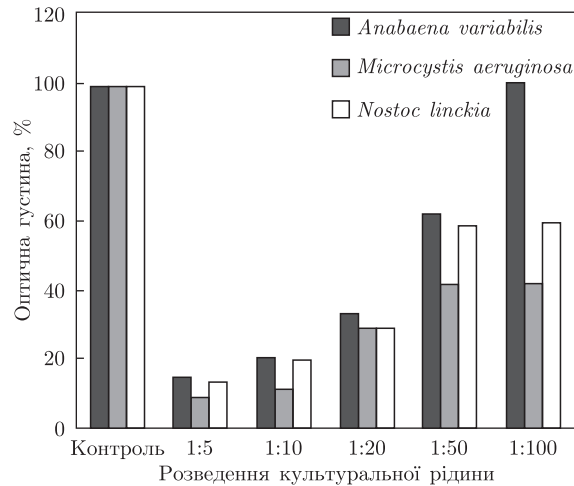


Рис. 1. Вплив фузату культуральної рідини штаму *Pseudomonas sp. 2303* на ріст ціанобактерій

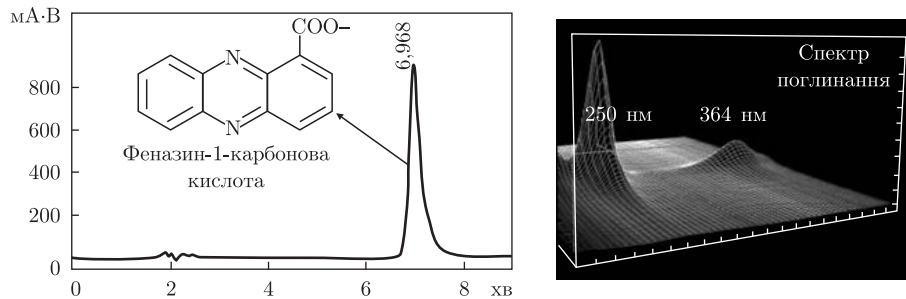


Рис. 2. HPLC-аналіз та спектр поглинання культуральної рідини штаму *Pseudomonas sp. 2303*

розведена культуральна рідина яких здатна пригнічувати ріст ціанобактерій не менше ніж на 50% [9], можна зробити висновок, що штам *Pseudomonas sp. 2303* характеризується високою альгіцидною активністю.

Серед перевірених на антагоністичні властивості культур псевдомонад найбільш активним виявився штам *Pseudomonas sp. 2303*. Тому ми поставили за мету охарактеризувати його антибіотичну активність.

Для встановлення конкретних сполук феназинового ряду, які здатні синтезувати штам *Pseudomonas sp. 2303*, нами застосовано HPLC-аналіз з використанням мас-спектрометрії (рис. 2).

За молекулярною масою (224) та характерними максимумами спектра поглинання (λ_{\max} 250 і 364 нм) нами ідентифікована єдина сполука феназинового ряду, що синтезувалася штамом *Pseudomonas sp. 2303* — феназин-1-карбонова кислота. Для порівняння — штамми гаупсину (*P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-111 і *P. chlororaphis subsp. aureofaciens* B-306) характеризувалися біосинтезом трьох сполук феназинового ряду: феназин-1-карбонової кислоти, 2-оксифеназину та 2-оксифеназин-1-карбонової кислоти [10].

У результаті ампліфікації з праймерами до гена *phzD* було отримано фрагмент розміром 620 п. н., що, за літературними даними, відповідає синтезу ферменту (ізохоризматази), який каталізує перетворення амінодеоксіізохоризмату в 3-оксіантранілат [11]. Ці дані вказують на наявність феназинового оперону в геномі штаму *Pseudomonas sp. 2303*.

Також за допомогою HPLC-аналізу встановлена наявність в культуральній рідині *Pseudomonas sp.* 2303 сполуки, молекулярна маса якої (257) відповідала масі високоактивного антифунгального антибіотика піролнітрину. Однак для остаточного підтвердження біосинтезу цієї сполуки штамом *Pseudomonas sp.* 2303 необхідно провести додаткові дослідження з використанням стандарту піролнітрину.

Таким чином, у процесі проведеного скринінгу серед представників роду *Pseudomonas* був відібраний високоактивний щодо різних видів фітопатогенних грибів і бактерій штам *Pseudomonas sp.* 2303. Для цього штаму також була встановлена і його висока альгіцидна активність. Результати молекулярно-генетичного аналізу показали наявність у штаму гена, що кодує один з ключових ферментів синтезу феназину, а HPLC-аналіз виявив, що в культуральній рідині штаму *Pseudomonas sp.* 2303 міститься антибіотична сполука — феназин-1-карбонова кислота. Згідно з отриманими даними, штам *Pseudomonas sp.* 2303 можна розглядати як перспективну основу біопрепаратів для захисту сільськогосподарських рослин і водоймищ від “цвітіння”.

1. *Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory* / Ed. by B. H. A. Rehm. – Weinheim: Wiley-VCH, 2008. – 403 p.
2. Смирнов В. В., Киприанова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Київ: Наук. думка, 1990. – 264 с.
3. Андреюк Е. И., Коптева Ж. П., Занина В. В. Цианобактерии. – Киев: Наук. думка, 1990. – 200 с.
4. Вассер С. П., Кондратьева Н. В., Масюк Н. П. Водоросли. Справочник – Киев: Наук. думка, 1989. – 608 с.
5. Бакаев А. В., Бакаева Е. Н., Игнатова Н. А. “Цветение” сине-зеленых микроводорослей (*Cyanophyta*) – разновидность чрезвычайных ситуаций в водохранилищах // Инж. вестн. Дона. – 2012. – № 4. – (ч. 2). – С. 23–28.
6. Клочко В. В., Зелена Л. Б., Чугунова К. О., Авдеева Л. В. Аналіз феназинового комплексу у штамів *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306 // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології. – 2012. – 4. – С. 358–362.
7. Ownley B. H., Weller D. M., Thomashow L. S. Influence *in situ* and *in vitro* pH on suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2–79 // Phytopathology. – 1992. – 82, No 2. – P. 178–184.
8. Zender A., Gorham P. R. Factors influencing the growth of *Microcystis aeruginosa* // Can. J. Microbiol. – 1960. – 6. – P. 645–660.
9. Пат. 2382075 С1 Россия, МПК С 12 N 1/20. Штамм бактерий *Brevibacillus laterosporus*, подавляющий и предотвращающий развитие планктонных и биопленочных форм микроскопических водорослей в водных системах / Р. Р. Азизбеян, Н. И. Кузнецова, Т. М. Григорьева. – Оpubл. 20.02.2010, Бюл. № 5. – 12 с.
10. Киприанова Е. А., Шепелевич В. В., Клочко В. В., Остапчук А. Н., Варбанец Л. Д., Сковлюк Л. Б., Березкина А. Е., Авдеева Л. В. Антифунгальные и противовирусные вещества штаммов *Pseudomonas chlororaphis subsp. aureofaciens* – компонентов гаупсина // Мікробіол. журн. – 2013. – 75, № 6. – С. 28–35.
11. Феклистова И. Н., Максимова Н. П. Синтез феназиновых соединений бактериями *Pseudomonas aurantiaca* В-162 // Вестн. Белорус. ун-та. Сер. 2. – 2005. – № 2. – С. 66–69.

В. В. Ключко, Л. Б. Зеленая, Е. О. Чугунова, П. М. Царенко,
Л. А. Крючкова, Л. А. Пасичник, Л. В. Авдеева,
академик НАН Украины В. С. Подгорский

Штамм *Pseudomonas* sp. 2303 — активный антагонист фитопатогенов и его антибиотические свойства

В результате скрининга среди штаммов Украинской коллекции микроорганизмов отобран штамм *Pseudomonas* sp. 2303 с высокой антибактериальной и антифунгальной активностью. Зона задержки роста фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens* составляла 18–39 мм; индекс угнетения микромицетов, представителей родов *Fusarium*, *Bipolaris*, *Pythium*, *Gaeumannomyces*, находился в диапазоне 39–51%. Также штамм *Pseudomonas* sp. 2303 характеризовался высокой альгицидной активностью — фугат культуральной жидкости при разведении 1 : 5 угнетал рост цианобактерий *Anabaena variabilis*, *Nostoc linckia* и *Microcystis aeruginosa* на 85–90%. По данным HPLC-анализа в культуральной жидкости *Pseudomonas* sp. 2303 идентифицировано антибиотически активное вещество — феназин-1-карбоновая кислота. Молекулярно-генетический анализ — амплификация с праймерами к гену *phzD* — подтвердил наличие у штамма феназинового оперона. Штамм *Pseudomonas* sp. 2303 можно рассматривать как перспективную основу биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур, а также водоемов от “цветения”.

V. V. Klochko, L. B. Zelena, K. O. Chugunova, P. M. Tsarenko,
L. O. Kryuchkova, L. A. Pasichnyk, L. V. Avdeeva,
Academician of the NAS of Ukraine V. S. Pidgorsky

Pseudomonas sp. strain 2303 as active phytopathogenic antagonist and its antibiotic characteristics

As a result of the screening among strains in the Ukrainian collection of microorganisms, *Pseudomonas* sp. strain 2303 with high antibacterial and antifungal activities was selected. The growth inhibition zone against phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Clavibacter michiganensis*, and *Agrobacterium tumefaciens* was 18–39 mm; the inhibition index against micromycetes belonging to *Fusarium*, *Bipolaris*, *Pythium*, and *Gaeumannomyces* genera ranged from 39 to 51%. *Pseudomonas* sp. strain 2303 was also characterized by a high algicidal activity: cell-free liquid culture (1 : 5 dilution) repressed the growth of cyanobacteria *Anabaena variabilis*, *Nostoc linckia*, and *Microcystis aeruginosa* by 85–90%. HPLC-analysis of *Pseudomonas* sp. 2303 liquid culture revealed the antibiotic active substance — phenazine-1-carboxylic acid. Results of molecular-genetic analysis — amplification with primers to *phzD* gene — suggest that *Pseudomonas* sp. 2303 genome contains phenazine operon. *Pseudomonas* sp. 2303 can be considered as a perspective strain for the development of algicidal preparations and biopreparations to protect crops in agriculture.