

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ ПО ВНЕКЛЕТОЧНОЙ НУКЛЕАЗЕ НА СВОЙСТВА ПИГМЕНТООБРАЗУЮЩЕГО И БЕСПИГМЕНТНОГО ШТАММОВ *SERRATIA MARCESCENS*

© 2016 г. Э. Х. Низамутдинова, Т. В. Ширшикова, А. М. Марданова, М. Р. Шарипова¹, Л. М. Богомольная

Казанский (Приволжский) Федеральный университет

¹E-mail: marsharipova@gmail.com

Поступила в редакцию 02.04.2015 г.

В настоящем исследовании проведена сравнительная характеристика пигментообразующего и беспигментного штаммов *Serratia marcescens* и их мутантов по внеклеточной нуклеазе. Установлено, что у мутантных штаммов уровень накопления биомассы снижался в среднем на 20%, протеолитическая активность в культуральной жидкости уменьшалась в 4–5 раз по сравнению с дикими штаммами. Для штаммов, дефектных по гену внеклеточной нуклеазы, наблюдали повышение порога чувствительности бактерий к активным формам кислорода. Сравнительный анализ подвижности штаммов позволил заключить, что максимальной жгутиковой подвижностью по типу плавания обладали клетки дикого беспигментного штамма, тогда как клетки его мутанта полностью теряли такую способность.

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, продигиозин, протеаза, нуклеаза, мутанты, подвижность, окислительный стресс.

DOI: 10.7868/S0026365616010067

Биологически активные вторичные метаболиты продигиныны синтезируются такими бактериями, как *Serratia marcescens*, *Hahella chejuensis*, *Pseudoalteromonas denitrificans*, *Vibrio* sp., *Pseudomonas magnetrobrua*, *Vibrio psychroerythrou* и др. (Montaner et al., 2000; Kim et al., 2008; Casullode et al., 2010; Boric et al., 2011). Продигиныны используют в текстильной промышленности, косметологии, в токсикологическом тестировании и т.д. (Liu et al., 2013). Среди продуцентов продигинынов бактерии *S. marcescens* характеризуются экспрессией красного пигмента, продигиозина (2-метил-3-пентил-6-метоксипродиגיнина) (Williamson et al., 2006). Эти микроорганизмы встречаются в водоемах, почве, а также взаимодействуют с растениями, насекомыми и животными (Mahlen, 2011). Образование продигиозина регулируется температурой, позитивными и негативными белковыми регуляторами и зависит от фазы роста культуры (Shanks et al., 2013). Кроме синтеза продигиозина энтеробактерии *S. marcescens* способны к секреции различных гидролитических ферментов — хитиназы, протеазы, нуклеазы и липазы. В соответствии со средой обитания *S. marcescens* могут образовывать альтернативные формы жгутиковых клеток, что отражает их способность к разным типам движения в зависимости от условий окружения и механизмов адаптации. В жидкой среде бактерии имеют форму коротких

палочек с несколькими жгутиками, при росте на твердой поверхности они дифференцируются в удлиненные многоядерные, обильно жгутиковые формы, которые роятся на поверхности агара (O'gear et al., 1992). Продигиозин обладает антимикробной активностью и может играть важную роль в конкуренции за экологические ниши (Williamson et al., 2008). Продигиозин также влияет на бактериальную адгезию, которая может иметь важное значение в колонизации бактерий и формировании рН- и энергетического гомеостаза клеток. Таким образом, информация о продигиозине свидетельствует о взаимосвязи его синтеза с ответом *S. marcescens* на различные стрессы (Haddix et al., 2008).

Целью работы являлась сравнительная характеристика пигментированных и беспигментных штаммов *S. marcescens* и их мутантов по внеклеточной нуклеазе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штаммы дикого типа (неродственные изоляты) *S. marcescens* SM6 (образует пигмент) и *S. marcescens* SR41-800 (беспигментный штамм) и их мутанты, дефектные по внеклеточной нуклеазе: — *S. marcescens* SM6-nucA⁻ и *S. marcescens* TT392 соответственно. Все штаммы,

пигментированный штамм дикого типа *S. marcescens* SM6 и его мутантный штамм SM6-*nucA*⁻ с дефектным геном внеклеточной нуклеазы, беспигментный штамм *S. marcescens* SR41-8000 и его мутант *S. marcescens* TT392 с дефектным геном внеклеточной нуклеазы, получены из лаборатории проф. М. Бенедика (Университет Техаса, США), мутации локализованы в структурном гене *nucA* (Hines et al., 1988). Мутантный штамм *S. marcescens* SM6-*nucA*⁻, как и соответствующий ему штамм дикого типа *S. marcescens* SM6, образует пигмент продигиозин. Мутантный штамм *S. marcescens* TT392 чувствителен к ампициллину (Ap^r) и канамицину (Km^r) и не выделяет пигмента.

Бактерии культивировали в среде LB (Luria Bertani) (Sambrook et al., 1989) в колбах при соотношении среды к объему колбы 1 : 5 на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об./мин при температурах 30 и 37°C. Для определения подвижности штаммы выращивали на среде LB при 30°C. Посевным материалом служил 18-часовой инокулят.

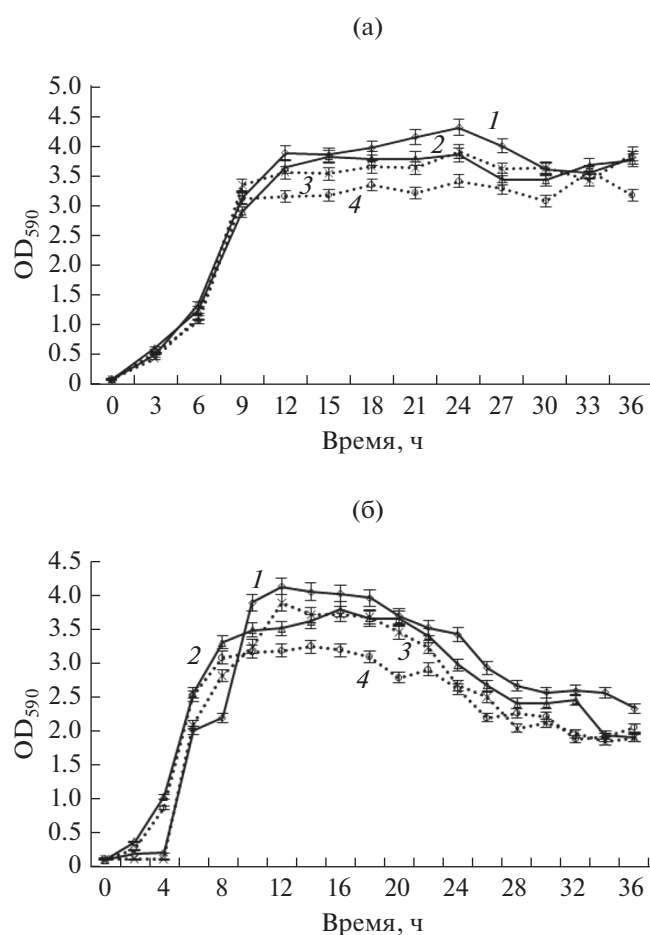


Рис. 1. Динамика роста в среде LB штаммов *S. marcescens*: SM6 (1), SR41-8000 (2), SM6-*nucA*⁻ (3) и TT392 (4) в среде LB: (а) при 30°, (б) при 37°C.

Оптическую плотность культуры измеряли на спектрофотометре Mark Microplate Spectrophotometer (Bio-Rad, США) при длине волны 590 нм.

Протеолитическую активность определяли с субстратом азаказеином по методу (Sabirowa et al., 2010) при использовании спектрофотометра (Bio-Rad, США) при длине волны 450 нм. За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мкг субстрата за 1 мин в пересчете на 1 мл ферментного раствора.

Активность рибонуклеазы определяли по продуктам гидролиза РНК, растворимым в 4% HClO₄, с 12% уранилацетатом (Лещинская с соавт., 1980). За единицу активности принимали количество фермента, которое вызывало увеличение E₂₆₀ на 1 опт. ед. в пересчете на 1 мл ферментного раствора за 1 ч инкубации. Скрининг РНКазной активности у штаммов-трансформантов проводили на чашках с идентификационной средой, содержащей раствор РНК (2 мг/мл) и краситель толуидиновый синий (0.001%) (Лещинская с соавт., 1980).

Подвижность клеток определяли, измеряя диаметр колоний бактерий при росте на среде LB с 0.25% агаром при температуре 37°C и 30°C (Kida et al., 2007). 12-Часовые культуры с нормализованной оптической плотностью инокулировали на поверхность свежеприготовленного агара в центр чашки Петри в количестве 3 мкл. Диаметр колоний определяли через каждые 1–2 ч культивирования.

Чувствительность бактерий *S. marcescens* к перекиси водорода изучали по ингибированию роста в среде LB, в которую перед посевом инокулята добавляли H₂O₂ до конечной концентрации от 0.5 до 10 мМ. Инокулят вносили в количестве 1% от объема среды. В течение 5–6 ч измеряли оптическую плотность культуры с интервалом 1 ч.

Математическую обработку результатов проводили в программной среде "Microsoft Excel" путем расчета средноквадратичного отклонения (σ). Результаты считали достоверными при σ ≤ 10%. При расчете достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая P ≤ 0.05 за достоверный уровень значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При культивировании энтеробактерий температура является важным фактором для характеристики роста. Сравнительное исследование динамики роста штаммов *S. marcescens*, образующих и не образующих пигмент продигиозин, а также их мутантов по внеклеточной нуклеазе в среде LB проводили при разных температурах культивирования: 30 и 37°C (рис. 1). При повышении температуры культивирования до 37°C через 20 ч роста наступала фаза отмирания у всех четырех штам-

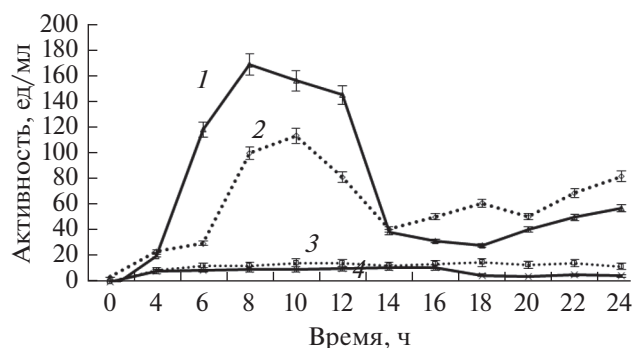


Рис. 2. Нуклеазная активность штаммов *S. marcescens*: SM6 (1), SR41-8000 (2), SM6-nucA⁻ (3), TT392 (4).

мов, тогда как при выращивании бактерий при 30°C стационарная фаза была пролонгирована. Установлено, что уровень накопления биомассы мутантных штаммов, дефектных по гену внеклеточной нуклеазы, снижался по сравнению с соответствующими исходными штаммами в среднем на 20%.

Исследовали штаммы дикого типа и их мутанты на способность к секреции нуклеазы. Нуклеазную активность в культуральной жидкости *S. marcescens* обнаружили у штаммов дикого типа в количестве до 110 ед/мл, у мутантов уровень активности резко понижался и составил меньше 15 ед/мл. У штаммов дикого типа фермент появлялся в среде, начиная с 4 ч роста, и уровень активности достигал максимума уровня на 8–10-й ч культивирования (рис. 2), что соответствовало стадии замедления роста культуры и перехода в стационарную фазу роста. Таким образом, инактивация гена *nucA* в обоих штаммах приводила практически к полному ингибированию внеклеточной нуклеазной активности.

Наряду с внеклеточной нуклеазой исследовали способность штаммов дикого типа и мутантов *S. marcescens* секретировать другой внеклеточный фермент – протеазу. По данным литературы, бактерии *S. marcescens* секретируют металлопротеазу сerratизин (Kida et al., 2007). Максимальной протеолитической активностью обладал дикий пигментированный штамм *S. marcescens* SM6. Протеолитическую активность обнаружили в среде через 3 ч культивирования, максимальный уровень активности достигался через 15 ч роста бактерий и сохранялся на протяжении 36 ч культивирования (рис. 3). Мутантный штамм SM6-nucA⁻ с инактивированным геном нуклеазы продуцировал фермент с меньшей эффективностью, уровень протеазы в среде снижался вдвое. Беспигментный штамм дикого типа *S. marcescens* SR41-8000 характеризовался более низкой внеклеточной протеолитической активностью, ее

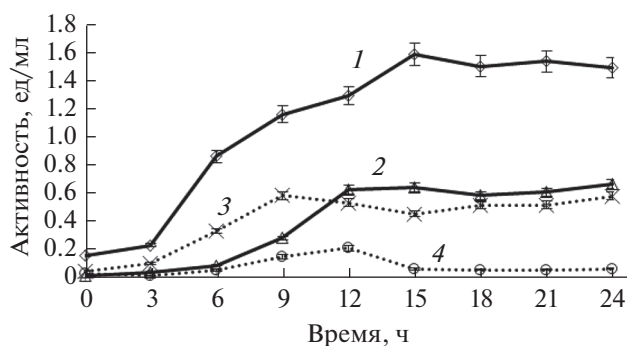


Рис. 3. Протеолитическая активность штаммов *S. marcescens*: SM6 (1), SR41-8000 (2), SM6 nucA⁻ (3), TT392 (4).

максимальный уровень был вдвое ниже уровня активности пигментообразующего штамма дикого типа (рис. 3а). Для различных штаммов *S. marcescens* характерна штамм-специфичная вариабельность синтеза продигиозина, образования фимбрий и других свойств, регуляция которых может существенно варьировать, что усложняет анализ бактериальных фенотипов (Stella et al., 2014). В связи с этим, сложно оценить у штаммов дикого типа корреляцию синтеза продигиозина и внеклеточной протеазы. В нашей работе показано, что у беспигментного мутантного штамма TT392 протеолитическая активность в среде практически отсутствовала в течение всего периода культивирования (рис. 3б). Таким образом, у мутантов, дефектных по гену нуклеазы, снижался уровень протеолитической активности, причем, более резко у мутанта беспигментного штамма.

Окислительный стресс оказывает негативное влияние на рост и развитие бактерий (Imlay, 2011). Микроорганизмы обладают механизмами защиты от активных форм кислорода и перекиси водорода (частично восстановленной формы кислорода), которые образуются *in vivo* как побочные продукты аэробного метаболизма. Исследовали чувствительность пигментных и беспигментных штаммов *S. marcescens* и их мутантов к перекиси водорода. Для подбора оптимальной концентрации H₂O₂, ингибирующей рост и не вызывающей гибели культуры дикого штамма SM6, вносили в среду одновременно с инокулятом перекись водорода в конечной концентрации 0.5, 1.0, 5.0 и 10.0 мМ. Измерения оптической плотности культуры проводили в течение 5–6 ч. Перекись водорода является неустойчивым соединением и в растворах самопроизвольно разлагается на H₂O и O₂. Как видно из рис. 4, присутствие перекиси водорода в среде приводит к пролонгированию лаг-фазы роста бактерий. Максимальное ингибирование роста *S. marcescens* SM6 обнаружили при внесении в среду 10 мМ

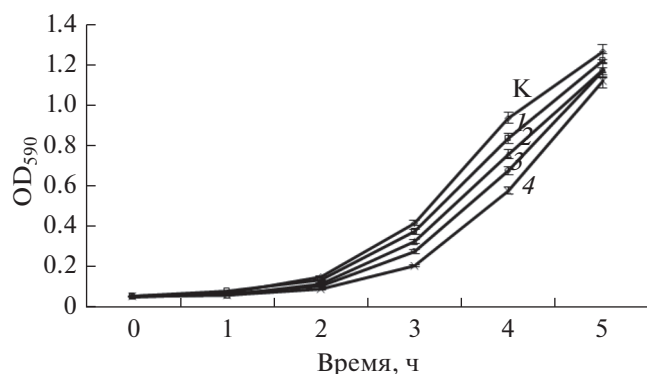


Рис. 4. Рост *S. marcescens* SM6 в среде LB в присутствии 0.5 мМ (1), 1 мМ (2), 5 мМ (3) и 10 мМ (4) перекиси водорода. К – контроль (рост культуры в среде LB).

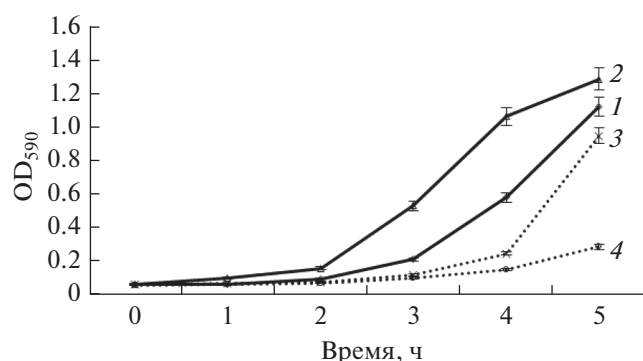


Рис. 5. Накопление биомассы по показателям OD₅₉₀ штаммов: *S. marcescens* SM6 (1), SM6-nucA⁻ (2) SR41-8000 (3), и TT392 (4) в среде LB в присутствии 10 мМ перекиси водорода на 5 ч культивирования.

H₂O₂ и ингибиторный эффект проявлялся через 3–4 ч роста. Через 5 ч культивирования различия в оптической плотности бактерий SM6, растущих при разных концентрациях H₂O₂, уменьшалось, и значения оптической плотности приближались к контрольным (рост в среде LB). По-видимому, это связано со снижением концентрации перекиси водорода в среде в результате ее разложения.

Для сравнительных исследований чувствительности разных штаммов *S. marcescens* к перекиси водорода использовали ее конечную концентрацию в среде 10 мМ. Исследуемые штаммы *S. marcescens* различались по чувствительности к перекиси водорода. Наиболее выражена разница в чувствительности между штаммом *S. marcescens* SR41-8000 и его мутантом TT392 (рис. 5). Мутантный штамм *S. marcescens* TT392 практически полностью терял способность к росту в условиях окислительного стресса: накопление биомассы снижалось более чем в 4 раза. Мутант пигментообразующего штамма *S. marcescens* показал более высокую устойчивость к перекиси водорода: оп-

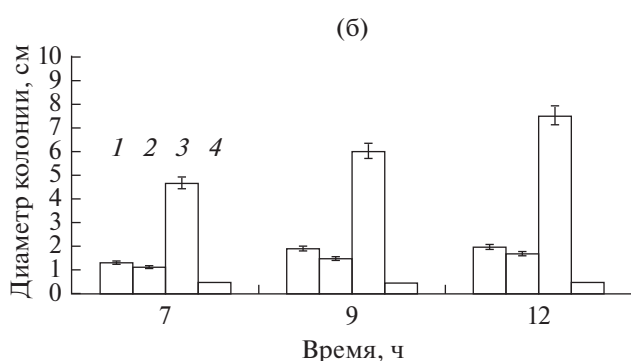
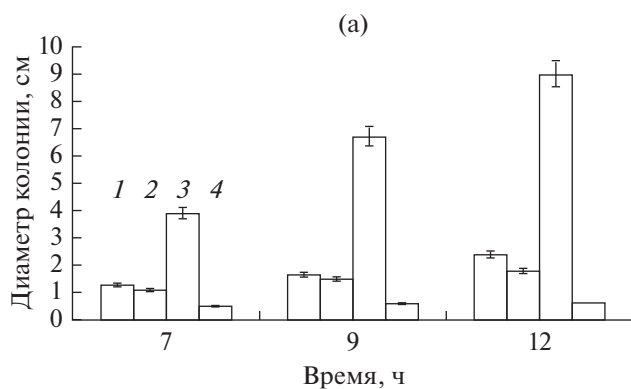


Рис. 6. Диаметр колоний *S. marcescens*: SM6 (1), SM6-nucA⁻ (2), SR41-8000 (3) и TT392 (4) при росте бактерий при 30°C (а) и при 37°C (б) в среде LB, содержащей 0.25% агара, на 7, 9, 12 ч культивирования.

тическая плотность культуры снизилась по сравнению со штаммом дикого типа в 1.3 раза (рис. 5). По-видимому, образование пигмента продигозина взаимосвязано с механизмом устойчивости к условиям окислительного стресса. Имеются данные, что образование продигозина негативно влияет на продукцию АТФ и может защищать клетки от окислительного стресса путем ограничения продукции активных форм кислорода (Haddix et al., 2008).

Способность дифференцироваться в соответствующие типы клеток для адаптации к новым условиям окружения является особенностью энтеробактерий. При выращивании в жидкой среде *S. marcescens* передвигаются по типу “плавания” (Alberti, Harshey, 1990). Установлено, что жгутиковой подвижностью по типу плавания (на среде LB с 0.25% агара) обладал дикий непигментированный штамм *S. marcescens* SR41-8000: диаметр колоний через 12 ч культивирования при 30°C достигал 9 см, а при 37°C – 7.5 см. Мутант TT392 полностью терял способность к плаванию: при обеих температурах диаметр колонии на 12 ч роста не превышал 0.5–0.7 см (рис. 6, 7). Пигментообразующий штамм *S. marcescens* SM6 обладал

меньшей подвижностью в тех же условиях. Диаметр его колонии к 12 ч роста достигал 2.4 и 2.0 см при 30 и 37°C, соответственно. Мутантный штамм SM6-писА⁻ терял подвижность на 10–15% по сравнению с диким штаммом при обеих температурах культивирования. Таким образом способность к жгутиковой подвижности по типу плавания более выражена для беспигментного дикого штамма, мутации в гене нуклеазы снижали эту способность.

В проведенном исследовании путем сравнительного анализа пигментобразующих и беспигментных штаммов *S. marcescens* и их мутантов по внеклеточной нуклеазе нами установлено, что у мутантов снижались уровень накопления биомассы, протеолитическая активность, подвижность клеток, устойчивость к активным формам кислорода. В настоящее время показано, что такие свойства *S. marcescens* как подвижность, клеточная дифференцировка и синтез внеклеточных гидролаз, в частности, нуклеазы, регуляторно взаимосвязаны и контролируются такими регуляторами транскрипции, как FlhD/FlhC, cAMP-CRP и HesS (Liu et al., 2000; Tanikawa et al., 2000; Stella et al., 2014). По-видимому, нарушение в гене нуклеазы может прямо или опосредованно влиять и на другие характеристики бактерий, описанные в работе.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований РФФИ 15-04-02110.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Лещинская И.Б., Балабан Н.П., Капранова М.Н., Голубенко И.А. Современные методы изучения нуклеиновых кислот и нуклеаз микроорганизмов. Казань: Изд-во КГУ, 1980. 118 с.
- Alberti L., Harshey R.M. Differentiation of *Serratia marcescens* 274 into swimmer and swarmer cells // J. Bacteriol. 1990. V. 172. № 8. P. 4322–4328.
- Boric M., Danevčič T., Stopar D. Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379; a new UV-protective pigment // Microb. Ecol. 2011. V. 62. № 3. P. 528–536.
- Casullode H.W., Fukushima K., Takaki G.M. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable resources as a low cost substrate // Molecules. 2010. V. 15. № 10. P. 6931–6940.
- Haddix P.L., Jones S., Patel P., Burnham S., Knights K., Powell J.N., LaForm A. Kinetic analysis of growth rate, ATP, and pigmentation suggests an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens* // J. Bacteriol. 2008. V. 190. № 22. P. 7453–7463.
- Hines D.A., Saurugger P.N., Ihler G.M., Benedik M.J. Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens* // J. Bacteriol. 1988. V. 170. № 9. P. 4141–4146.
- Imlay J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide // Ann. Rev. Biochem. 2011. V. 77. P. 755–776.
- Kida Y., Inoue H., Shimizu T., Kuwano K. *Serratia marcescens* serralysin induces inflammatory responses through protease-activated receptor 2 // Infect. Immun. 2007. V. 75. № 1. P. 164–174.
- Kim S.J., Lee H.K., Lee Y.K., Yim J.H. Mutant selection of *Hahella chejuensis* KCTC 2396 and statistical optimization of medium components for prodigiosin yield-up // J. Microbiol. 2008. V. 46. № 2. P. 183–188.
- Liu J.H., Lai M.J., Ang S., Shu J.C., Soo P.C., Horng Y.T., Yi W.C., Lai H.C., Luh K.T., Ho S.W., Swift S. Role of flhDC in the expression of the nuclease gene nucA, cell division and flagellar synthesis in *Serratia marcescens* // J. Biomed. Sci. 2000. V. 7. № 6. P. 475–483.
- Liu X., Wang Y., Sun S., Zhu C., Xu W., Park Y., Zhou H. Mutant breeding of *Serratia marcescens* strain for enhancing prodigiosin production and application to textiles // Prep. Biochem. Biotechnol. 2013. V. 43. № 3. P. 271–284.
- Mahlen S.D. *Serratia* infections: from military experiments to current practice // Clin. Microbiol. Rev. 2011. V. 24. № 4. P. 755–791.
- Montaner B., Navarro S., Pique M., Vilaseca M., Martinell M., Giralt E., Gil J., Perez-Tomas R. Prodigiosin from supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines // Br. J. Pharmacol. 2000. V. 131. № 3. P. 585–593.
- O'rear J., Alberti L., Harshey R.M. Mutations that impair swarming motility in *Serratia marcescens* 274 include but free not limited to those affecting chemotaxis or flagellar function // J. Bacteriol. 1992. V. 174. № 19. P. 6125–6137.
- Sabirova A.R., Rudakova N.L., Balaban N.P., Il'inskaya O.N., Demiduyk I.V., Kostrov S.V., Rudenskaya G.N., Sharipova M.R. A novel secreted metzincin metalloproteinase from *Bacillus intermedius* // FEBS Lett. 2010. V. 584. № 21. P. 4419–4425.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
- Shanks R.M., Lahr R.M., Stella N.A., Arena K.E., Brothers K.M., Kwak D.H., Liu X., Kalivoda E.J. A *Serratia marcescens* PigP homolog controls prodigiosin biosynthesis, swarming motility and hemolysis and is regulated by cAMP-CRP and HexS // PLoS One. 2013. V. 8. № 3. e57634.
- Stella N.A., Shanks R.M. Cyclic-AMP inhibition of fimbriae and prodigiosin production by *Serratia marcescens* is strain-dependent // Arch. Microbiol. 2014. V. 196. № 5. P. 323–330.
- Tanikawa T., Nakagawa Y., Matsuyama T. Transcriptional downregulator hexS controlling prodigiosin and serrawettin W1 biosynthesis in *Serratia marcescens* // Microbiol. Immunol. 2006. V. 50. № 8. P. 587–596.
- Williamson N.R., Fineran P.C., Leeper F.J., Salmond G.P. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines // Nat. Rev. Microbiol. 2006. V. 4. № 12. P. 887–899.
- Williamson N.R., Fineran P.C., Ogawa W., Woodley L.R., Salmond G.P. Integrated regulation involving quorum sensing, a two-component system, a GGDEF/EAL domain protein and a post-transcriptional regulator controls swarming and RhlA-dependent surfactant biosynthesis in *Serratia* // Environ. Microbiol. 2008. V. 10. № 5. P. 1202–1217.

Effect of Mutations in Extracellular Nuclease on the Characteristics of the Pigmented and Nonpigmented *Serratia marcescens* Strains

E. Kh. Nizamutdinova, T. V. Shirshikova, A. M. Mardanova,
M. R. Sharipova*, and L. M. Bogomol'naya

Kazan Federal University, Kazan, Russia

*e-mail: marsharipova@gmail.com

Received April 2, 2015

Abstract—Comparative characterization of the pigmented and nonpigmented *Serratia marcescens* strains and their extracellular nuclease mutants was carried out. Biomass accumulation by the mutant strains decreased on average by 20%, while proteolytic activity of the culture liquid was 4–5 times lower than in the case of the wild type strains. The mutants with impaired extracellular nuclease genes exhibited higher sensitivity to reactive oxygen species. Comparative analysis of motility of the strains revealed the highest flagellar activity in the wild type nonpigmented strain, while the cells of its mutant completely lost this feature.

Keywords: *Serratia marcescens*, prodigiosin, protease, nuclease, mutants, motility, oxidative stress