

УДК 579.22+579.083.13

**БИОСИНТЕЗ ПИГМЕНТОВ У АКТИНОБАКТЕРИЙ *Agreia*
В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ**

*Е.Г. Глазунова, Д.Р. Яруллина, И.Ю. Васильев,
М.Н. Гаврилова, О.Н. Ильинская*

Аннотация

В работе исследованы закономерности роста и пигментообразования у биотехнологически важных актинобактерий *Agreia*, пигмент которых предложен нами к использованию в качестве топливного маркера. Подобраны условия культивирования продуцента, установлен оптимум продукции биомаркера: максимальный выход целевого продукта наблюдается на 72-й ч роста на коринебактериальном агаре. Рост бактерий на жидких средах не индуцировал пигментообразование, хотя аэрация способствовала накоплению биомассы. Освещение не влияло на образование пигмента, следовательно, технология получения биомаркера может быть удешевлена за счет выращивания бактерий-продуцентов в темноте.

Ключевые слова: актинобактерии *Agreia*, пигмент, спектр поглощения, динамика роста, аэрация, освещение, состав питательной среды.

Введение

Натуральные пигменты широко используются в производстве пищевых продуктов, текстиля, косметики и в медицине, при этом в качестве источников таких веществ часто выступают микроорганизмы: бактерии, микроскопические водоросли и грибы. Практическое применение находят как собственно красящая способность микробных пигментов, так и присущие этим веществам антиканцерогенная, иммуносупрессорная и антибиотическая активности [1]. Например, пигмент *Serratia marcescens* продигиозин предложено использовать в качестве красителя для полимеров [2]. С другой стороны, благодаря апоптотической активности в отношении раковых клеток микробный продигиозин и продигиозин-подобные пигменты рассматривают как новое семейство противоопухолевых лекарственных препаратов [3]. Разработан способ использования продигиозина для маркирования нефтепродуктов. Поскольку пигмент хорошо растворим в различных марках топлива, а его микроконцентрации легко обнаруживаются по характерному спектру поглощения, рекомендовано добавлять его в бензин для мониторинга качества последнего [4]. Нами показано, что пигменты бактерий рода *Agreia* также могут выступать в качестве топливных биомаркеров [5].

Род *Agreia* представляет собой недавно открытый и пока слабо охарактеризованный таксон актинобактерий и включает всего два вида микроорганизмов: *A. bicolorata* [6] и *A. pratensis* [7]. Представители первого вида были впервые изолированы из растительных галлов, индуцированных фитопатогенными нематодами [6, 8], второй вид также выделен из растительного материала [9].

Клетки имеют форму неправильных палочек и не образуют спор. Колонии бактерий *Agreia* окрашены в желтый цвет у молодых культур и в красно-оранжевый – у старых [10]. Для нескольких представителей этого рода показано, что их пигменты относятся к C_{40} -каротиноидам, а также выяснен метаболический путь образования данного вторичного метаболита [11], однако закономерности биосинтеза пигмента не охарактеризованы. В настоящей статье исследовано влияние времени инкубирования, состава питательной среды, светового режима и аэрации на биосинтез пигмента у бактерий рода *Agreia*. По данным проведенного экспериментального исследования максимальный биосинтез целевого микробного продукта – основы биомаркера для топлив – происходит на 72-й ч роста на коринебактериальном агаре, при этом освещение не оказывает влияния на рост и пигментацию бактерий.

1. Материалы и методы исследования

В работе использовали актинобактерии *Agreia* из Всероссийской коллекции микроорганизмов (табл. 1). Бактерии выращивали 24-й, 48-й или 72-й ч при 28 °С на среде Гаузе, пептонно-дрожжевой среде (жидкой – ПДС и плотной – ПДА), коринебактериальной среде (жидкой – КБС и плотной – КБА) [11] и модифицированной КБА, в которой казеин-пептон и дрожжевой экстракт заменены на 10–100%-ные водные растворы отхода спиртового производства – барды. Образцы, инкубируемые при постоянном освещении, облучали лампой накаливания (60 Вт) с расстояния 40–60 см. На ПДС и КБС бактерии инкубировали на качалке при 180 об./мин, после чего клетки осаждали центрифугированием и отмывали от среды 0.1 М раствором NaCl. Клетки, выросшие на плотной среде, собирали шпателем и отмывали вышеописанным способом. Биомассу определяли по оптической плотности (ОП) суспензии отмывтых от среды клеток при 590 нм. Пигменты экстрагировали из клеток, как описано в [5], с помощью смеси *n*-гексан : этанол (1 : 2), затем разделяли фракции центрифугированием и супернатант упаривали досуха. Из получившегося кристаллического пигмента готовили растворы в гексане, которые анализировали на спектофотометре СФ 2000 и на ФЭК в характерной для данного пигмента области поглощения 450–600 нм. Количество пигмента выражали в виде отношения ОП₅₄₀ к биомассе.

2. Результаты и их обсуждение

Способность образовывать окрашенные колонии – важный фенотипический признак представителей рода *Agreia*, однако закономерности биосинтеза пигментов, а также их функции у этих нефотосинтезирующих бактерий не ясны. Перспектива применения пигментов актинобактерий для маркировки нефтепродуктов актуализирует задачу подробного анализа процесса биосинтеза пигментов у данной группы микроорганизмов, поскольку позволит оптимизировать получение биотехнологически важных веществ.

На первом этапе работы сравнили биосинтез пигментов у ряда штаммов *Agreia*. Клетки *A. bicolorata* Ac-1375, *A. bicolorata* Ac-1804^T и *Agreia* sp. Ac-2052 содержат оранжевый пигмент, детектируемый нефелометрически по поглощению

Табл. 1

Биосинтез оранжевого пигмента штаммами актинобактерий*

№	Штамм	ОП ₅₄₀
1	<i>Agreia pratensis</i> Ac-2510 ^T	0.01 ± 0.004
2	<i>Agreia bicolorata</i> Ac-1375	11.20 ± 0.110
3	<i>Agreia bicolorata</i> Ac-1804 ^T	3.28 ± 0.010
4	<i>Agreia bicolorata</i> Ac-1805	0.05 ± 0.007
5	<i>Agreia</i> sp. Ac-1783	0.03 ± 0.005
6	<i>Agreia</i> sp. Ac-2052	3.12 ± 0.015

* Экстракцию пигмента проводили из бактерий, выращенных на КБА при 28 °С в течение 72 ч. Образцы не отличаются по содержанию биомассы. Представлена ОП раствора пигмента в гексане.

Табл. 2

Биосинтез оранжевого пигмента на различных питательных средах у актинобактерий *Agreia* *

№	Штамм	ОП ₅₄₀			
		КБА	КБС	ПДА	ПДС
1	<i>Agreia bicolorata</i> Ac-1375	2.39 ± 0.073	0.13 ± 0.010	0.59 ± 0.014	0.06 ± 0.005
2	<i>Agreia bicolorata</i> Ac-1804 ^T	0.91 ± 0.018	0.18 ± 0.010	0.44 ± 0.011	0.09 ± 0.007
3	<i>Agreia</i> sp. Ac-2052	2.35 ± 0.061	0.15 ± 0.010	0.68 ± 0.017	0.23 ± 0.010

* Экстракцию пигмента проводили из бактерий, выращенных при 28 °С в течение 72 ч. Образцы не отличаются по содержанию биомассы. Представлена ОП раствора пигмента в гексане.

при 540 нм (табл. 1). Колонии *A. bicolorata* Ac-1805, *A. pratensis* Ac-2510^T и *Agreia* sp. Ac-1783 окрашены в желтый цвет, поэтому поглощение света с λ 540 нм для растворов пигментов этих штаммов было незначительным. Ранее мы показали возможность детекции в топливе оранжевого пигмента *A. bicolorata* Ac-1375 [5], тогда как желтые пигменты актинобактерий *Agreia* не определяются спектрофотометрически в бензине. Поэтому сравнение биосинтеза пигмента на различных питательных средах мы провели для трех штаммов, продуцирующих оранжевый пигмент (табл. 2). Оказалось, что клетки интенсивно образуют пигмент при росте на КБА, менее ярко окрашенные колонии образуются на ПДА. У клеток, выращенных на агаризованной среде Гаузе и жидких средах КБС и ПДС, пигменты не образовывались или присутствовали в незначительном количестве. Полученные результаты указывают на то, что биосинтез пигментов у исследуемых бактерий *Agreia* детерминирован составом питательной среды, однако аэрация и инсоляция также имеют существенное значение. Эти предположения далее мы исследовали более подробно.

При промышленном получении того или иного биопродукта существенные затраты вызваны питательной средой для выращивания организма-продуцента. Перспективным приемом к сокращению этих расходов является замена дорогостоящих компонентов субстрата отходами сельскохозяйственного производства. Поэтому мы предприняли попытку заменить казеин-пептон и дрожжевой экстракт в КБА на 10–100%-ный водный раствор барды – отхода спиртового производства. Ранее было показано, что пигментированные колонии лучше растут на среде с низким содержанием пептона [12], в частности, у *Pseudoalteromonas*

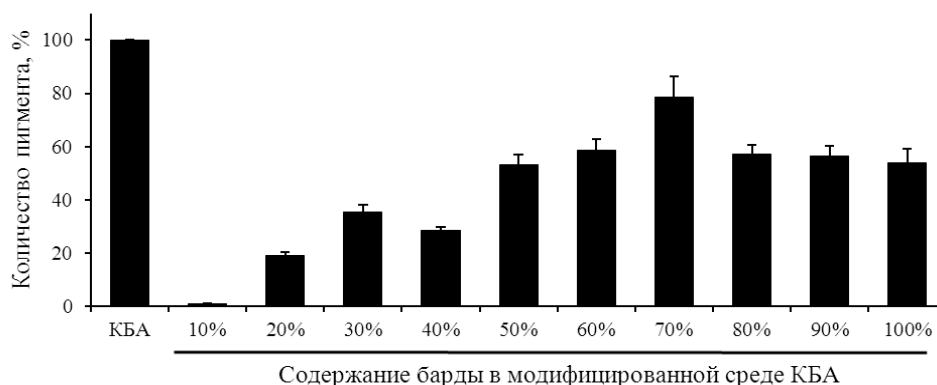


Рис. 1. Содержание пигмента в бактериях *A. bicolorata* Ac-1375 при росте на среде КБА, в которой казеин-пептон и дрожжевой экстракт заменены на 10–100%-ные водные растворы отхода спиртового производства – барды. За 100% принята продуктивность биосинтеза пигмента на полноценной среде КБА

tunicata D2 образование каротиноидов ингибируется на богатых органикой питательных средах [13]. Тем не менее модификация питательной среды бардой привела к снижению биосинтеза пигментов у *A. bicolorata* Ac-1375 (рис. 1), и признана нецелесообразной.

К известным функциям каротиноидов у бактерий относятся фотопротекторный и антиоксидантный эффекты [14, 15]. Мы оценили влияние аэрации и освещения на рост бактерий *A. bicolorata* Ac-1375 на жидкой среде КБС. При росте на жидкой среде КБС образование пигментов у *Agreia* не происходило (табл. 2), хотя на идентичной по составу плотной среде КБА вырастали окрашенные колонии. Это может быть вызвано различиями в концентрации молекулярного кислорода и интенсивности освещения клеток в чашках по сравнению с колбами. Проведенный анализ биосинтеза пигмента при росте на КБС показал, что образование пигмента не происходит в течение всего времени инкубирования независимо от освещения и аэрации (типичный спектр поглощения пигмента из клеток, выросших на КБС, представлен на рис. 3, д). При этом мы обнаружили, что аэрация стимулирует рост культуры в течение первых 48 ч инкубирования. Так, на 24-й ч роста в образцах, инкубируемых на шейкере, урожай клеток в 2 раза превосходил таковой в образцах, выращиваемых без перемешивания. О бактериях рода *Agreia* известно, что они аэробные и нефотосинтезирующие [10], однако тип их метаболизма детально не изучен. Стимуляция их роста молекулярным кислородом указывает на то, что энергетический метаболизм у *Agreia* основан на окислительном фосфорилировании. Активно растущие в присутствии кислорода культуры быстрее стареют, и с 48-го по 72-й ч инкубирования концентрация клеток в них, находящихся в стадии отмирания, равна таковой в пробах, выращиваемых без перемешивания (рис. 2). Освещение культур не влияло на динамику их роста (рис. 2). Можно предположить, что функция пигментов у *A. bicolorata* Ac-1375 не связана ни с защитой от окислительного стресса, ни с фотопротекторными свойствами.

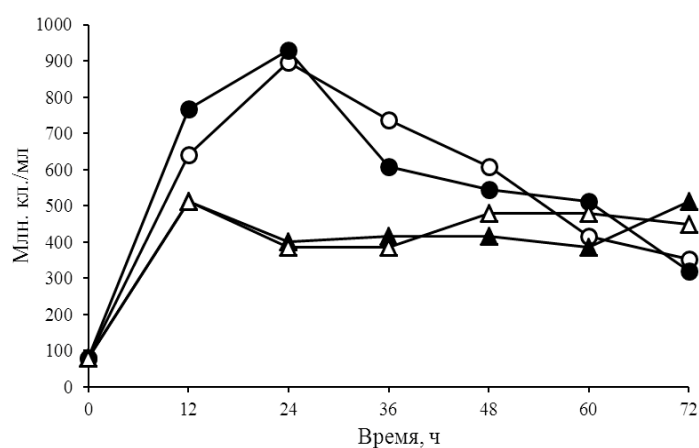


Рис. 2. Динамика роста культуры *A. bicolorata* Ac-1375, инкубируемой при 28 °С на среде КБС при постоянном освещении (светлые маркеры) и в темноте (темные маркеры), при перемешивании 180 об./мин (круглые маркеры) и без аэрации (треугольные маркеры)

Предположение о том, что пигменты не участвуют в светозависимых процессах у актинобактерий, подтверждено в проведенном нами исследовании влияния освещения на динамику образования пигмента в клетках *A. bicolorata* Ac-1375 при росте на КБА (рис. 3). Освещение не влияло на рост клеток (рис. 3, а) и не индуцировало образование пигмента. Напротив, у бактерий, инкубируемых в темноте, биосинтез пигмента происходил более интенсивно по сравнению с чашками, экспонированными свету (рис. 3, в, г). Распространенное мнение об универсальной фотопротекторной роли каротиноидов у прокариот должно быть пересмотрено в силу того, что подтверждающие это утверждение данные немногочисленных исследований, проведенных для нефотосинтезирующих бактерий [16–20], сегодня дополняются все новыми свидетельствами иных функций каротиноидов у хемотрофных микроорганизмов [21].

Замечено, что яркость окраски колоний актинобактерий увеличивается по мере старения культуры [10]. Действительно, как можно судить по спектрам поглощения (рис. 3, б–г), содержание пигментов в клетках *A. bicolorata* Ac-1375 увеличивается с возрастом культуры.

Результаты проведенных исследований вносят существенный вклад в разработку биотехнологии получения оранжевого пигмента бактерий *A. bicolorata* Ac-1375 для использования его в качестве маркера нефтепродуктов. Мы показали, что из протестированных питательных сред (Гаузе, ПДС, ПДА, КБС, КБА, модифицированная среда КБА, содержащая барду) наиболее интенсивно биосинтез пигмента происходит на КБА, причем количество пигмента увеличивается пропорционально возрасту культуры. Освещение и аэрация не индуцируют образование пигмента у исследованных микроорганизмов. Это позволяет выращивать бактерии-продуценты в темноте, что существенно удешевляет технологию получения биомаркера. Установленный факт индукции пигментообразования у бактерий рода *Agreia* при росте на твердой питательной среде, возможно, связан с необходимостью внутриколониальных межклеточных контактов и заслуживает детального изучения.

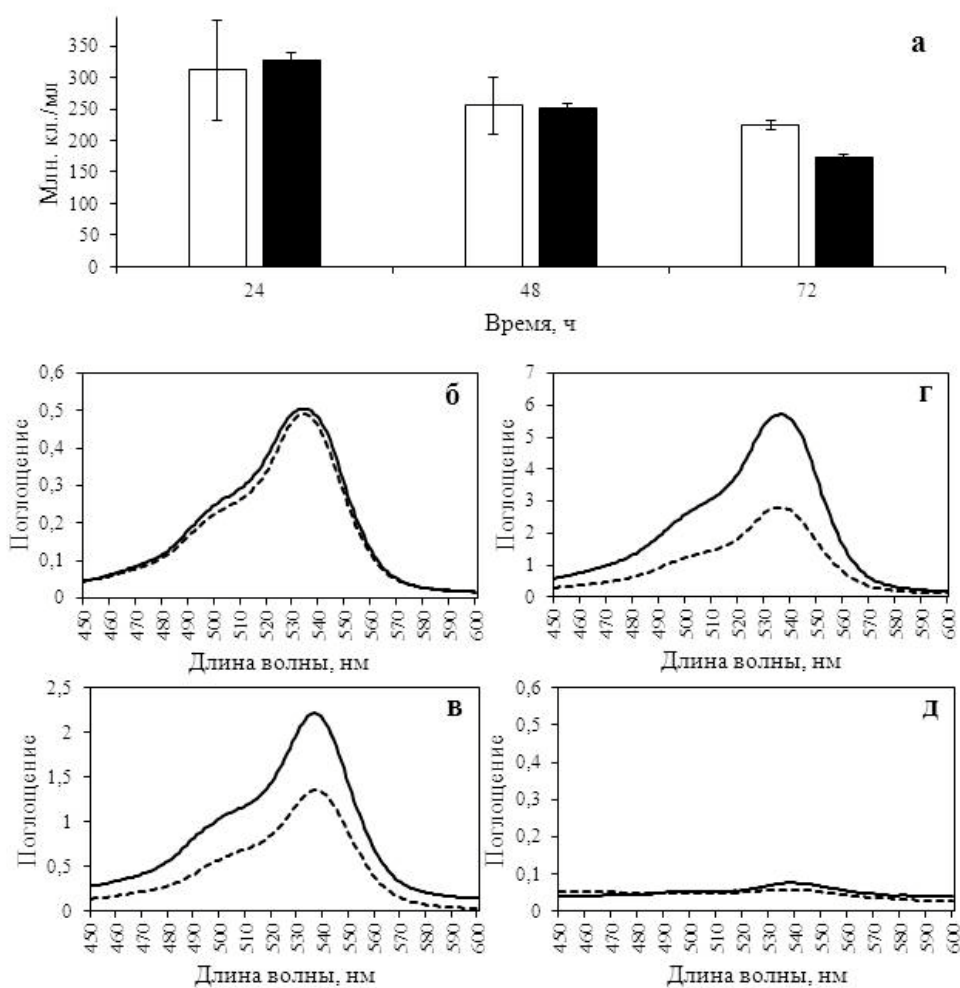


Рис. 3. Динамика образования пигмента культурой *A. bicolorata* Ac-1375 при росте на среде КБА при освещении и в темноте: *а* – биомасса *A. bicolorata* Ac-1375, выросшая на КБА при освещении (светлые столбцы) и в темноте (темные столбцы) на 24-й, 48-й и 72-й ч инкубирования; *б–г* – спектры поглощения пигмента, экстрагированного из биомассы *A. bicolorata* Ac-1375 на 24-й (*б*), 48-й (*в*) и 72-й ч (*г*) роста; *д* – спектры поглощения пигмента, экстрагированного из биомассы *A. bicolorata* Ac-1375, выращенной в течение 72 ч на среде КБС при освещении и в темноте. Спектры сняты в 96%-ном этаноле. Пунктирная линия – пигмент из клеток, выросших на свету, сплошная линия – пигмент из клеток, выросших в темноте

Авторы выражают благодарность Л.В. Дорофеевой (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино) за предоставленные штаммы актинобактерий.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (номер заявки 2012-1.4-12-000-1001-006, соглашение № 14.А18.21.0185).

Summary

E.G. Glazunova, D.R. Yarullina, I.Yu. Vasilev, M.N. Gavrilova, O.N. Ilinskaya. Effects of Cultivation Conditions on Pigment Biosynthesis in Actinobacteria *Agreia*.

The paper studies growth patterns of and pigment production in biotechnologically significant actinobacteria *Agreia*. We have earlier suggested using their pigment as a biomarker for fuels. The conditions for the producer incubation have been selected, and the optimum of the biomarker production has been determined. Maximum biosynthesis of the desired product has been observed at the 72th hour of growth on the corynebacterial agar. The culturing in liquid media has not induced pigment formation although aeration has promoted the accumulation of biomass. Lightening has not influenced pigment formation; therefore, the cost of the biomarker production can be significantly reduced through incubation in the dark.

Key words: actinobacteria *Agreia*, pigment, absorption spectrum, growth dynamics, aeration, lightening, medium composition.

Литература

1. *Ahmad W.A., Wan Ahmad W.Y., Zakaria Z.A., Yusof N.Z.* Application of bacterial pigments as colorant: the Malaysian perspective. – Springer, 2011. – 77 p.
2. Пат. 2129136 Российская Федерация. Полимерная красящая композиция-концентрат / М.С. Габутдинов, И.Н. Рязанцева, В.Ф. Черевин, Ч.Б. Медведева, Н.Н. Валеева, О.В. Куликова, И.Н. Андреева, Т.И. Огородникова. – № 97106747/04, заявл. 23.04.97, опубл. 20.04.99, Бюл. № 11. – 4 с.
3. *Montaner B., Navarro S., Piqué M., Vilaseca M., Martinell M., Giralt E., Gil J., Pérez-Tomás R.* Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines // *Br. J. Pharmacol.* – 2000. – V. 131, No 3. – P. 585–593.
4. Пат. 2218381 Российская Федерация. Композиция, включающая нефтепродукт и маркер, способ и раствор для маркирования нефтепродукта, способ идентификации нефтепродукта и способ получения маркера / А.З. Гарейшина, Е.В. Петухова, Д.В. Юсупова, Н.А. Лебедев, Т.Н. Чертилина, А.З. Пономарева. – № 2002119912/04, заявл. 22.07.02, опубл. 10.12.2003, Бюл. № 34. – 5 с.
5. *Глазунова Е.Г., Яруллина Д.Р., Ильинская О.Н.* Пигменты актинобактерий *Agreia* как перспективные маркеры топлив // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2011. – Т. 153, кн. 2. – С. 96–99.
6. *Evtushenko L.I., Dorofeeva L.V., Dobrovolskaya T.G., Streshinskaya G.M., Subbotin S.A., Tiedje J.M.* *Agreia bicolorata* gen. nov., sp. nov., to accommodate actinobacteria isolated from narrow reed grass infected by the nematode *Heteroanguina graminophila* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. – V. 51, No 6. – P. 2073–2079.
7. *Schumann P., Behrendt U., Ulrich A., Suzuki K.* Reclassification of *Subtercola pratensis* Behrendt *et al.* 2002 as *Agreia pratensis* comb. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2003. – V. 53, No 6. – P. 2041–2044.
8. *Evtushenko L.I., Dorofeeva L.V., Dobrovolskaya T.G., Subbotin S.A.* Coryneform bacteria from plant galls induced by nematodes of the subfamily *Anguininae* // *Russ. J. Nematol.* – 1994. – V. 2, No 2. – P. 99–104.
9. *Behrendt U., Ulrich A., Schumann P., Naumann D., Suzuki K.* Diversity of grass-associated *Microbacteriaceae* isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2002. – V. 52, No 5. – P. 1441–1454.

10. *Evtushenko L.I., Takeuchi M.* The family *Microbacteriaceae* (Chapter 1.1.28) // The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria / Eds. M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt. – Springer, 2006. – V. 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes. – P. 1020–1026.
11. *Трутко С.М., Дорофеева Л.В., Островский Д.Н., Хинтц М.* Распространение изопреноидных пигментов в семействе *Microbacteriaceae* // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 3. – С. 335–341.
12. *Buck J.D.* Effects of medium composition on the recovery of bacteria from sea water // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. – 1974. – V. 15, No 1. – P. 25–34.
13. *Egan S., James S., Holmström C., Kjelleberg S.* Correlation between pigmentation and antifouling compounds produced by *Pseudoalteromonas tunicate* // Environ. Microbiol. – 2002. – V. 4, No 8. – P. 433–442.
14. *Mathews-Roth M.M.* Carotenoids and photoprotection // Photochem. Photobiol. – 1997. – V. 65, Suppl. S1. – P. 148S–151S.
15. *Krinsky N.I.* Antioxidant functions of carotenoids // Free Radic. Biol. Med. – 1989. – V. 7, No 6. – P. 617–635.
16. *Mathews M.M., Sistrom W.R.* Functions of carotenoid pigments in non-photosynthetic bacteria // Nature. – 1959. – V. 184. – P. 1892–1893.
17. *Mathews M.M., Sistrom W.R.* The function of the carotenoid pigments of *Sarcina lutea* // Arch. Mikrobiol. – 1960. – V. 35, No 2. – P. 139–146.
18. *Buchard R.P., Dworkin M.* Light-induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus* // J. Bacteriol. – 1966 – V. 91, No 2. – P. 535–545.
19. *Dieringer S.M., Singer J.T., Cooney J.J.* Photokilling of *Micrococcus roseus* // Photochem. Photobiol. – 1977. – V. 26, No 4. – P. 393–396.
20. *Wright L.J., Rilling H.C.* The function of carotenoids in a photochromogenic bacterium // Photochem. Photobiol. – 1963. – V. 2, No 3. – P. 339–342.
21. *Pezzoni M., Costa C.S., Pizarro R.A., Oppezzo O.J.* The relationship between carotenoids and sunlight response in members of the family *Micrococcaceae* // J. Basic Microbiol. – 2011. – V. 51, No 3. – P. 325–329.

Поступила в редакцию
10.04.12

Глазунова Евгения Геннадьевна – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: mia19871@rambler.ru

Ярулина Дина Рашидовна – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: kasfes@gmail.com

Васильев Илья Юрьевич – студент кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: merk_t6@mail.ru

Гаврилова Мария Николаевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры медико-биологических дисциплин и безопасности жизнедеятельности Марийского государственного университета, г. Йошкар-Ола.

E-mail: mashagavriliva@mail.ru

Ильинская Ольга Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: Olga.Ilinskaya@ksu.ru