

Введение Аэробные бактерии в процессе эволюции приспособились к жизни в присутствии кислорода. Для защиты генетического материала от разрушительного действия активных форм кислорода (АФК) в клетках бактерий присутствуют такие ферменты как каталазы и пероксидазы [1].

Грамотрицательная бактерия *Serratia marcescens* способна вызывать различные заболевания растений, насекомых, животных и человека[2]. В частности, было показано, что *S.marcescens* способна вызывать заболевания мочеполового тракта, сепсис, респираторные и глазные инфекции [2, 3]. *S.marcescens* обладает различными факторами вирулентности. Известно, что вирулентность патогенных бактерий может регулироваться различными факторами и в частности гомосеринлактоном [4]. Важную роль в вирулентности могут играть различные эффлюкс-системы бактерий [5]. Секвенирование генома *S.marcescens* позволило улучшить наше понимание биологии этого микроорганизма. Однако на данный момент в литературе отсутствуют данные о наличии у *S.marcescens* генов каталаз и пероксидаз, а также о чувствительности *S.marcescens* к перекиси водорода, одной из активных форм кислорода. В данной работе был проведен биоинформационный анализ с целью идентификации генов каталаз и пероксидаз в геноме *S.marcescens*, а также проведен анализ устойчивости разных штаммов *S.marcescens* к перекиси водорода. Материалы и методы В работе использовали штаммы *Serratia marcescens* SM6 [6], SR41-8000 [7], и TT392 [8]. Бактерии культивировали на среде LB (Luria Bertani) [9, 10] в колбах при соотношении среды к объему колбы 1:5 на лабораторных качалках с интенсивностью качания 200 об/мин при температуре 37°C. Посевным материалом служил 18-часовой инокулят. Оптическую плотность культур определяли на приборе xMark Microplate Spectrophotometer (Bio-Rad) при длине волны 590 нм. Для изучения влияния H₂O₂ на рост и жизнеспособность культур перекись водорода вносили в конечной концентрации 1 мМ, 5 мМ, 10 мМ в среду культивирования и определяли динамику роста бактерий. Концентрацию перекиси водорода в среде определяли с помощью коммерческого набора «Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit», Invitrogen, Англия. Контролем служила среда LB без бактерий. Биоинформационный анализ геномов *S. marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *E.coli* проводили с использованием различных баз данных и программ (BLAST, BLASP, NCBI, ASAP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>; <https://asap.ahabs.wisc.edu/asap/home.php>)). Математическую обработку данных проводили в программной среде «Microsoft Excel» путем расчета среднеквадратичного отклонения (s). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении s£ 15%. В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая P 0.05 за достоверный уровень значимости. Результаты и их обсуждение Жизнь на Земле зародилась в атмосфере, лишенной кислорода. С повышением концентрации кислорода в среде микроорганизмы были

вынуждены эволюционировать для приобретения механизмов, защищающих их от токсичного действия кислорода, обусловленного присутствием активных форм кислорода (АФК). Внутриклеточные АФК образуются в результате переноса электронов по электрон-транспортной цепи. Образовавшиеся молекулы супероксид аниона и перекиси водорода далее превращаются в высокотоксичный гидроксил радикал, аккумуляция которого может привести к гибели клеток [1]. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* способны жить в аэробных условиях благодаря присутствию трех классов ферментов – супероксид дисмутаза, каталазы и пероксидазы. Супероксид анион является короткоживущим и быстро переходит в пероксид водорода. Пероксид водорода повреждает ДНК, а также железосодержащие белки, приводя к их инактивации. Каталазы и пероксидазы защищают клетки бактерий от таких повреждений. Так, в геноме *E.coli* присутствует две каталазы (KatE и KatG) и пероксидазы (AhpC и Trx) [1]. Помимо внутриклеточного источника АФК бактерии также подвергаются дополнительному воздействию активных форм кислорода, источником которых являются другие бактерии, в частности молочнокислые бактерии, растения и макрофаги, фотохимические реакции и т.д. [11]. В связи с этим в геноме патогенной бактерии *Salmonella enterica ser.Typhimurium* присутствуют дополнительные каталаза (KatN) и пероксидазы (TsaA) [12, 13]. Для изучения разнообразия каталаз и пероксидаз у условно-патогенной бактерии *S. marcescens* был проведен биоинформационный анализ (таблица). Было показано, что в геноме *S.marcescens*, аналогично геному *E.coli*, присутствуют каталазы KatE и KatG, но не KatN. Однако, в отличие от *E.coli*, у *S.marcescens* отсутствует пероксидаза AhpC, но присутствует пероксидаза TsaA, гомологичная соответствующей пероксидазе *S. typhimurium*. Таким образом, в геноме *S. marcescens* идентифицированы 4 гена каталаз и пероксидаз, продукты которых обеспечивают бактериям устойчивость к активным формам кислорода. Следующий этап работы был посвящен исследованию чувствительности разных штаммов *S. marcescens* к перекиси водорода. Для этого необходимо было подобрать концентрацию H₂O₂, которая бы эффективно ингибировала рост бактерий, но при этом культура не теряла жизнеспособности. С этой целью была исследована динамика роста разных штаммов *S. marcescens* на среде LB без H₂O₂. Как видно из рисунка 1, все штаммы имеют сходный характер роста в данных условиях и выходят на стационарную фазу роста на 8-10 часы культивирования. Обнаружены различия в плотности клеток на стационарной фазе роста разных штаммов *S. marcescens*. Наибольшую плотность (4 опт. ед) имел штамм *S. marcescens* SM6 на 14 час культивирования. Максимальная оптическая плотность штаммов *S. marcescens* TT392 и SR41-8000 достигала 3.2 и 3.7 опт. ед соответственно. Таблица 1 - Биоинформационный анализ генома *Serratia marcescens* на наличие в нем генов каталаз и пероксидаз *S.marcescens* FG194 *S. typhimurium* LT2 *E.coli* K12 Белок, позиция гена в геноме ген Гомология

Гомология по гену, % по белку, % по гену, % по белку % Catalase 3234547-3235983 katE 67%* 42% 68%* 42% Каталаза/пероксидаза HP1 2104119-2106299 katG 78% 80% 76% 79% Нет katN нет нет нет Нет Peroxiredoxin 1039590-1040192 ahpC нет нет нет Нет tsaA 82% 87% нет Нет Peroxiredoxin 2247922-22488425 tpx 74% 75% 80% 88% *короткие области гомологии Чувствительность бактерий *S. marcescens* SM6 к различным концентрациям перекиси водорода изучали по ингибированию роста на среде LB, в которую перед посевом инокулята добавляли 3% H₂O₂ в конечной концентрации от 1 до 10 мМ. В течение 5-6 часов проводили измерение оптической плотности культуры (рис. 2). Как видно из рисунка 2, присутствие перекиси водорода в культуральной среде приводит к пролонгированию lag-фазы культуры. Ингибирующий эффект зависит от концентрации перекиси водорода. Наибольшая разница в динамике роста *S. marcescens* SM6 на контрольной среде и среде с 10 мМ перекиси водорода наблюдается на 3-4 часа культивирования. Перекись водорода в концентрации 10 мМ приводит к снижению оптической плотности культуры на 3 час роста на 50% и на 4 час - 40% от контроля. Однако на 5 час культивирования различие в оптической плотности культур, растущих при разных концентрациях H₂O₂ значительно уменьшается и оптическая плотность достигает 1,1-1,25 опт. ед, что близко к контрольным значениям (рост на среде LB). Это может быть связано с исчезновением перекиси водорода из среды в результате разложения этого короткоживущего соединения. Рис. 1 – Динамика роста штаммов *S. marcescens* SM6 (1), *S. marcescens* TT392 (2) и SR41-8000 (3) на среде LB Основываясь на полученных результатах для дальнейших сравнительных исследований чувствительности разных штаммов *S. marcescens* к перекиси водорода была отобрана концентрация 10 мМ, поскольку при этой концентрации эффект подавления роста был максимален и вместе с тем, эта концентрация перекиси водорода не приводила к гибели культуры. На рисунке 3 представлены данные по изучению динамики роста разных штаммов *S. marcescens* в присутствии 10 мМ перекиси водорода. Штаммы *S. marcescens* SR41-8000, *S. marcescens* SM6 и *S. marcescens* TT392 различаются по чувствительности к перекиси водорода. Наиболее выражена разница в чувствительности между диким штаммом *S. marcescens* SR41-8000 и его производным мутантным TT392. Мутантный штамм *S. marcescens* TT392 практически полностью терял способность к росту в первые часы культивирования. Lag-период культуры увеличивался до 4 часов. На 6 час роста оптическая плотность культуры штамма *S. marcescens* TT392 не превышала 0,26 опт.ед, что составляло не более 20-25% от плотности культур диких штаммов. Рис. 2 – Ингибирование роста культуры *S. marcescens* SM6 в присутствии 1 мМ (2), 5 мМ (3) и 10 мМ (4) перекиси водорода. 1 контроль (рост на среде LB) Таким образом, в присутствии перекиси водорода происходит ингибирование роста культур. Исследуемые штаммы по-разному восстанавливают свою жизнеспособность. Это может быть связано с Рис. 3 –

Динамика роста штаммов *S. marcescens* SR41-8000 (1), SM6 (2), TT392 (3) на среде LB в присутствии 10 мМ перекиси водорода тем, что они способны с разной скоростью инактивировать перекись водорода. Определяли концентрацию перекиси водорода в среде культивирования с помощью набора «Amplex Red» (рис. 4). Показано, что в культуральной среде штамма *S. marcescens* SM6 уже через час культивирования концентрация перекиси снижалась практически до нуля, в то время как в культуральной среде других штаммов перекись водорода исчезала только через 2 часа. За это время значительная часть культуры погибала, что и обуславливало более медленный рост культуры. Поскольку перекись водорода является нестабильным соединением и с течением времени может инактивироваться, в качестве контроля определяли ее концентрацию в среде LB без бактерий. В этих условиях концентрация перекиси водорода в среде практически не изменялась в течение 4-5 часов. Это может свидетельствовать о том, что в среде культивирования исчезновение перекиси водорода связано с ее инактивацией бактериальными метаболитами. Рис. 4 – Концентрация перекиси водорода в культуральной среде штаммов *S. marcescens* SM6 (1), SR41-8000 (2), TT392 (3). К – контроль Таким образом, дикие штаммы *S. marcescens* SR41-8000 и *S. marcescens* SM6 незначительно различаются по чувствительности к перекиси водорода. Наиболее устойчивым к перекиси водорода оказался штамм *S. marcescens* SR41-8000. Устойчивость, видимо, связана с бактериальными метаболитами, способными инактивировать перекись водорода в среде культивирования. Мутантный штамм *S. marcescens* TT392 значительно отличался от диких штаммов. Он был получен из штамма SR41-8000 и не обладает характерной для *S. marcescens* нуклеазной активностью и антибиотикоустойчивостью. Кроме того, в мутантном штамме отсутствует система рестрикции [8]. Мутации в геноме этого штамма, по-видимому, косвенно нарушают защитные механизмы бактерии от активных форм кислорода.