

А. М. Марданова, Э. Х. Низамутдинова, Т. В. Ширшикова,
Л. Х. Камалетдинова, Е. О. Михайлова, М. Р. Шарипова,
Л. М. Богомольная

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ШТАММОВ *SERRATIA MARCESCENS* К ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

Ключевые слова: *Serratia marcescens*, биоинформационный анализ, перекись водорода, чувствительность.

Проведен биоинформационный анализ генома *Serratia marcescens* с целью поиска и идентификации гомологов генов каталаз и пероксидаз *Escherichia coli* и *Salmonella Typhimurium*. 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*. Проведен анализ устойчивости разных штаммов *S.marcescens* к перекиси водорода и показано, что инактивация генов внеклеточной нуклеазы и системы рестрикции приводит к повышению чувствительности бактерий к активным формам кислорода.

Keywords: *Serratia marcescens*, bioinformatics, hydrogen peroxide, sensitivity.

Comparative bioinformatic genome analysis of *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* revealed that, similar to *E.coli*, the genome of *S. marcescens* harbors genes for catalases *KatE* and *KatG*, but not *KatN*. However, in contrast to *E.coli*, the peroxidase *AhpC* gene is absent from *S. marcescens* genome and has apparently been replaced by a putative homolog of *S. Typhimurium* peroxidase *TsaA*. Different strains of *S.marcescens* were tested for sensitivity to hydrogen peroxide. A restrictionless mutant strain lacking nuclease activity was found to display an elevated level of H_2O_2 sensitivity.

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 H_2O_2 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 (σ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении $\sigma \leq 15\%$. 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 Tpx) [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 каталазы и пероксидазы 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 каталазы и пероксидазы, 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 каталазы и пероксидазы

S.marcescens FG194	S. typhimurium LT2		E.coli K12		
	ген	Гомология		Гомология	
		по гену, %	по белку, %	по гену, %	по белку, %
Catalase 3234547 - 3235983	katE	67%*	42%	68%*	42%
Каталаза а/пероксидаза HP1 2104119 - 2106299	katG	78%	80%	76%	79%
Hem	katN	нет	нет	нет	Нет
Peroxiredoxin 1039590 - 1040192	ahpC	нет	нет	нет	Нет
	tsaA	82%	87%	нет	Нет
Peroxiredoxin 2247922 - 2248842 5	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 часы 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.

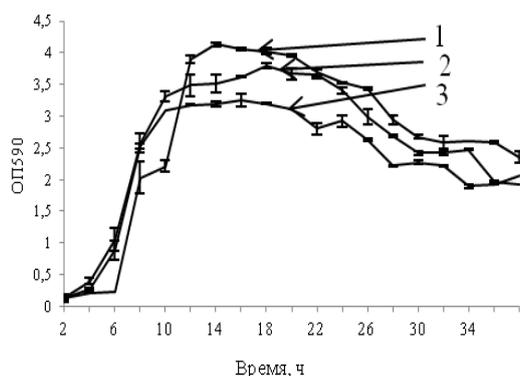


Рис. 1 – Динамика роста штаммов *S. marcescens* SM6 (1), *S. marcescens* TT392 (2) и SR41-8000 (3) на среде LB

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 теряет 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.

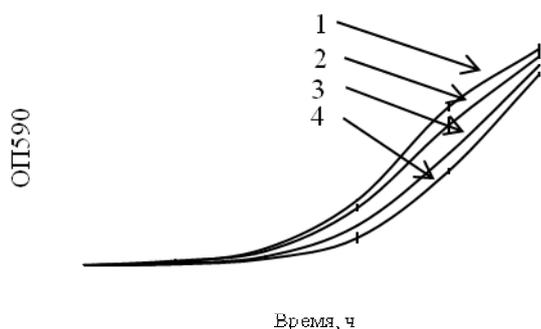


Рис. 2 – Ингибирование роста культуры *S. marcescens* SM6 в присутствии 1 мМ (2), 5 мМ (3) и 10 мМ (4) перекиси водорода. 1- контроль (рост на среде LB)

Таким образом, в присутствии перекиси водорода происходит ингибирование роста культур. Исследуемые штаммы по-разному восстанавливают свою жизнеспособность. Это может быть связано с

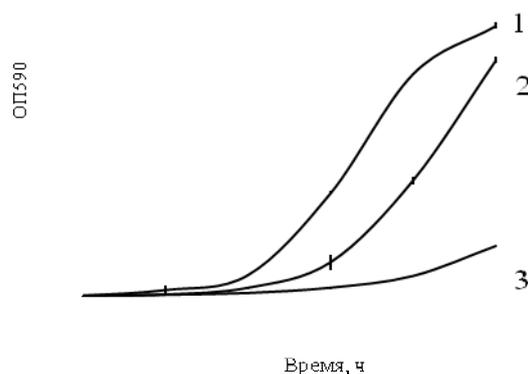


Рис. 3 – Динамика роста штаммов *S. marcescens* SR41-8000 (1), SM6 (2), TT392 (3) на среде LB в присутствии 10 мМ перекиси водорода

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.

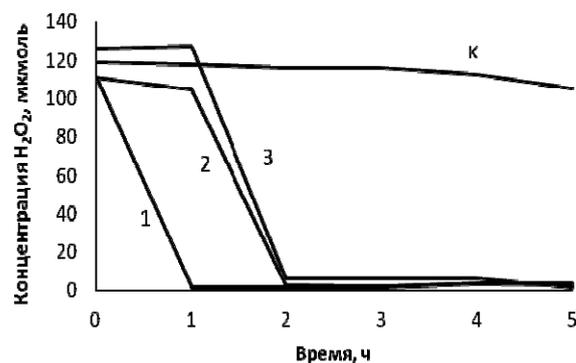


Рис. 4 – Концентрация перекиси водорода в культуральной среде штаммов *S. marcescens* SM6 (1), SR41-8000 (2), TT392 (3). К – контроль

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* ТТ392 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.

Работа поддержана Федеральной целевой программой «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2012-2013 гг. соглашение № 14.А18.21.0857.

Литература

1. J.A. Imlay, *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 755-776 (2008);
2. S. Mahlen, *Clin Microbiol Rev.* **24**, 755-791 (2011);
3. E. Hume, M. Willcox, *Archivos De La Sociedad Española De Oftalmología.* **79**, 475-481 (2004).
4. Н.В. Белоногова, А.Б. Маргулис, В.Я. Понамарев, А.И. Колпаков, О.Н. Ильинская, *Вестник Казанского технологического университета*, **15**, 23, 109-112 (2012);
5. H.P. Schweizer, *Expert. Opin. Drug Discov.* **7**, 7, P. 633–642 (2012);
6. T.K. Ball, P.N. Saurugger, M.J. Benedik, *Gene.* **57**, 183-192. (1987);
7. H. Matsumoto, T. Tazaki, S. Hosogaya, *Jpn. J. Microbiol.* **17**, 473-479 (1973);
8. T. Takagi, M. Kisumi, *J. Bacteriol.* **161**, 1-6 (1985);
9. J. Sambrook, E.F. Fritsch, S.T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989, 2344 p.
10. Н.М. Замалютдинова, И.Р. Галиева, А.О. Арапова, Е.О. Михайлова, М.Р. Шарипова, А.М. Марданова, *Вестник Казанского технологического университета*, **16**, 191-194 (2013)
11. S. Mishra, J. A. Imlay, *Arch Biochem Biophys.* **525**, 145-160 (2012);
12. S.A. Horst, T. Jaeger, L.A. Denkel, S.F. Rouf, M. Rhen, F.C. Bange, *J. Bacteriol.* **192**, 2929-2932 (2010);
13. V. Robbe-Saule, C. Coynault, M. Ibanez-Ruiz, D. Hermant, F. Norel, *Mol. Microbiol.* **39**, 1533-1545 (2001).

© **А. М. Марданова** - к.б.н., доцент каф. микробиологии К(П)ФУ, mardanovaayslu@mail.ru; **Э. Х. Низамутдинова** – магистр той же кафедры; **Т. В. Ширшикова** – студ. той же кафедры; **Л. Х. Камалетдинова** – студ. той же кафедры; **Е. О. Михайлова** - к.б.н., доцент каф. БСМЭ КНИТУ, katyushka.glukhova@gmail.com; **М. Р. Шарипова** - д.б.н., проф. каф. микробиологии К(П)ФУ, marsharipova@gmail.com **Л. М. Богомольная** - к.б.н., асс. профессора Техасский аграрно-технический университет, Техас, США, Bogomolnaya@medicine.tamhsc.edu.