

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 579:252.2

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-2-154-162>

Поступила в редакцию 17.10.2022

Received 17.10.2022

Е. Г. Веремеенко, К. С. Бондарева, А. И. Левданская, Н. П. Максимова

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МУТАНТНОГО ШТАММА *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA* С ПОВЫШЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ПЕРОКСИДУ ВОДОРОДА

**Аннотация.** Химический мутагенез, сопровождающийся тщательно продуманной стратегией селекции, представляет собой эффективный способ получения микробных продуцентов разнообразных биологически активных соединений. Однако существенным минусом данного метода является множественность изменений генома, в результате чего впоследствии сложно идентифицировать гены, продукты которых вносят наибольший вклад в образование целевого метаболита. Современные технологии секвенирования и анализа геномов позволяют преодолеть данный недостаток и открывают новые перспективы в идентификации метаболических путей, задействованных в образовании биологически активных соединений.

Целью данной работы являлся геномный анализ и молекулярно-генетическая характеристика мутантного штамма *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162/15 для обнаружения потенциальных генов-кандидатов, продукты которых могут принимать участие в обеспечении сверхпродукции феназиновых соединений.

В рамках данного исследования были осуществлены полногеномное секвенирование и аннотация генома мутантного штамма B-162/15 бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*. В ходе аннотации было идентифицировано 6493 последовательности, кодирующие белки, и 66 последовательностей, кодирующих транспортные и рибосомальные РНК. При сравнении генома мутантного штамма с ранее отсеквенированным геномом штамма дикого типа B-162 выявлено 16 мутаций. Три из обнаруженных мутаций локализованы в межгенных областях, остальные 13 – в кодирующих областях. Шесть из идентифицированных в кодирующих областях мутаций привели к радикальным заменам аминокислот в структуре белков, что потенциально может оказать влияние на функциональную активность этих белков. Выявлены аминокислотные замены с высоким показателем расстояния Grantham, например, в таких белках, как FliD, железосодержащий редокс-белок и β-субъединица аргинин N-сукцинилтрансферазы. Установлено присутствие в геноме штамма B-162/15 регионов, содержащих фаговые гены.

**Ключевые слова:** феназиновые соединения, секвенирование, аннотация, расстояние Grantham, радикальные замены

**Для цитирования:** Молекулярно-генетическая характеристика мутантного штамма *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* с повышенной устойчивостью к пероксиду водорода / Е. Г. Веремеенко [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2023. – Т. 68, № 2. – С. 154–162. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-2-154-162>

Katsiaryna G. Verameyenka, Krystsina S. Bondarava, Anastasia I. Liaudanskaya, Natalia P. Maximova

Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

## MOLECULAR AND GENETIC CHARACTERIZATION OF THE *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *AURANTIACA* MUTANT STRAIN WITH INCREASED RESISTANCE TO HYDROGEN PEROXIDE

**Abstract.** A whole genome sequencing of natural and mutant producer strains is the best way to analyze the genome and to search for mutations that could cause the acquisition of a number of properties valuable for biotechnological and pharmaceutical industry.

The main goal of current research was to identify mutations that had been induced by chemical mutagenesis in the genome of the mutant strain *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162/15 resistant to hydrogen peroxide. It would give an opportunity to discover new genes potentially participating in phenazine compounds biosynthesis. Such an approach also makes it possible to identify genes, whose products do not directly participate in the phenazine synthesis, but influence the phenazine detoxification, excretion, and optimization of antioxidant system activity. Most of all, it could help us to discover new unpredicted enzyme systems that might be involved into this process.

The genome size of *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162/15 was 7109863 b. p. It contained 6493 open reading frames and 66 sequences encoding transport and ribosomal RNA. Comparison of a wild-type strain and B-162/15 mutant genomes revealed 16 mutations, 13 of which were located in coding sequences and 3 were located in intergenic regions. Six mutations led to radical replacements in amino acid sequences of coded proteins (with a Grantham distance of more than 80). We managed to identify four potential gene-candidates, which could influence the phenazine metabolism and provided the ability of mutant strain to superproductivity. They were arginine N-succinyltransferase, phosphoenolpyruvate synthase, iron-contain-

ing redox enzyme family protein, membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism. Three prophage regions were identified, two regions of which were intact and one region was incomplete. The prophage genes, as well as the bacterial genes were inside these regions. We also managed to identify two genes of *Agrobacterium tumefaciens* inside prophage region 2. It was possible that these regions were introduced into the genome of studied strain by viral transduction.

**Keywords:** phenazines, sequencing, Grantham distances, radical substitutions

**For citation:** Verameyenka K. G., Bondarava K. S., Liaudanskaya A. I., Maximova N. P. Molecular and genetic characterization of the *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* mutant strain with increased resistance to hydrogen peroxide. *Vestsi Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk* = *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2023, vol. 68, no. 2, pp. 154–162 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2023-68-2-154-162>

**Введение.** Для решения задач современной биологии все чаще используется процедура секвенирования нуклеиновых кислот. Данный подход с успехом применяется в судебной медицине, онкогематологии, диагностике генетических и инфекционных заболеваний, паспортизации ценных сельскохозяйственных животных и растений, а также во многих других направлениях [1]. Для микробной биотехнологии секвенирование не только стало неотъемлемым этапом в идентификации видов, представители которых синтезируют ценные метаболиты либо осуществляют деградацию токсичных и контаминирующих соединений, но и оказалось чрезвычайно полезным для установления метаболических связей, принимающих участие в обеспечении сверхсинтеза тех или иных соединений у штаммов-продуцентов [2].

Несмотря на разработку большого количества генно-инженерных методов создания микробных продуцентов промышленно ценных метаболитов, химический мутагенез и последующая селекция по-прежнему остаются крайне эффективными подходами в микробной биотехнологии. Это обусловлено тем, что данная стратегия позволяет получить и закрепить множественные изменения генома, которые, в свою очередь, являются причиной масштабных изменений в метаболизме бактериальной клетки. Получение повышенных концентраций целевых соединений зачастую невыгодно либо токсично для самой бактериальной клетки-продуцента, что является основным барьером к сверхпродукции. Преодоление такого барьера требует глобальных изменений клеточного метаболизма [3].

Однако существенным минусом этой стратегии является сложность последующей идентификации генов, продукты которых вносят наибольший вклад в образование целевого метаболита. С развитием технологий секвенирования второго и третьего поколений, а также с оптимизацией биоинформатических подходов, позволяющих осуществить сборку достаточно протяженных скаффолдов либо целых бактериальных геномов и их последующую аннотацию, были открыты новые перспективы в идентификации метаболических путей, задействованных в образовании биологически активных соединений [4].

Одними из перспективных биологических соединений бактериального происхождения являются феназины, относящиеся к ароматическим гетероциклическим соединениям [5]. Поскольку феназины обладают бактерицидным и цитостатическим эффектами, их применяют в медицине, сельском хозяйстве и нанотехнологиях [6]. Известно использование феназиновых соединений в качестве медиаторов, опосредующих взаимодействие между бактериями и высшими растениями, а также для улучшения минерального питания последних [7]. Все это обуславливает актуальность получения продуцентов данных соединений. Однако феназины в высоких концентрациях могут быть токсичны для самих штаммов-продуцентов. Преодоление токсического эффекта сверхпродукции собственных феназинов требует глобального изменения метаболизма штаммов-продуцентов. Для этого необходимо обладать детальной информацией обо всех возможных биосинтетических путях, которые могут быть задействованы в обеспечении сверхпродукции. На данном этапе имеется информация лишь о небольшом количестве генов, продукты которых напрямую задействованы в образовании феназинов в бактериальных клетках. Расширение спектра генов-кандидатов позволит оптимизировать стратегии создания штаммов-продуцентов данных биотехнологически ценных соединений.

Целью данной работы являлся геномный анализ и молекулярно-генетическая характеристика мутантного штамма *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162/15 и его сравнение со штаммом дикого типа для обнаружения потенциальных генов-кандидатов, продукты которых могут принимать участие в обеспечении сверхпродукции феназиновых соединений.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали штаммы *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* дикого типа (B-162) и мутантный штамм (B-162/15), полученный в результате ступенчатого мутагенеза и последующей селекции на устойчивость к пероксиду водорода [8].

Геномную ДНК бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* выделяли с помощью набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit K0881 (Thermo Scientific). Секвенирование генома проводили с использованием Illumina MiSeq и MiSeq Reagent Kit v2 на базе ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси». Геном собирали с помощью программы SPAdes 3.13.1, аннотацию генома выполняли в специальном сервисе для аннотации геномов прокариот RAST (<http://rast.nmpdr.org/>). Для поиска генов в секвенированном геноме использовали программу SnapGene 4.2.11 DNA (<https://www.snapgene.com>), для поиска элементов фаговых геномов в составе генома штамма B-162/15 – онлайн-ресурс PHASTER (<https://phaster.ca/>). Продуктивность штаммов представляли в мг фенозинов/л культуральной среды.

**Результаты и их обсуждение.** Ранее на кафедре генетики биологического факультета БГУ в ходе ступенчатого химического мутагенеза и последующей селекции на устойчивость к пероксиду водорода был получен мутантный штамм B-162/15 бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* [8]. Продуктивность штамма B-162/15 составляла 2814 мг/л, что в 5,8 раза выше, чем продуктивность штамма дикого типа B-162. Использование нитрозогуанидана в качестве химического мутагена для ступенчатого мутагенеза позволяло предположить, что геном мутанта будет насыщен транзициями.

В результате секвенирования были получены парные риды, которые при помощи программы-сборщика SPAdes 3.13.1 были собраны в 40 контигов. Последние были собраны в хромосомную последовательность с использованием двух референсных геномов: *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162 (код доступа SRX11183367) и *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* DSM 19603 (код доступа CP027746).

Последующая аннотация позволила установить, что размер генома мутантного штамма составляет 7 109 863 п. о. В результате аннотирования генома с помощью алгоритма RASTtk были обнаружены 6493 открытые рамки считывания и 66 последовательностей, кодирующих транспортные и рибосомальные РНК (рис. 1). Внехромосомных элементов обнаружено не было. Содержание ГЦ-пар составило 62,9 %, что соответствует таковому для представителей рода *Pseudomonas* [9]. Согласно данным аннотации, наибольшее количество генов (543) в геноме *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162/15 ответственны за синтез аминокислот и их метаболизм (рис. 1). Вторую по численности группу (300 генов) составляют гены метаболизма углеводов (рис. 1). Значительная часть генома (225 генов) задействована в метаболизме витаминов, кофакторов и пигментов (рис. 1).

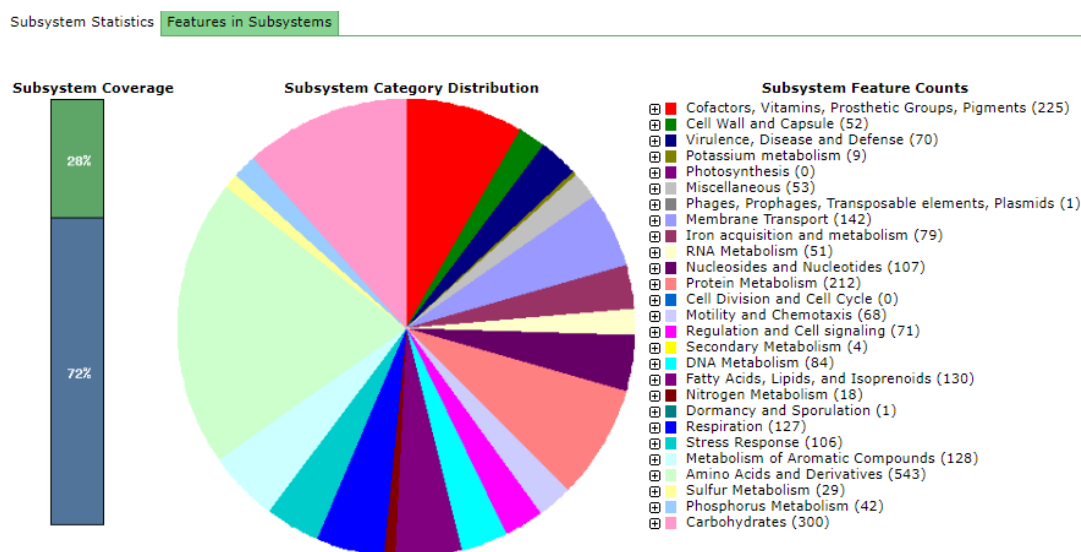


Рис. 1. Данные аннотации генома штамма B-162/15 при помощи RASTtk

Fig. 1. RASTtk genome data for the B-162/15 strain

На следующем этапе работы проведено сравнение генома исследуемого мутанта с геномом штамма дикого типа *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162. В результате такого сравнения выявлено 16 мутаций. Три из них были локализованы в межгенных областях, остальные 13 – в области кодирующих последовательностей (см. таблицу). Дальнейший анализ полученных данных показал, что 6 из обнаруженных в кодирующих областях генома мутаций не приводят к замене аминокислоты в кодируемом белке, тогда как еще 6 мутаций приводят к радикальным заменам в первичной последовательности белков, кодируемых данными генами. Потенциально это может вызывать значительные изменения в функциональной активности данных белков. Среди этой группы наибольший интерес представляют замены, для которых показан высокий уровень расстояния Grantham (см. таблицу). Более высокие значения расстояния Grantham свидетельствуют о том, что эволюционное расстояние между двумя аминокислотами достаточно велико и такие замены приводят к более серьезным изменениям в функциях белков или отдельных белковых доменов.

В данном исследовании в группу белков с наиболее высоким значением показателя Grantham вошли белки FliD (коэффициент 94), железосодержащий редокс-белок (коэффициент 180) и  $\beta$ -субъединица аргинин N-сукцинилтрансферазы (коэффициент 83). Особый интерес среди них представляет железосодержащий редокс-белок. Известно, что феназиновые соединения являются редокс-активными веществами [5], а продуценты этих соединений должны обладать развитыми системами антиоксидантной защиты, чтобы обеспечить собственное выживание в условиях повышенного синтеза феназинов [10]. Кроме того, некоторые феназины принимают активное участие в секвестировании железа из окружающей среды, на чем (в том числе) и основывается механизм их антибиотического действия в отношении ряда патогенных микроорганизмов [11].

#### Мутации в геноме штамма *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162/15

##### Mutations in the *P. chlororaphis subsp. aurantiaca* B-162/15 genome

Продукт	Позиция мутации в геноме	Вариант нуклеотидной замены	Тип аминокислотной замены	Положение измененной аминокислоты в первичной последовательности белка	Расстояние Grantham
Гипотетический белок	1 005 953	a→g	Нет изменений	—	—
MreC-белок	1 028 732	t→c	Радикальная (Ser→Pro)	40	74
Межгенная область	1 697 472	c→t	—	—	—
T1SS секретируемый агглютинин	1 717 816	c→t	Консервативная (Ala→Val)	1229	64
Пермеаза (транспорт лекарств и метаболитов)	1 732 103	c→t	Радикальная (Ala→Thr)	294	58
Гликозил трансфераза, группа 2	1 778 517	c→t	Нет изменений (Ser)	122	—
FliD-белок (биосинтез жгутиков)	1 791 265	g→a	Радикальная (Gly→Asp)	224	94
FliH-белок	1 811 895	c→t	Нет изменений (Ser)	111	—
Регулятор хемотаксиса (рецептор)	1 818 470	c→t	Нет изменений (Gly)	104	—
Fe-содержащий фермент семейства редокс-активных белков	1 857 435	c→t	Радикальная (Asp→Cys)	187	180
Метионил-тРНК-формилтрансфераза	1 864 643	c→t	Нет изменений (Ala)	131	—
Мембран-связанный белок пути метаболизма эйкозаноидов и глутатиона	1 892 446	g→a	Trp→stop-кодон (укорочение на 28 а. к. у мутанта)	106	—
Межгенные области	5 019 222	a→g	—	—	—
	5 019 241	a→g	—	—	—
	5 019 261	t→c	—	—	—
Аргинин N-сукцинил трансфераза, $\beta$ -субъединица	5 391 853	g→a	Радикальная (His→Tyr)	290	83
Межгенная область	5 401 360	g→a	—	—	—
Фосфоенолпируват синтаза	6 872 028	g→a	Радикальная (Pro→Gly)	519	76



Фермент аргинин N-сукцинилтрансфераза катализирует реакцию взаимодействия между сукцинил-КоА и L-аргинином с образованием КоА и N<sup>2</sup>-сукцинил-L-аргинина. Наличие мутаций в гене, кодирующем  $\beta$ -субъединицу аргинин N-сукцинилтрансферазы, было показано нами ранее для штамма В-162/17, способного к синтезу феназинов на минимальных средах [12]. Это указывает на то, что метаболизм аргинина может каким-то образом быть связанным с продукцией феназинов, хотя прямая корреляция между этими двумя процессами пока не установлена.

Кроме того, с точки зрения влияния на уровень продукции феназинов интересной является мутация в гене, кодирующем фермент фосфоенолпируватсинтазу. Известно, что данный фермент задействован в синтезе фосфоенолпирувата, который наряду с эритрозо-4-фосфатом является ключевым метаболитом, с которого начинается ароматический путь, в ходе которого образуются все ароматические соединения бактерий, в том числе и феназины [3]. Радикальная замена в первичной структуре данного белка потенциально может оказывать влияние на его активность и концентрацию фосфоенолпирувата, а следовательно, на поток метаболитов в рамках всего ароматического пути.

Еще одной интересной мутацией является радикальная замена аминокислоты в пермеазе, ответственной за экскрецию из бактериальной клетки лекарств и вторичных метаболитов. Данный белок может быть задействован в выделении феназинов и снижении, таким образом, их токсического влияния на ключевые клеточные мишени (ДНК, ферменты, первичные метаболиты) самого продуцента. Такой механизм детоксикации феназинов потенциально может обеспечивать способность штамма синтезировать более высокие концентрации данных соединений.

Мутация в гене, кодирующем мембран-связанный белок пути метаболизма эйкозаноидов и глутатиона, приводит к формированию стоп-кодона и укорочению мутантного белка на 28 аминокислот. Как было показано нами ранее, глутатион и его метаболизм играют ключевую роль в способности штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* синтезировать повышенные концентрации феназинов [10]. Изменение метаболизма глутатиона (например, в сторону увеличения его восстановленной формы) будет иметь ключевое значение для повышения продуктивности штаммов.

Мутация в гене, кодирующем MreC-белок, присутствует также в геноме другого штамма-продуцента данной бактерии – В-162/255 [12]. Известно, что этот белок контролирует палочковидную форму клеток *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*. Однако данных о корреляции формы бактериальной клетки и ее способности к сверхпродукции феназинов в литературе не обнаружено. Кроме того, локализация замены аминокислоты в белке свидетельствует о том, что она не затрагивает активный сайт MreC.

Более детальный анализ генома штамма В-162/15 на присутствие в его составе профагов и элементов их геномов с помощью онлайн-ресурса PHASTER [13] продемонстрировал наличие двух интактных регионов, содержащих элементы геномов профагов, и одного неполного региона (рис. 2).

Первый интактный регион (регион 1) содержит 49 открытых рамок считывания (1344190–1386019 – координаты региона в геноме штамма В-162/15) и имеет размер 41,8 Кб. Он включает элементы фагов, поражающих бактерии родов *Pseudomonas*, *Shigella*, *Ralstonia*, *Salmonella*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Burkholderia*, *Acinetobacter* и *Halomonas*. В его составе присутствуют последовательности, ответственные за формирование базальной пластинки (Pla), хвоста (Sha) и его фибрилл (Fib), а также целый ряд последовательностей, кодирующих другие фаговые белки (к примеру, транскрипционный регулятор Cro/CI-семейства, фактор сборки боковых хвостовых фибрилл бактериофага (лямбда grTfa-гомолог) и лизозим). Примечательно, что группы последовательностей, кодирующих фаговые белки, разделены между собой последовательностями генов, кодирующих бактериальные белки, характерные для представителей рода *Pseudomonas* (к примеру, белок DprA-суперсемейства, N-ацетилмурамоил-L-аланинамидазу и гликозид-гидролазу). Из фаговых генов наиболее полно в данном регионе представлены последовательности фага phiNAP, поражающего бактерий родов *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Lactococcus* и *Clostridium* [14].

Второй интактный регион (регион 2) содержит 79 открытых рамок считывания и имеет размер 63,2 Кб (3999276–4062482 – координаты региона в геноме штамма В-162/15) (рис. 2). В его составе присутствуют последовательности, кодирующие белки фагов, поражающих бактерии



родов *Pseudomonas*, *Shigella*, *Erwinia*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Xylella*. Эти последовательности ответственны за образование транскрипционного активатора СП-семейства фага лямбда, фагового репрессора и белков вирионов. Следует отметить, что только в этом регионе были обнаружены последовательности портового белка, интегразы и фаговой транспозазы, а также главного белка капсида. Кроме того, только в составе региона 2 имеются фаговые последовательности, кодирующие образование U-спанинов, которые обеспечивают способность фага лизировать наружную мембрану грамотрицательных бактериальных клеток-хозяев [15]. Обнаружен еще один интересный фаговый ген – ген, кодирующий так называемую хоуминг-эндонуклеазу. Ферменты этой группы распознают протяженные (до 40 п. н.), часто вырожденные участки ДНК. Последовательности, которые содержат эти участки, изначально не имеют в своем составе генов хоуминг-эндонуклеаз. Фермент вносит разрывы в эти последовательности и инициирует перенос собственного гена и фланкирующих областей в данную область. Помимо фагов разнообразные последовательности, кодирующие данный класс ферментов, обнаружены в митохондриальных геномах дрожжей и в составе мобильных интронов группы I [16]. Однако наибольшее разнообразие их выявлено именно в геномах фагов [17]. В целом следует отметить, что из фаговых последовательностей в данном регионе наиболее часто представлены последовательности фага  $\phi$ PSA1, поражающего представителей рода *Pseudomonas* [14]. Регион 2 также содержит последовательности бактериальных белков, в частности гены *attR* и *attL*, принадлежащие *Agrobacterium tumefaciens*. Судя по всему, данные гены были привнесены в геном *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* в результате трансдукции. Аналогично региону 1, в регионе 2 обнаружены также и собственные гены *Pseudomonas* (к примеру, экзонуклеаза, специфичная к одноцепочечной ДНК, ДНК-цитозинметилтрансфераза).

Регион 3 является неполным, состоит из 11 открытых рамок считывания и имеет размер 18,2 Кб (4060912–4060923 – координаты региона в геноме штамма B-162/15). Основными фаговыми генами, обнаруженными в его составе, являются гены фагоподобных белков, белков фага  $\phi$ PSA1, интеграз фагов, поражающих представителей родов *Pseudomonas* и *Escherichia*, а также белки оболочки хвоста. Кроме того, в составе региона присутствуют бактериальные гены (например, кодирующие транскрипционные регуляторы LysR-семейства), а также гены tPHK.

**Заключение.** Размер генома бактерий *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* B-162/15 составляет 7 109 863 п. о. В составе генома обнаружены 6493 открытые рамки считывания и 66 последовательностей, кодирующих транспортные и рибосомальные РНК. Значительная часть генома ответственна за процессы первичного метаболизма, а также задействована в метаболизме витаминов, кофакторов и пигментов. В составе генома обнаружены также два интактных и один неполный регионы, содержащие фаговые гены. Сравнение геномов штаммов B-162/15 и B-162 (дикий тип) позволило выявить в геноме мутантного штамма B-162/15 16 мутаций, 13 из которых затрагивали белок-кодирующие последовательности, а 3 располагались в межгенных областях генома. Шесть из обнаруженных в кодирующих областях мутаций привели к радикальным заменам в аминокислотной последовательности кодируемых ими белков, тогда как четыре мутации вызвали консервативные изменения в первичной структуре белка. Идентифицированы новые гены, продукты которых потенциально могут принимать участие в обеспечении способности к сверхсинтезу феназиновых соединений. К ним относятся гены, кодирующие железосодержащий редокс-белок, мембран-связанный белок пути метаболизма эйкозаноидов и глутатиона, а также фосфоенолпируватсинтазу. Еще одним потенциальным белком, оказывающим влияние на этот процесс, может оказаться аргинин N-сукцинилтрансфераза.

#### Список использованных источников

1. Rosenberg, E. It's in Your DNA: from discovery to structure, function and role in evolution, cancer and aging / E. Rosenberg. – [S. n.], Academic Press, 2017. – 218 p.
2. Baral, B. Activation of microbial secondary metabolic pathways: avenues and challenges / B. Baral, A. Akhgari, M. Metsä-Ketelä // KeAi: Synthetic Systems Biotechnol. – 2018. – Vol. 3, N 3. – P. 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.001>
3. Engineering *Pseudomonas* for phenazine biosynthesis, regulation, and biotechnological applications: a review / M. Bilal [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – Vol. 33, N 191. – 11 p. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2356-9>

4. Поколения методов секвенирования ДНК (обзор) / А. Г. Бородин [и др.] // Науч. приборостроение. – 2020. – Т. 30, № 4. – С. 3–20.
5. Advances in phenazines over the past decade: review of their pharmacological activities, mechanisms of action, biosynthetic pathways and synthetic strategies / J. Yan [et al.] // *Marine Drugs*. – 2021. – Vol. 19, N 11. – Art. 610. <https://doi.org/10.3390/md19110610>
6. Inhibition of three potato pathogens by phenazine-producing *Pseudomonas* spp. is associated with multiple biocontrol-related traits / A. Biessy [et al.] // *mSphere*. – 2021. – Vol. 6, N 3. – Art. e00427-21. <https://doi.org/10.1128/msphere.00427-21>
7. Phenazine-1-carboxylic acid-producing bacteria enhance the reactivity of iron minerals in dryland and irrigated wheat rhizospheres / M. K. LeTourneau [et al.] // *Environment. Sci. Technol.* – 2019. – Vol. 53, N 24. – P. 14273–14284. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03962>
8. Novel approach of phenazine derivatives isolation from *Pseudomonas* culture medium / M. A. Shapira [et al.] // *Process Biochem.* – 2021. – Vol. 111, pt. 2. – P. 325–331. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2021.11.004>
9. Лысак, В. В. Важнейшие группы микроорганизмов / В. В. Лысак, О. В. Фомина. – Минск : БГУ, 2012. – 92 с.
10. Veremeenko, E. G. Activation of the antioxidant complex in *Pseudomonas aurantiaca* – producer of phenazine antibiotics / E. G. Veremeenko, N. P. Maksimova // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 79, N 4. – P. 439–444. <http://dx.doi.org/10.1134/S0026261710040041>
11. Абатуров, А. Е. Медикаментозное ограничение доступности ионов железа для патогенных бактерий (часть 1) / А. Е. Абатуров, Т. А. Крючко // Здоровье ребенка. – 2018. – Т. 13, № 4. – С. 416–424.
12. Liaudanskaya, A. I. Analysis of genomes changes in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains producing phenazines / A. I. Liaudanskaya, N. P. Maximova, K. G. Verameyenka // *Res. Square*. – 2021. – 17 p. <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-289228/v1>
13. PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes / D. Arndt [et al.] // *Brief. Bioinform.* – 2017. – Vol. 20, N 4. – P. 1560–1567. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx121>
14. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools / C. L. Schoch [et al.] // *Database (Oxford)*. – 2020. – Vol. 2020. – Art. baaa062. <http://dx.doi.org/10.1093/database/baaa062>
15. Localization and regulation of the T1 unimolecular spanin / R. Kongari [et al.] // *J. Virol.* – 2018. – Vol. 92, N 22. – Art. e00380-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.00380-18>
16. Chevalier, B. S. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility / B. S. Chevalier, B. L. Stoddard // *Nucl. Acids Res.* – 2001. – Vol. 29, N 18. – P. 3757–3774. <https://doi.org/10.1093/nar/29.18.3757>
17. Elde, M. Functional characterization of isoschizomeric His-Cys box homing endonucleases from *Naegleria* / M. Elde, N. P. Willassen, S. Johansen // *Eur. J. Biochem.* – 2000. – Vol. 267, N 24. – P. 7257–7265. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01862.x>

## References

1. Rosenberg E. *It's in Your DNA: from discovery to structure, function and role in evolution, cancer and aging*. Academic Press, 2017. 218 p.
2. Baral B., Akhgar A., Metsä-Ketelä M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: avenues and challenges. *KeAi: Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, vol. 3, no. 3, pp. 163–178. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2018.09.001>
3. Bilal M., Guo S., Iqbal H. M. N., Hu H., Wang W., Zhang X. Engineering *Pseudomonas* for phenazine biosynthesis, regulation, and biotechnological applications: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, vol. 33, no. 191, p. 11. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2356-9>
4. Borodinov A. G., Manoilov V. V., Zarutskii I. V., Petrov A. I., Kurochkin V. E. *Generation of DNA sequencing methods (review)*. *Nauchnoe priborostroenie* [Scientific instrumentation], 2020, vol. 30, no. 4, pp. 3–20 (in Russian).
5. Yan J., Liu W., Cai J., Wang Y., Li D., Hua H., Cao H. Advances in phenazines over the past decade: review of their pharmacological activities, mechanisms of action, biosynthetic pathways and synthetic strategies. *Marine Drugs*, 2021, vol. 19, no. 11, art. 610. <https://doi.org/10.3390/md19110610>
6. Biessy A., Noviscak A., St-Onge R., Léger G., Zboralski A., Filion M. Inhibition of three potato pathogens by phenazine-producing *Pseudomonas* spp. is associated with multiple biocontrol-related traits. *mSphere*, 2021, vol. 6, no. 3, art. e00427-21. <https://doi.org/10.1128/msphere.00427-21>
7. LeTourneau M. K., Marshall M. J., Grant M., Freeze P. M., Strawn D. G., Lai B., Dohnalkova A. C., Harsh J. B., Weller D. M., Thomashow L. S. Phenazine-1-carboxylic acid-producing bacteria enhance the reactivity of iron minerals in dryland and irrigated wheat rhizospheres. *Environmental Science and Technology*, 2019, vol. 53, no. 24, pp. 14273–14284. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b03962>
8. Shapira M. A., Verameyenka K. G., Liavonchik K. V., Dobysh A. A., Yantsevich A. V., Maksimova N. P. Novel approach of phenazine derivatives isolation from *Pseudomonas* culture medium. *Process Biochemistry*, 2021, vol. 111, pt. 2, pp. 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.11.004>
9. Lysak V. V., Fomina O. V. *The most important groups of microorganisms: manual*. Minsk, Belarusian State University, 2012. 92 p. (in Russian).
10. Veremeenko E. G., Maksimova N. P. Activation of the antioxidant complex in *Pseudomonas aurantiaca* – producer of phenazine antibiotics. *Microbiology*, 2010, vol. 79, no. 4, pp. 439–444. <http://doi.org/10.1134/S0026261710040041>
11. Abaturov A. E., Kryuchko T. A. Drug limitation of the availability of iron ions for pathogenic bacteria (Part 1). *Zdorov'e rebenka* [Child health], 2018, vol. 13, no. 4, pp. 416–424 (in Russian).



12. Liaudanskaya A. I., Maximova N. P., Verameyenka K. G. Analysis of genomes changes in *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strains producing phenazines. *Research Square*, 2021, p. 17. <http://dx.doi.org/10.21203/rs.3.rs-289228/v1>
13. Arndt D., Marcu A., Liang Y., Wishart D. S. PHAST, PHASTER and PHASTEST: Tools for finding prophage in bacterial genomes. *Briefings in Bioinformatics*, 2017, vol. 20, no. 4, pp. 1560–1567. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx121>
14. Schoch C. L., Ciufo S., Domrachev M., Hottel C. L., Kannan S., Khovanskaya S. [et al.]. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*, 2020, vol. 2020, art. baaa062. <http://dx.doi.org/10.1093/database/baaa062>
15. Kongari R., Snowden J., Berry J. D., Young R. Localization and regulation of the T1 unimolecular spanin. *Journal of Virology*, 2018, vol. 92, no. 22, art. e00380-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.00380-18>
16. Chevalier B. S., Stoddard B. L. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Research*, 2001, vol. 29, no. 18, pp. 3757–3774. <https://doi.org/10.1093/nar/29.18.3757>
17. Elde M., Willassen N. P., Johansen S. Functional characterization of isoschizomeric His-Cys box homing endonucleases from *Naegleria*. *European Journal of Biochemistry*, 2000, vol. 267, no. 24, pp. 7257–7265. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01862.x>

### Информация об авторах

Веремеенко Екатерина Геннадьевна – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [veremeenkoKatya@yandex.ru](mailto:veremeenkoKatya@yandex.ru)

Бондарева Кристина Савельевна – магистрант. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [BKristinaSav@yandex.ru](mailto:BKristinaSav@yandex.ru)

Левданская Анастасия Игоревна – ст. преподаватель. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [liaudanskaya@bsu.by](mailto:liaudanskaya@bsu.by)

Максимова Наталья Павловна – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [nataliamaximova@yahoo.com](mailto:nataliamaximova@yahoo.com)

### Information about the authors

Katsiaryna G. Verameyenka – Ph. D. (Biol.), Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [veremeenkoKatya@yandex.ru](mailto:veremeenkoKatya@yandex.ru)

Krystsina S. Bondarava – Master student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [BKristinaSav@yandex.ru](mailto:BKristinaSav@yandex.ru)

Anastasia I. Liaudanskaya – Senior Lecturer. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [liaudanskaya@bsu.by](mailto:liaudanskaya@bsu.by)

Natalia P. Maximova – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Department (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [nataliamaximova@yahoo.com](mailto:nataliamaximova@yahoo.com)