

Е.Д. Крылова¹, Ф.И. Товкач²

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65029, Украина

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, МСП, Д03680, Украина

ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛИСПЕЦИФИЧЕСКИХ БАКТЕРИОЦИНОВ *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *CAROTOVORA* EC153

*В работе впервые описаны колиспецифические макромолекулярные каротоворицины штамма *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Ec153, обладающие эндонуклеазной активностью. Установлено, что 19,1 % штаммов клинических изолятов *Escherichia coli* чувствительны к этим бактериоцинам. Также охарактеризованы их тип и форма, которые, по предварительным данным, близки по молекулярной массе и электрофоретической подвижности к вирусным структурам.*

*Ключевые слова: *Erwinia carotovora*, колиспецифичные каротоворицины, макромолекулярные бактериоцины, эндонуклеазная активность.*

Стремительное развитие эры антибиотиков привело к возникновению множественной устойчивости среди микроорганизмов, и тем самым создало новую проблему — проблему поиска препаратов аналогичного спектра действия. Поэтому не удивительно, что использование бактериофагов и бактериоцинов в этом аспекте представляют сейчас огромный интерес.

При лизогенной индукции клетки фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* синтезируют отдельные компоненты фагового вириона: капсиды, базальные пластины и хвостовые отростки, способные убивать родственные бактерии, а также некоторые лабораторные и клинические штаммы *Escherichia coli* [1].

В предыдущих работах были описаны бактериоцины *E. carotovora*, обладающие широким кругом хозяев [1, 2]. Наибольший интерес представляли штаммы, продуцирующие каротоворицины, которые активны против *E. coli*. Изучение бактериоцинов референсного штамма *E. carotovora* subsp. *carotovora* Ec153= ATCC 15359= NCPPB 1847 показало, что они обладают широким спектром антибактериальной активности.

Данная работа посвящена исследованию бактериоцинов штамма *E. carotovora* Ec153, специфичных по отношению к *E. coli*.

Материалы и методы. В работе использовали клинические изоляты *E. coli*: N6, N7, 9Ns, 3N1, 3F1, N10, N12, N13, N21, N26, N34, N40, N46, KI, KII, gA120, 1T3, 2N1, 7N, 9F1, 4T [2], лабораторный штамм *E. coli* C600 и *E. carotovora* subsp. *carotovora* M2-4/50RI.

© Е.Д. Крылова, Ф.И. Товкач, 2009

В качестве продуцента каротоворицинов использовали штамм *E. carotovora* subsp. *carotovora* Ec153= ATCC 15359= NCPPB 1847. В работе исследовали два типа препаратов вирусоподобных частиц *E. carotovora* Ec153. Первый получали методом ультрацентрифугирования [3], второй – впервые путем очищения, разделения и концентрирования частиц с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (DEAE 23 SS, Serva 09047). Через колонку диаметром 1,6 см и высотой 32,5 см, уравновешенную 0,02 М натрий-фосфатным буфером, рН 7,0, пропускали 700 мл лизата клеток, полученного после лизогенной индукции каротоворицинов налдидиксовой кислотой [1].

Киллерную активность отдельных фракций устанавливали методом негативных зон, образуемых частицами каротоворицинов на газонах чувствительных бактерий [1]. Для этого с мест нанесения препаратов бактериоцинов на двухслойные индикаторные чашки после инкубации их при оптимальных условиях роста индикаторных культур в течение 18 часов вырезали агаровые блочки размером 5×5×3 мм. Блочки помещали в стерильный буфер А на 5 часов при температуре 4 °С. Далее определяли титр выживших клеток и соотносили его с концентрацией газонных клеток, которые не подвергались воздействию бактериоцинов. Киллерную активность бактериоцинов выражали через величину:

$$KA = -\ln V/V_0,$$

где V/V_0 – выживаемость бактерий, V_0 и V – концентрация клеток в блочках, отобранных с бактериального газона и негативного пятна, формируемого каротоворицинами, соответственно. В этом случае одна единица активности соответствует 37 % выживаемости или e^{-1} [4].

Предварительную идентификацию типа и формы каротоворицинов проводили путем электрофоретического разделения нативного препарата и полученных фракций в гелях агарозы для изоэлектрофокусирования (Agarose for Isoelectric Focusing type VIII, Sigma, A-4905), с последующим белковым окрашиванием 0,2 % Coomassie Blue R 250 (Blue R C. I., Serva, 42660).

Для сравнительного анализа в опытах использовали препараты фагов MS2, FE44 [5] и ZF40 [6] и MCTV EspZM-1 *E. carotovora* ZM-1 [1]. РНК-содержащий колифаг MS2 концентрировали и очищали применяя один цикл дифференциального ультрацентрифугирования частиц в роторе SW41 при 35 000 об/мин на протяжении 90 мин. Концентрированные частицы других фагов и бактериоцинов получали методом осветления лизатов [7].

Определение нуклеазной активности каротоворицинов проводили с использованием ДНК плазмиды pBR322 и бактериофага λ . Для этого, к 3 мкл ДНК добавляли 2 мкл буфера для рестрикции Y, 15 мкл бидистиллированной воды и 5 мкл исследуемой фракции. В контрольный образец препарат каротоворицинов не добавляли. В качестве контроля также использовали ДНК бактериофага λ – нативную и обработанную эндонуклеазой *HindIII*.

Результаты и их обсуждение. Исследование вирусоподобных частиц штамма Ec153 подтвердили множественность макромолекулярных каротоворицинов, установленных ранее с помощью электронной микроскопии [3]. Препараты индуцированных частиц этой бактерии характеризуются наличием трех белковых полос в геле агарозы для изоэлектрофокусирования (IEF) (рис. 1, 4), которые располагаются выше макромолекулярной полосы капсида C1 фага ZF40 и имеют подвижности 0,44, 0,58 и 0,97, соответственно. За единицу принята величина подвижности (EM) капсида C1 фага ZF40. Таким образом, все каротоворицины, зафиксированные в виде электрофоретических полос в IEF-пластине, располагающиеся вблизи старта и выше полосы, соответствующей капсиду 1, имеют значение EM меньше единицы. Напротив, те частицы, у которых этот показатель больше единицы, отражены рефлексом, находящимся ниже такового для капсида 1.

Два типа частиц с низкими значениями подвижности (0,44 и 0,58), вероятно, представляют собой фаговые хвостовые отростки палочковидной формы, которые, по данным электронной микроскопии, являются превалирующими компонентами препаратов каротоворицинов *E. carotovora*. Частицы третьего типа, по нашему мнению, имеют форму отличную от палочковидной, так как их подвижность сравнима со сферическими частицами C1, диаметром 60 нм [6], а также с таковыми фага MS2— значение EM равно 1,18 (рис. 1, (1)).

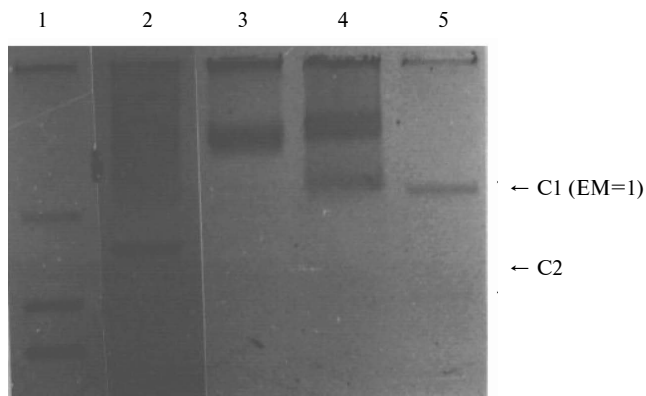


Рис. 1. Электрофореграмма вирионов, вирусоподобных частиц, ДНК и РНК в гелях агарозы для изоэлектрофокусирования. Гели окрашены Coomassie Blue R 250. 1 – фаг MS2, 2 – фаг FE44, 3 – каротоворицины *E. carotovora* ZM-1, 4 – каротоворицины *E. carotovora* Ec153 и 5 – фаг ZF40. Стрелками отмечены положение капсида C1 с электрофоретической подвижностью (EM), принятой за единицу, и капсида C2 фага ZF40

Для того, чтобы соотнести тип и форму частиц с киллерной активностью (КА), ее количественно определяли в тех фракциях, которые были способны убивать индикаторные штаммы *E. carotovora* M2-4/50RI и *E. coli* С 600. В результате опытов было установлено наличие двух пиков КА (рис. 2). Колиспецифические каротоворицины были обнаружены во фракциях 22–28, полученных после промывки колонки 0,2 М раствором NaCl. Максимум этого пика, соответствующий фракциям 23–26, выражен не вполне четко, что, скорее всего, свидетельствует о двух типах близкородственных киллеров, лизирующих клетки *E. coli*. Это предположение подтверждает электрофореграмма (рис. 1 (4)), отражающая наличие двух белковых полос с близкими значениями EM— 0,44 и 0,58. Эти же полосы характерны и для отдельных фракций 25 и 26 (рис. 3 (2 и 3)).

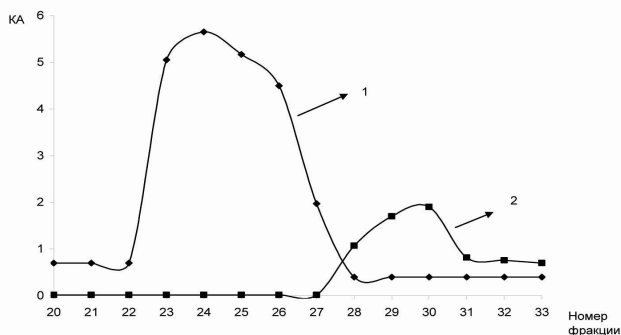


Рис. 2. Среднее значение киллерной активности (КА) каротоворицинов *E. carotovora* Ec153, распределенных в DEAE целлюлозе, по отношению к *E. coli* С 600 (1) и *E. carotovora* M2- 4/50RI (2)

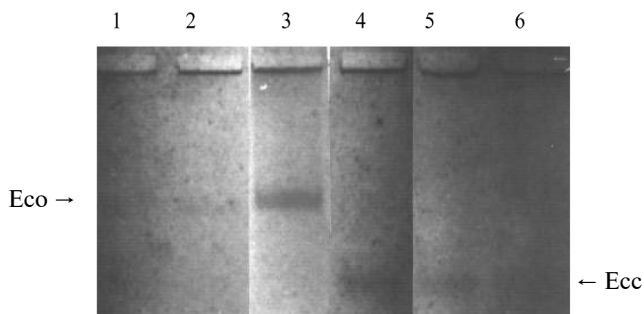


Рис. 3. Идентификация коли- и каротовораспецифичных каротоворицинов с помощью IEF- геля. 1, 2, 4, 5, и 6 соответствуют фракциям 25, 26, 29, 30 и 31, которые отмечены на рис. 2. Контрольный образец получен методом дифференциального центрифугирования (3). Стрелками отмечены колиспецифичные каротоворицины (Eco) и частицы, убивающие *E. carotovora* (Ecc)

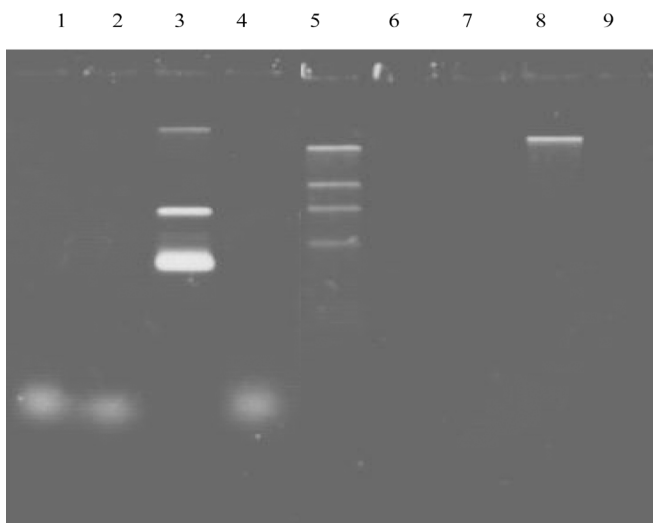


Рис. 4. Эндонуклеазная активность колиспецифичных каротоворицинов. 1, 2, 4— ДНК плазмиды рBR322, обработанная фракциями 23, 24, 25. 6, 7, 9 — ДНК фага λ, обработанная фракциями 23, 24, 25. Контроль: 3 — ДНК плазмиды рBR322; 5 — HindIII-фрагменты ДНК фага λ; 8 — ДНК фага λ

Каротоворицины третьего типа убивают исключительно штаммы *E. carotovora*. В сравнении с колиспецифичными фаговыми отростками они имеют повышенное сродство к DEAE-целлюлозе, обладают большей подвижностью в гелях IEF-агарозы (рис. 1 (4)) и рис. 3 (4, 5 и 6)) и, очевидно, имеют другую форму частиц.

При дальнейшем изучении колиспецифичных каротоворицинов была выявлена киллерная активность также относительно некоторых клинических изолятов *E. coli* (N10, N13, N26, N40), что составляет 19,1 % от общего числа исследуемых штаммов. Ранее была показана способность каротоворицинов спонтанно индуцировать выход дефектных профагов [8]. В 9,5 % случаев на бактериальном газоне появлялись фаговые бляшки различной морфологии. Это объясняется дестабилизацией профагов под воздействием каротоворицинов, а она, в свою очередь, ассоциирована с неспецифической эндонуклеазной активностью [8].

Обработка плазмидной и фаговой ДНК колиспецифическими фракциями вызывала интенсивный гидролиз кольцевой, линейной и суперспирализованной форм (рис. 4), что говорит о наличии неспецифической эндонуклеазной активности, характерной для низкомолекулярных колициноподобных бактериоцинов [8]. Вместе с тем, характер зон лизиса, широкий спектр киллерной активности и данные электрофоретического раз-

деления в IEF-геле свидетельствуют о том, что фракции, обладающие эндонуклеазной активностью, содержат макромолекулярные каротоворицины типа фаговых хвостовых отростков.

Полученные данные позволяют сделать предположение о наличии каротоворицинов промежуточного типа. Ранее, при электронной микроскопии в препаратах каротоворицинов наряду со структурами типа фаговых хвостовых отростков были обнаружены структуры типа базальных пластин [2]. Подобный «нетипичный» макромолекулярный бактериоцин был описан для *Staphylococcus aureus* [9]. Он также обладал широким спектром антимикробной активности, как против близкородственных штаммов, так и против штаммов грамотрицательных бактерий. Согласно данным электронной микроскопии этот бактериоцин представляет собой глобулярную структуру, имеющую сходство с фаговыми объектами. Мы предполагаем, что именно образования по типу базальных пластин могут обладать такими «промежуточными» свойствами и широким спектром антимикробной активности.

Результаты нашего исследования косвенным образом свидетельствуют в пользу профаговой природы бактериоцинов *E. carotovora* subsp. *carotovora* Ec153.

Таким образом, в работе впервые описаны колиспецифические макромолекулярные каротоворицины штамма *E. carotovora* subsp. *carotovora* Ec153, обладающие неспецифической эндонуклеазной активностью. Установлено, что 19,1 % штаммов клинических изолятов *E. coli* чувствительны к этим бактериоцинам. Также охарактеризованы их тип и форма, которые, по предварительным данным, близки по молекулярной массе и электрофоретической подвижности к вирусным структурам. Дальнейшее изучение каротоворицинов штамма *E. carotovora* Ec153 позволит установить механизмы антибактериального действия продуктов экспрессии дефектных профагов и выяснить их роль в формировании бактериоциногенности у фитопатогенных эрвиний.

Работа выполнена при поддержке государственного фонда фундаментальных исследований НДР Ф25/637-2007.

К.Д. Крылова¹, Ф. І. Товкач²

¹Одеський національний університет ім. І.І. Мечникова,

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛІСПЕЦИФІЧНИХ БАКТЕРІОЦИНІВ

ERWINIA CAROTOVORA SUBSP. *CAROTOVORA* EC153

Резюме

В роботі вперше описано коліспецифічні макромолекулярні каротоворіцини штаму *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Ec153, яким притаманна ендонуклеазна активність. Визначено, що 19,1 % штамів клінічних ізолятів *Escherichia coli* чутливі до цих бактріоцинів. Також визначені тип і форма часток, які, за попередніми даними, близькі за молекулярною масою до вірусних структур.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, коліспецифічні каротоворіцини, макромолекулярні бактериоцини, ендонуклеазна активність.

E.D. Krylova¹, F. I. Tovkach²

¹Mechnikov Odessa National University,

²Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

THE CHARACTERISTIC OF THE COLISPECIFIC BACTERIOCINS OF *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *CAROTOVORA* EC153

Summary

It has been shown for the first time that macromolecular carotovoricins from *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Ec153 strain are active to *Escherichia coli* and possess endonuclease activity. It has been established that 19.1 % of strains isolated from the patients are sensitive to these bacteriocins. The type and the form of these particles have been also determined and they show resemblance with phage objects.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Erwinia carotovora*, caratovoricins specific to *Escherichia coli*, macromolecular bacteriocins, endonuclease activity.

The author's address: E.D. Krylova, Mechnikov Odessa National University; 2 Dvoryanskaya St., Odessa, 65029, Ukraine.

1. Балко О.Б. Структурно-функціональна організація каротоворіцинів та їх роль в мікробному антагонізмі: Автореф. дис. ...канд. біол. наук. — Київ., 2007. — 21 с.
2. Девис Р., Ботстайн Д., Рот Дж. Генетика бактерий. — Москва: Мир, 1984. — 176 с.
3. Корнейчук Е.П., Данилейченко В.В., Товкач Ф.И., Тымкив М.З. Плазмидные спектры и фаготипы штаммов *Escherichia coli*, выделенных от больных с опухолями толстого кишечника // Микробиол. журн. — 2004. — **65**, № 5. — С. 30–39.
4. Товкач Ф.И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. — 1998. — **67**, № 6. — С. 767–774.
5. Товкач Ф.И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. — 2002. — **71**, № 3. — С. 359–367.
6. Товкач Ф.И., Мороз С.Н., Гвоздяк Р.И. Изучение адсорбционных рецепторов макромолекулярных бактериоцинов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Микробиол. журн. — 2002. — **64**, № 3. — С. 20–26.
7. Товкач Ф.И. Молекулярно-генетические свойства вирулентного бактериофага FE44 // Доповіді НАН України. — 2002. — № 6. — С. 175–178.
8. Товкач Ф.И. Структурная организация частиц и рестрикционный анализ ДНК умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora* // Микробиология. — 2002. — **71**, № 1. — С. 75–81.
9. Iqbal A., Ali S.A., Abassi A., Volter W., Rasol A. Sheikh. Production, purification and some properties of Bac201, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Staphylococcus aureus* AB201 // J. Basic. Microbiol. — 2001. — **41**, № 1. — P. 25–36.

Отримано 17.03.2008