

УДК 579.891.1 + 826.2

**Л.А. Максименко, Ф.И. Товкач**

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

## **АССОЦИАЦИЯ ПИГМЕНТСОДЕРЖАЩЕГО ЛИПИДА И НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО БАКТЕРИОЦИНА *ERWINIA CAROTOVORA***

*Показано, что лизаты клеток Erwinia carotovora subsp. carotovora J2, индуцированные налидиксовой кислотой, в отличие от таковых, полученных методом замораживания-оттаивания клеток, содержат компонент, который характеризуется наличием дополнительного максимума поглощения в УФ-свете при длине волны 331 нм. Очищенные препараты индуцированного бактериоцина не теряют этой субстанции. Предполагается, что этот компонент представляет собой предшественник синтеза каротиноидов клетками E. carotovora.*

*При обработке хлороформом препараты бактериоцина не теряют киллерной активности по отношению к лабораторным штаммам как E. carotovora, так и E. coli. Причем по сравнению с контролем их хлороформные экстракты имеют два дополнительных максимума поглощения в УФ-свете – при 319 и 331 нм.*

*Мелкие бактериоцины имеют набор белков, который кардинально отличается от такового высокомолекулярных каротоворицинов или бактериоцинов типа фаговых хвостовых отростков E. carotovora. Они представляют собой устойчивый комплекс, состоящий из белка и липида, в котором, скорее всего, растворен каротиноид.*

*Обработка проназой и инкубация с ферментом в течении 5 мин при температуре 60 °С ведет к разрушению комплекса и потере его киллерной активности. Липаза А также разрушает комплекс липид–бактериоцин.*

*Ключевые слова: Erwinia carotovora, лизогенная индукция, бактериоцины, киллерная активность, каротиноиды, белок, липид.*

Фитопатогенная бактерия *Erwinia carotovora* является уникальной модельной системой для адекватного изучения многих общебиологических явлений, в том числе лизогении и бактериоциногенности [1, 2, 3]. При лизогенной индукции ее клетки одновременно синтезируют каротоворицины двух типов – макромолекулярные (MCTV)

© Л.А. Максименко, Ф.И. Товкач, 2009

и колициноподобные (CCTV) [1, 2]. Молекулярно-генетические и функциональные свойства макромолекулярных бактериоцинов *E. carotovora* изучаются очень активно [2, 3, 4, 5]. Известно, что они являются продуктами дефектных профагов, морфологически сходны с хвостовыми отростками фагов и имеют несколько хвостовых фибрилл, которые определяют специфичность их киллерного действия [4].

Каротоворицины подобные колицинам или CCTV имеют меньшую специфичность, чем MCTV [2]. Не исключено, что низкомолекулярные каротоворицины, аналогично многим колицинам и S-пиоцинам, усиливают свой антимикробный потенциал за счет ДНК-азной активности, ассоциированной с частицами [6]. Этот феномен был недавно обнаружен в двух лабораториях [6,7]. Кроме каротоворицинов в NaI-лизатах *E. carotovora* обнаружены вирусоподобные частицы, содержащие ДНК, но не сформировавшиеся в зрелые вирусные частицы, и не обладающие киллерной активностью, названные ДНК-VLP [8]. ДНК этих частиц, возможно, представлена как линейными, так и кольцевыми молекулами.

Однако структура частиц каротоворицинов, механизмы их индукции и действия на чувствительные бактериальные клетки все еще мало исследованы.

Целью данной работы было изучение состава, биологических и физико-химических свойств CCTV *E. carotovora* subsp. *carotovora* J2, синтезирующегося при индукции клеток налидиксовой кислотой.

**Материалы и методы.** В качестве продуцента бактериоцинов использовали культуру популяционного S-диссоцианта J2/S2, полученного из *E. carotovora* subsp. *carotovora* J2. Бактериальные клетки выращивали в минимальной среде M9 в течение 24 часов. Последующее подрощивание клеток и индукцию бактериоцинов проводили как описано в [1, 2]. Далее, к лизату прибавляли 50 % сульфата аммония в присутствии 0,1M NaCl. Преципитат частиц каротоворицинов осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин. Осадки ресуспендировали в А-буфере [1] с добавлением 20мМ MgSO<sub>4</sub>. Затем суспензию обрабатывали РНК-азой и ДНК-азой из расчета 1мкг/мл, 30 мин при температуре 37 °С. Смесь бактериоцинов разделяли в роторе SW-40 центрифуги Beckman при 30000 об/мин в течение 4-х часов в сахарозном градиенте (5–20 %), содержащем разное количество спирта (10, 20 и 30%) в 0,01M трис-HCl буфере, pH 7,2. Осадки, содержащие MCTV, сохраняли на холоду, а более «легкую» фракцию бактериоцинов, формирующую над сахарозной подслоемкой опалесцирующую полоску, отбирали шприцем и осаждали при помощи сернокислого аммония. Эта фракция, как правило, содержала CCTV. Каждый тип бактериоцинов двукратно диализировали против 1000-кратного раствора А.

Спектр поглощения бактериоцинов в УФ-свете записывали на спектрофотометре Beckman DU8. В качестве контроля использовали лизат клеток *E. carotovora*, полученный при помощи трехкратного поочередного замораживания-оттаивания суспензии бактериальных клеток. Для замораживания применяли жидкий азот.

Далее исследовали действие на каждый тип бактериоцинов хлороформа, проназы и липазы. Хлороформ добавляли к суспензии в соотношении 1:1 по объему, тщательно взбалтывали, центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин, затем исследовали водную и хлороформную фракции на наличие биологической активности относительно индикаторных бактериальных культур. Методы исследования бактериоцинов были аналогичны таковым, описанным ранее [1].

Проназу растворяли до 2 мг/мл, предварительно прогревали на водяной бане при температуре 60 °С в течение 20 мин и затем добавляли к суспензиям бактериоцинов до конечной концентрации 50, 100, 200 и 300 мкг на 1 мл. Смесь инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 6 часов. Липазу вносили в количестве 1, 2, 5 и 10 мкл на пробу объемом 20 мкл. Активность бактериоцинов определяли на индикаторных культурах *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 66A, 62A, M2-4/ 50R1, а также *Escherichia coli* B и K12.

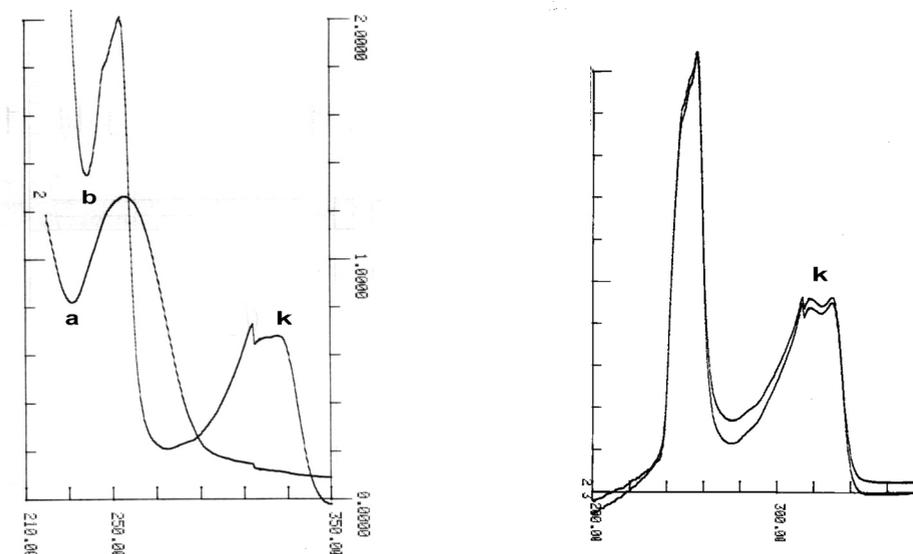
Дополнительную очистку бактериоцинов проводили методом колоночной хроматографии при помощи DEAE-целлюлозы [3]. Электрофоретическое разделение белков осуществляли по методу Laemmli [9]. Деструктурированные бактериоцины подвергали хро-

матографированию на пластине Silufol<sup>®</sup> UV 254, используя смесь хлороформ:метилловый спирт в соотношении (3:1). Хроматографические зоны экспонировали в герметически закрытом сосуде при сублимации металлического иода.

**Результаты и их обсуждение.** Nguyen et al. [4, 5] выделили два типа бактериоцинов у *E. carotovora* с разной хозяйственной специфичностью. Они назвали их Ega и Erb, которые отличаются разным содержанием фибриллярного белка. Электронная микроскопия показала, что каториорин Eг состоит из структуры, имеющую стержень, сократимый чехол, «антенну», базальную пластину и несколько нитчатых фибрилл. При помощи электрофореза в ПААГ было показано, что Eга-бактериоцины представляют основные белки 68 kD – белок хвостовых фибрилл, 50 kD – белок чехла и 19 kD – белок внутреннего кора. Erb-бактериоцины соответственно представлены белками 76,50 и 19. Таким образом, *E. carotovora* продуцирует два типа макромолекулярных бактериоцинов с идентичными оболочками и коровой частью, но с разными хвостовыми фибриллами.

Ранее нами было показано [3], что при индукции налидиксовой кислотой *E. carotovora* штамма J2 образуется смесь бактериоцинов, которые можно разделить на разные группы по активности, относительно разнообразных чувствительных культур.

В работе мы подвергли дополнительной очистке эту смесь бактериоцинов методом градиентного центрифугирования в сахарозе в присутствии от 10 до 20 % этанола. Оказалось, что в отличие от лизатов клеток Есс J2/S2, полученных в результате замораживания-оттаивания суспензии клеток и имеющих пик поглощения в УФ-свете 260 нм (рис. 1а), лизат, индуцированный налидиксовой кислотой, имеет дополнительный максимум поглощения в УФ-свете при длине волны 331 нм. Концентрированные при помощи сульфата аммония, очищенные в градиенте сахарозы и на колонке с DEAE-целлюлозой индуцированные препараты бактериоцинов не теряют этой субстанции (рис. 1б). На рис. 2 представлены спектры бактериоцинов, очищенных при помощи колонки с DEAE-целлюлозой, обладающие киллерной активностью к разным бактериальным культурам. Одни из них имеют чисто белковый спектр (1–3), другие – (4–5) содержат компонент *k*.



**Рис. 1.** Спектры поглощения в ультрафиолетовой области: а – лизат клеток *E. carotovora* J2/S2, полученный в результате замораживания-оттаивания, имеющий один пик поглощения при 260 нм; б – CCTV *E. carotovora* J2/S2, полученные в результате индукции налидиксовой кислотой, имеющие два пика поглощения-260 и 331 нм; в – хлороформная фракция CCTV, имеющая три пика поглощения – 260, 319 и 331 нм.

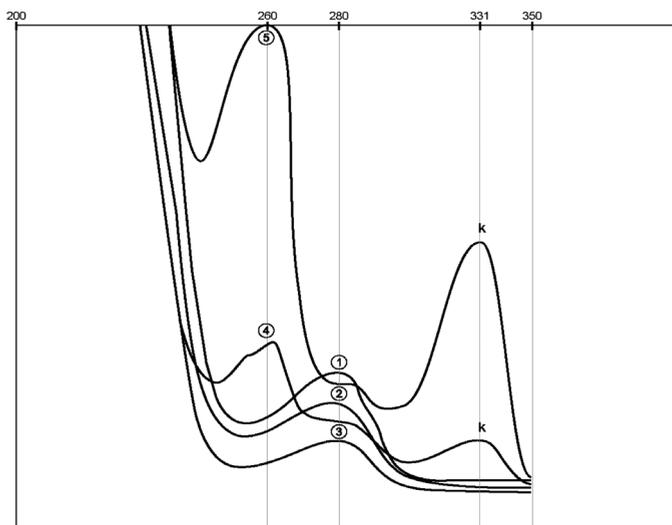


Рис. 2. Спектры поглощения в УФ-области фракций ССТV, очищенных на колонке с DEAE- целлюлозой: 1–3 – фракции, имеющие один белковый спектр (278 нм); 4, 5 – фракции, имеющие два пика поглощения 260 и 331 нм (компонент *k*)

Мы предположили, что этот компонент может представлять собой бесцветный предшественник синтеза каротиноидов *E. carotovora*. Хотя известно, что многие фитопатогенные и эпифитные бактерии, такие, например, как *E. herbicola* (*Paantoea agglomerans*) синтезируют желтые каротиноиды, которые защищают бактерии от реакционного кислорода [10].

Неизменный максимум поглощения, составляющий 331 нм, свидетельствует о том, что *k*-компонент может быть предшественником синтеза каротиноида фитофлуина с УФ-максимумами 331, 348 и 367 нм, а также 331, 347 и 366 нм в петролейном эфире и хлороформе соответственно.

Известно также, что фитофлуин является одной из промежуточных ступеней образования каротиноида ликопина из фитоина в процессе десатурации [11, 12]. По нашему мнению, более детальное изучение компонента *k* может оказаться перспективным в двух направлениях. В первую очередь, он представляет интерес как составная часть препарата низкомолекулярного каротоворицина. С другой стороны, возможность синтеза каротиноидов у *E. carotovora*, хотя и не исключается, окончательно не установлена, несмотря на то, что эта бактерия занимает экологические ниши, сопряженные с таковыми эпифитной каротиноидсинтезирующей бактерии *P. agglomerans* [10]. Несмотря на обработку смеси бактериоцинов ДНК-азой и РНК-азой, фракции низкомолекулярных бактериоцинов даже прошедшие очистку при помощи DEAE-сефарозы имеют пик поглощения в УФ-области при 260 нм. Мы можем только предполагать о наличии во фракции недоступных для ДНК-аз и РНК-аз двухцепочечных молекул ДНК или РНК. Однако, в отличие от неактивных VLP, исследуемые нами частицы обладают киллерной активностью.

Мы обнаружили, что при обработке препарата низкомолекулярного бактериоцина хлороформом, он не теряет киллерной активности по отношению к лабораторным штаммам как *E. carotovora*, так и *E. coli*. Причем его хлороформная фракция обладает наибольшей киллерной активностью относительно клеток *E. coli* (штамм ВЕ) (рис. 3а) и имеет два дополнительных максимума поглощения в УФ-свете – при 319 и 331 нм (рис. 1в). Макромолекулярные бактериоцины после обработки хлороформом не имеют такой выраженной киллерной активности (рис. 3в). Возможно, что большая концентрация хлороформа вызывает сокращение чехла хвостового отростка, что приводит к частичной утрате бактериоцинами их киллерной активности.



а б в г

Рис. 3. Антибактериальная активность каротеноидов *E. carotovora*: а – хлороформная фракция CCTV; б – водная фракция CCTV; в – хлороформная фракция MCTV; г – водная фракция MCTV;

Таким образом, с низкомолекулярным бактериоцином *E. carotovora* ассоциировано вещество, которое экстрагируется хлороформом и по спектральной характеристике соответствует предшественнику синтеза каротиноидов. Появление этой субстанции происходит вследствие индукции каротеноидов налидиксовой кислотой. Можно предположить, что синтез пигмента в клетках *E. carotovora* репрессирован, но может индуцироваться при активации SOS-системы. Что касается роли этого простого каротиноида, то по нашему мнению он способствует защите низкомолекулярных бактериоцинов от действия ферментов, от каких-либо иных реактивных агентов окружающей среды.

Исследование полипептидного состава макромолекулярного бактериоцина *E. carotovora* J2/S2 показало, что их частицы имеют три мажорных пептидных компонента – с м.м. 23, 25 и 46 кД, остальные – 31, 54, 58, 77 и 91 кД – минорные белки. В состав колициноподобных киллеров входит один мажорный полипептид – 54 кД; остальные белки –30, 42, 58, и 67 кД – минорные компоненты (рис. 4). Мы пока не можем утверждать, какой именно белок низкомолекулярных бактериоцинов может играть ключевую роль при образовании комплекса с другими антибактериальными веществами, но разрушение одного из компонентов приводит к потере их киллерной активности. Так, обработка суспензии низкомолекулярных бактериоцинов проназой и инкубация с ферментом в течении 5 мин при температуре 60 °С ведет к разрушению комплекса и потере киллерной активности (рис. 5а). Липаза А также разрушает комплекс липид–бактериоцин, причем, с увеличением ее концентрации увеличивается дестабилизация бактериоцинового комплекса. На дестабилизацию бактериоцинов оказывает влияние и температура (рис. 5б). Нагревание бактериоцина в присутствии липазы до 60 °С ведет к инаktivации и разрушению комплекса. В результате тонкослойной хроматографии обработанных препаратов бактериоцина оказалось, что подвижность пигмента разрушенного липазой препарата была в три раза большей, чем нативного комплекса (рис. 5в).

Таким образом, обнаружен новый тип каротеноидов, который представляет собой сложный комплекс, состоящий из белка, липида и бесцветного пигмента – предположительно предшественника синтеза каротиноида. Этот

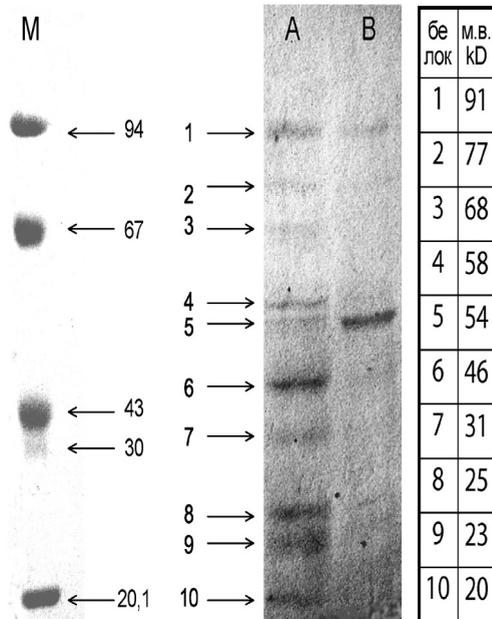


Рис. 4. Электрофореграмма белков каротеноидов *E. carotovora*, индуцированных NaI кислотой: М – маркеры, А – MCTV; Б – CCTV

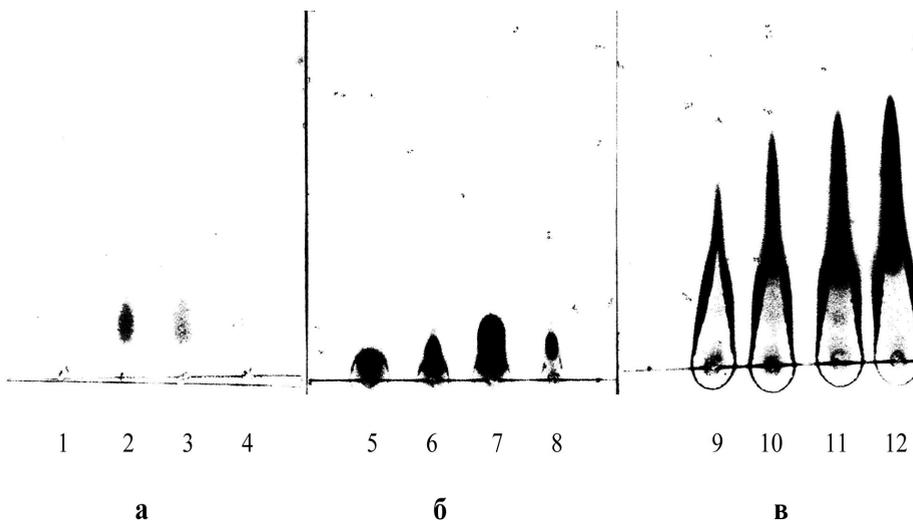


Рис. 5. Влияние проназы и липазы на дестабилизацию бактериоцинов *E. carotovora*: 1 – без проназы; 2–4 – с проназой; 5, 8 – без липазы; 6 – с липазой без нагревания; 7 – с липазой и нагреванием 9–12 – 1, 2, 5, 10 мкл липазы соответственно

каротоворинин может сохранять свою активность продолжительное время при низких и высоких температурах, но под воздействием таких ферментов как проназа и липаза и в сочетании с непродолжительной температурной обработкой при 60 °С эти структуры утрачивают стабильность и киллерную активность. Полученные нами данные еще раз подтверждают факт наличия множественности и биохимической сложности бактериоцинов *E. carotovora*.

Л.А. Максименко, Ф.І. Товкач

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

## АСОЦІАЦІЯ ПІГМЕНТВИСНОГО ЛІПІДА І НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНОГО БАКТЕРІОЦИНА *ERWINIA CAROTOVORA*

### Резюме

Показано, що лізати клітин *Erwinia carotovora subsp. carotovora* J2, індуковані налідиксовою кислотою, на відміну від лізату, одержаного методом заморожування-відтаювання клітин, містять компонент, який характеризується наявністю додаткового максимуму поглинання в УФ-світлі при довжині хвилі 331 нм. Очищені препарати індукованого бактериоцину не втрачають цієї субстанції. Припускається, що цей компонент являє собою попередник синтезу каротиноїдів клітинами *E. carotovora*.

При обробці хлороформом препарати бактериоцину не втрачають кілерної активності стосовно лабораторних штамів як *E. carotovora*, так і *E. coli*. Причому, порівняно з контролем, їх хлороформні екстракти мають два додаткові максимуми поглинання в УФ-світлі – при 319 і 331 нм.

«Мілки» бактериоцини мають білковий спектр, який кардинально відрізняється від такого високомолекулярних каротоворининів чи бактериоцинів типу фагових хвостових відростків *E. carotovora*. Крім того, вони являють собою стійкий комплекс, який складається з білка і ліпиду, в якому, скоріш за все, розчинений каротиноїд.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, лізогенна індукція, бактериоцини, кілерна активність, каротиноїди, білок, ліпід.

## THE ASSOCIATION OF PIGMENT-CONTAINING LIPID AND LOW-MOLECULAR BACTERIOCIN OF *ERWINIA CAROTOVORA*

### Summary

In contrast to lysates of uninduced cells those of *E. carotovora* J2/S2 induced by nalidixic acid contain the component which has the additional maximum of UV-absorption at 331 nm. Bacteriocin samples, concentrated by ammonium sulfate and purified on DEAE-sepharose column in saccharose gradient do not lose this substance. This component is supposed to represent the precursor of carotenoid synthesis of *E. carotovora*.

The chloroform treatment of the bacteriocin preparation did not affect its killer activity against both *E. carotovora* and *Escherichia coli*. Its chloroform extract has the greatest killer activity against *E. coli* BE cells and as a result has two additional maximums of UV-absorption at 315 and 331 nm.

The pronase treatment at 60 °C for 5 min resulted in the destruction of the complex and the loss of the killer activity by bacteriocin.

Lipase A destroys the complex lipid-bacteriocin. Such disruption of the complex increases with the concentration of lipase A. Chromatography of the disrupted preparations has been performed on the plate Silufor<sup>®</sup> VU 254 using the mixture chloroform: ethanol. As a result the mobility of disrupted preparation was three times higher than that of the native complex.

Thus, we have discovered a new type of carotovoricins, which are a stable complex which consists of protein, lipid and pigment, presumably the precursor of carotenoid synthesis.

The paper is presented in Russian.

**Key words:** *Erwinia carotovora*, lysogenic induction, bacteriocins, killer activity, carotenoid, protein, lipid

**The author's address:** Maksimenko L.A., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad.Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Товкач Ф.И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora*//Микробиология – 2002. – 71, №3. – С.359-367.
2. Товкач Ф.И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora*// Микробиология. – 1998. – 67, №6. – С. 767–774.
3. Балко А.Б., Максименко Л.А., Товкач Ф.И. Множественность бактериоцинов *Erwinia carotovora* //Збірник статей учасників Міжнародної наукової конференції «Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Аелопатія».- Київ : «Державний агроєкологічний університет». – 2005. – С. 151–154.
4. Nguyen H.A., Tomita T.T., Hirota M., Sato T., Kamio Y. A simple purification method and morphology and component analyses for carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin from the plant pathogen *Erwinia carotovora* Er. // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1999. – 63, N8. – P.1360–1369.
5. Nguyen H.A., Tomita T.T., Hirota M., Kaneko J., Hayashi T., Kamio Y. DNA Investion in the tail fiber gene alters the host range specificity of carotovoricin Er, a phage-tail-like bacteriocin of phytopathogenic *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* Er.// J. Bacteriol. – 2001. – 183, N21. – P. 6274–6281.
6. Sano Y. The inherent DNase of piocin AP 41 causes breakdown of chromosomal DNA// J.Bacteriol. – 1993. – 175, №3. – P. 912–915.
7. Балко О.Б., Товкач Ф.И. Ендонуклеазна активність, асоційована із частками бактериоцинів *Erwinia carotovora* //Науковий вісник чернівецького університету. – Вип. 297. – Біологія, зб.наук.праць, Чернівці, «Рута», 2006. – С.132–136.
8. Иваница Т.В., Товкач Ф.И. Предварительная характеристика ДНК-содержащих вирусоподобных частиц *Erwinia carotovora*// Микробиол.журн. – 2007. – 69, №3. – С. 19–26.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4// Nature. – 1970. – 227, N5259. –P. 680–685.
10. To K.Y., Lai E.M., Lee L.Y., et al. Analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Erwinia herbicola* Eho 13//Microbiology. – 1994. – 140, N2. – P. 331–339.
11. Britton G. General carotenoids methods// Meth.Enzymol. – Vol.111.Steroids and Isoprenoids. – Academ. Press, 1985. – P. 113–149.
12. Umeno D., Tobias A.V., Arnold F.H. Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution// Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2005. – 69, N1. – P. 51–78.

Отримано 12. 11. 2008