

**Ф.И. Товкач, Л.В. Романюк, Т.Е. Горб, А.Н. Остапчук, Ф.В. Мучник**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, D03680, Украина*

## **ДИССОЦИАЦИЯ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. *CAROTOVORUM*, СВЯЗАННАЯ С ИЗМЕНЕНИЯМИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ**

*Впервые показано, что популяционная гетерогенность у *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* распространяется на большое количество штаммов, т.е. носит универсальный характер. Используя метод специфической селекции с помощью каротоворицинов типа фаговых хвостовых отростков, был получен набор популяционных диссоциантов различных типов, поскольку S-ЛПС является той частью клеточной оболочки, которая содержит места их прикрепления. Установлено, что изменения S-липополисахарида приводят к образованию SR-, R-форм у *P. carotovorum*. Сделано предположение, что изменения поверхностных структур диссоциантов существенно влияют на системы секреции II и III типов – основных факторов патогенности пектобактерий.*

*Представленные результаты создают предпосылки для изучения направления и причины процесса диссоциации, а также ее влияния на патогенность *Pectobacterium carotovorum*.*

*Ключевые слова: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, клеточная оболочка, липополисахарид, диссоциация, селекция, каротоворицины.*

В настоящее время процесс диссоциации рассматривается как один из важных факторов, приводящий к гетерогенности микробной популяции. Важную роль в изменении свойств популяции играет перестройка её возрастной структуры. В результате клеточного и жизненного циклов бактерий морфологические, биохимические и физиологические свойства клеток существенно отличаются. Диссоциация происходит с высокой частотой порядка  $10^{-2} - 10^{-4}$  на одно клеточное деление и, как правило, носит постоянный характер [3].

С развитием биотехнологии интерес к явлению диссоциации в последние годы значительно возрос. Расщепление штаммов-продуцентов ведет к изменениям количества и качества синтезируемых ими биологически активных веществ, что приводит к снижению выхода целевого продукта.

Первичные фенотипические изменения, создающие популяционное разнообразие, происходят в нарушенной оболочке клеток. У большинства грамотрицательных бактерий диссоцианты характеризуются отсутствием или изменением O-специфических полисахаридных цепей либо отличаются по составу белков наружной оболочки по сравнению с исходной бактерией [2].

Многочисленные биохимические и иммунологические исследования показали, что диссоциация затрагивает поверхностные структуры или части наружной мембраны бактерии, что, соответственно, приводит к утрате фаговых рецепторов. Очевидно, не только фаги, но и макромолекулярные каротоворицины (MCTV) типа фаговых хвостовых отростков могут быть применены для направленной и быстрой селекции популяционных диссоциантов [5]. Такой подход позволил получить и сравнить селекционные диссоцианты с вариантами, полученными при спорадических отборах в ходе длительных наблюдений колониального роста *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Целью данной работы было изучение основных свойств, связанных с изменениями липополисахарида клеточной стенки у популяционных диссоциантов разных типов, а также установление направления и причины процесса диссоциации у *Pectobacterium carotovorum*.

**Материалы и методы.** В работе использовали коллекционные штаммы *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc): 62A (из музея бактериальных культур кафедры микробиологии БГУ, г. Минск (Ю.К. Фомичев)), 2M (из музея Московской с/х академии, г. Москва (Е.В. Матвеева)).

Для получения индуцированных лизатов эрвиний бактерии выращивали в минимальной среде А [4] с интенсивной аэрацией при температуре 28 °С. При достижении клетками середины логарифмической фазы роста ( $5,0 \times 10^8$  кл/мл) в среду добавляли митомицин С до

© Ф.И. Товкач, Л.В. Романюк, Т.Е. Горб, А.Н. Остапчук, Ф.В. Мучник, 2012

конечной концентрации 1,0 мкг/мл. Индуцированные лизаты обрабатывали хлороформом и осветляли центрифугированием при 8000g в течение 45 мин. Обнаружение и титрование бактериоцинов осуществляли методом негативных пятен [5].

Селекцию популяционных диссоциантов проводили на твердой среде с лактозой, используя следующую схему. На бактериальные газоны наносили по 5 мкл исходного каротоворицина. Чашки инкубировали 18 часов при 28 °С. Агаровые блоки размером 3х3х3 мм с клетками, которые выжили после инфицирования указанным бактериоцином, вырезали в местах образования пятен. Затем их помещали в раствор 2 мл жидкой среды LB и выращивали 18 часов при 28 °С. Выросшие бактериальные клетки пассировали под селективным прессом бактериоцина до получения устойчивых к нему диссоциантов [5].

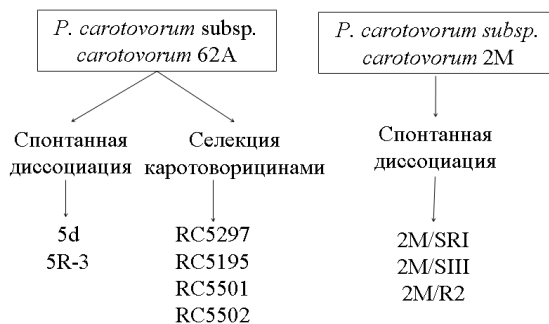
Предварительную идентификацию форм липополисахарида у диссоциантов определяли методом SDS-ПААГ при окрашивании пластины геля нитратом серебра или кумасси [13]. Клетки разрушали 2 % SDS с последующей обработкой проназой в конечной концентрации 50 мкг/мл.

Гиперчувствительную реакцию исследовали на листьях *Nicotiana tabacum* и *Sedum spectabile*. Бактериальные клетки выращивали до плотности  $2,0 \times 10^8$  кл/мл при 28 °С и отмывали солевой средой А. С помощью инсулинового шприца полностью развитые листья инокулировали полученной суспензией. Измеряли площадь заражения, которая была хорошо видна на внутренней стороне листа. Результаты учитывали через 48-72 часа после инокуляции [15]. Величину гиперчувствительной реакции (%) высчитывали как отношение площади пораженного участка к общей площади заражения.

Исследование подвижности клеточек у штаммов и диссоциантов проводили путем откалывания колоний ночной культуры на чашки с полужидкой (0,3 % агара) LB-средой [4] и инкубировали при 28 °С. Результаты учитывали через 24 часа [14].

**Результаты и их обсуждение.** Естественное направление диссоциации у штаммов *Pectobacterium carotovorum* представляет собой переход от S-формы к промежуточной SR-форме, которая характеризуется утратой части О-антигена и далее к R-форме, у которой наблюдаются более глубокие изменения в структуре липополисахарида. Низкая степень такой диссоциации возможна только для первоначально изолированного штамма. В этом случае можно говорить об исходном природном штамме [3]. В нашей работе штаммы, использованные для получения селекционных вариантов, уже представляли смесь различных диссоциантов, так как подвергались многократным пересевам и длительное время хранились на агаровых столбиках. Длительное хранение штаммов можно рассматривать как один из факторов воздействия внешней среды на клетку, что ведет к естественной изменчивости бактерий.

Используя разработанный нами метод специфической селекции с помощью каротоворицинов, для которых рецепторами (как и для фагов пектобактерий) является S-ЛПС [8], мы получили набор популяционных диссоциантов различных типов (рис. 1).



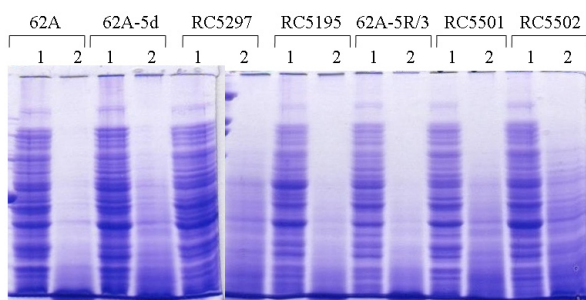
**Рис. 1. Происхождение диссоциантов**

RC – обозначение устойчивости к каротоворицинам.

Было обнаружено, что спонтанные диссоцианты и варианты, полученные при селекции бактериоцинами, характеризуются множественными изменениями фенотипа. От родительских штаммов пектобактерий они отличаются по росту на среде с лактозой, пектином, эозин-

метилowym синим [9]. Такие колониально-морфологические изменения не были связаны с потерей криптических плазмид [6].

Изменения в клеточных оболочках при диссоциативных переходах приводят к гетерогенности популяции бактерий. Идентификацию форм липополисахарида клеточной оболочки диссоциантов проводили экспресс-методом путем дезинтеграции клеток SDS с последующей обработкой проназой или без такой обработки. Продукты разделяли в денатурирующей системе SDS-ПААГ [16]. Гели окрашивали нитратом серебра или кумасси. При окраске кумасси на электрофореграмме мы наблюдали только белковые структуры (рис. 2), которые указывали на идентичность штамма *Psc* 62A с его диссоциантами. Окраска препаратов нитратом серебра давала возможность визуализировать липополисахарид после разрушения всех клеточных белков. На рис. 3 представлены парные профили нерасщепленных и расщепленных лизатов популяционных диссоциантов *Psc* 62A, окрашенные нитратом серебра. В результате удаления белков на профиле остаётся окрашенная часть ЛПС. У селекционного диссоцианта 62A-RC5297 липополисахаридные дуплетные фрагменты распределяются практически по всей высоте профиля, что свидетельствует о целостности или незначительных нарушениях в структуре ЛПС. Это позволяет выделить его в S-форму. Профили диссоциантов 62A-5d, 62A-RC5195, 62A-RC5502 подобны, но не идентичны. У вышеуказанных вариантов отмечается наличие «неполной» молекулы ЛПС, о чем свидетельствует изменение профиля. Это указывает на полную или частичную потерю O-антигена и позволяет отнести диссоцианты к SR-типу. Незначительная часть дуплетных фрагментов на ЛПС-профилях штаммов *Psc* 62A, 62A-5R/3, 62A-RC5501 свидетельствует о более глубоких и значимых изменениях в структуре липополисахарида и позволяет причислить их к R-форме (рис. 3).

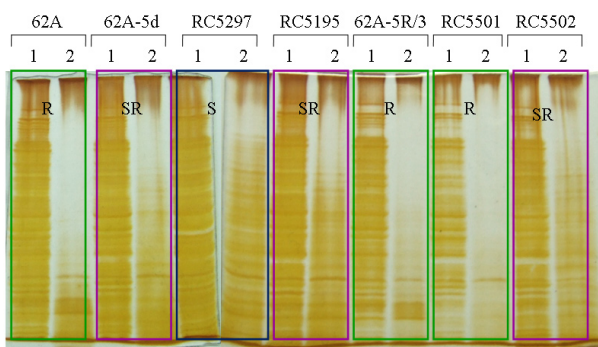


**Рис. 2.** Электрофореграмма SDS-ПААГ клеточных лизатов *P. carotovorum* 62A:

1 – клетки обработаны SDS;

2 – клетки обработаны SDS и проназой.

Гели окрашены кумасси. Сверху обозначены варианты диссоциантов.



**Рис. 3.** Электрофореграмма SDS-ПААГ клеточных лизатов *P. carotovorum* 62A:

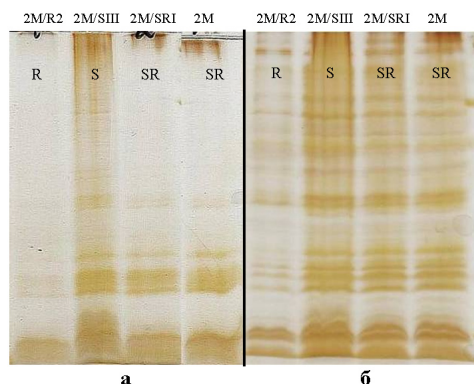
1 – клетки обработаны SDS;

2 – клетки обработаны SDS и проназой.

Гели окрашены нитратом серебра. Сверху обозначены варианты диссоциантов.

Аналогичные формы липополисахарида были обнаружены у бактерий штамма *Psc* 2M. Данные, представленные на электрофореграмме (рис. 4), позволили идентифициро-

вать S-форму у диссоцианта 2M/SIII, у которого дуплетные фрагменты распределяются по всей высоте профиля. Степень окраски липополисахарида на треках расщепленных лизатов *Pcc* 2M и диссоцианта 2M/SRI позволила отнести их к SR-типу, а диссоциант 2M/R2 к R-типу соответственно.



**Рис. 4. Электрофореграмма SDS-ПААГ клеточных лизатов *P. carotovorum* 2M:**

а – клетки обработаны SDS и проназой;

б – клетки обработаны SDS.

Гели окрашены нитратом серебра. Сверху обозначены варианты диссоциантов.

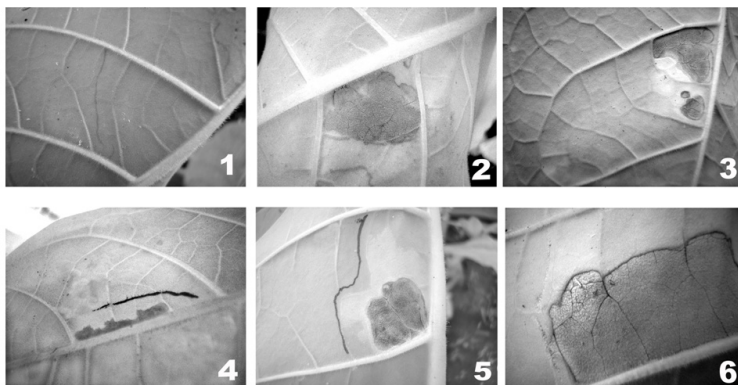
Изменения поверхностных структур клетки у пектобактерий мы рассматривали исключительно в связи с их способностью вызывать патогенный процесс. Ключевая роль в нем принадлежит комплексу энзимов, деградирующих клеточную стенку, основную долю которых составляют внеклеточные пектатлиазы [10]. Вторая группа факторов (таких как: экзополисахариды, липополисахариды, Нгр-система и подвижность) также вносит вклад в вирулентность фитопатогенных пектобактерий [12,11,17].

Ранее в тесте на патогенность с использованием ткани клубня картофеля было установлено, что исходные штаммы пектобактерий и различные популяционные диссоцианты вызывают развитие поражений двух типов – так называемой «черной» и «белой» гнили [1]. При «черной» гнили, вследствие осмотического шока клеток, нарушается целостность растительной ткани. «Белая» гниль является следствием преимущественного разрушения срединной пластинки растительной ткани. Эти данные свидетельствуют о том, что на уровне секреции II типа, которая является основным путем для секреции внеклеточных деструктивных ферментов, популяционная диссоциация, связанная с ЛПС, может действительно влиять на патогенность *Pectobacterium carotovorum*.

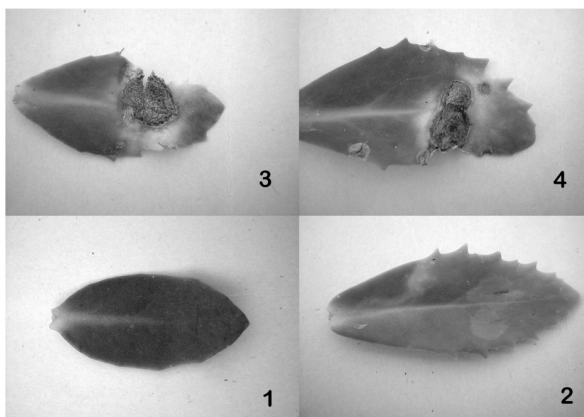
Однако, патогенный процесс у эрвиний, в основном, обусловлен системами секреции II и III типов, функционирование которых, как установлено, являются взаимосвязанными. Система секреции III типа задействована в формировании вирулентности на ранней стадии развития инфекции. Об эффективности её действия можно судить по интенсивности гиперчувствительной реакции, которая является специфическим защитным механизмом против патогенна в устойчивых индикаторных растениях. Представленные результаты (рис. 5) продемонстрировали, что селектированные каротоворицинами диссоцианты *Pcc* 62A вызывают разную степень гиперчувствительной реакции, которая проявляется характерными поражениями на индикаторном растении (рис. 5). Существенные изменения листовой поверхности *Sedum spectabile* были «спровоцированы» штаммом *Pcc* 2M и его диссоциантами (рис. 6). В экспериментах по исследованию гиперчувствительной реакции было показано, что наиболее характерные поражения на листьях индикаторного растения вызваны бактериями S- и SR-типов: *Pcc* 2M/SIII, 2M/SRI.

Существенные отличия у диссоциантов в строении клеточных оболочек обуславливают различия в текучести клеток, вызывая тем самым активность ряда ферментов, вовлеченных в патогенный процесс пектобактерий [14]. На рисунке 7 мы наблюдаем отсутствие подвижности клеток у вариантов R-типа: *Pcc* 62A, 2M/R2 (рис. 7). У вышеуказанных штаммов отмечено снижение вирулентности по характерным показателям гиперчувствительной реакции

(рис. 5, 6). Обратная зависимость была обнаружена у селекционных диссоциантов S-типа: 62A-RC5297, 2M/SIII (рис. 7). Они демонстрируют существенную подвижность и проявляют значительную агрессивность в исследованиях гиперчувствительной реакции. Эти данные подтверждают, что подвижность клеток и, в свою очередь, целостность ЛПС-молекул имеют отношение к патогенности *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.



**Рис. 5.** Реакция гиперчувствительности, вызванная штаммом *Pcc* 62А и его диссоциантами на листьях *Nicotiana tabacum*: 1 – контроль, 2 – *Pcc* 62А, 3 – *Pcc* 62А-5d, 4 – *Pcc* 62А-RC5297, 5 – *Pcc* 62А-5/R3, 6 – *Pcc* 62А-RC5195.



**Рис. 6.** Реакция гиперчувствительности, вызванная штаммом *Pcc* 2М и его диссоциантами на листьях *Sedum spectabile*:

1 – контроль, 2 – *Pcc* 2М/R2, 3 – *Pcc* 2М/SIII, 4 – *Pcc* 2М/SRI.

Таким образом можно предположить, что изменения поверхностных структур клеток *P. carotovorum* существенно влияют на системы секреции II и III типов. При этом наблюдаются нарушения локализации внеклеточной пектатлиазы, а также других экстрацеллюлярных ферментов [1]. Не исключено, что такие нарушения приводят к изменению патогенности микроба по отношению к растению. Особенно наглядно это проявляется на примере селекционного популяционного диссоцианта 62A-RC5195 (таблица). Следует отметить, что у этого диссоцианта SR-типа, кроме значительного усиления реакции гиперчувствительности и увеличения количества экзогенной пектатлиазы, возникает способность к репродукции бактериофага T7 и неспособность к адсорбции фага ZF40 [7]. Последнее свидетельствует о глубоком изменении структуры S-LPS. Наличие такого типа диссоциантов создает перспективы для фундаментального изучения процесса секреции II и III типов как основных факторов патогенности у пектобактерий.

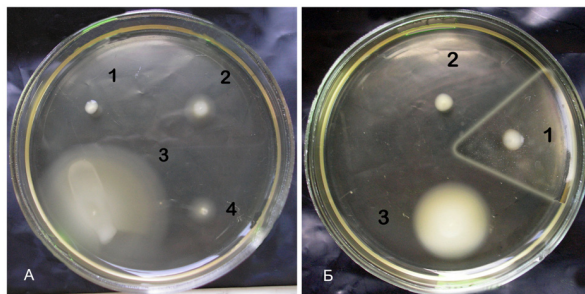


Рис. 7. Колонии двух штаммов *P. carotovorum* и их диссоциантов на среде LB с 0,3% агаром:  
 А. 1 – *Pcc* 62А, 2 – *Pcc* 62А- RC5195, 3 – *Pcc* 62А-RC5297, 4 – *Pcc* 62А-5d  
 Б. 1 – *Pcc* 2М/SRI, 2 – *Pcc* 2М/R2, 3 – *Pcc* 2М/SIII.

Таблица

**Гиперчувствительная реакция, пектолитическая активность и чувствительность диссоциантов к фагам**

Штамм <i>Pcc</i>	Гиперчувствительная реакция (HR), %	Удельная пектолитическая активность, % к контролю	Чувствительность к фагам	
			ZF40	T7
62А	51,5	100,0	+	-
RC5195	68,0	200,0	-	+

Таким образом, у *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* популяционная гетерогенность носит универсальный характер. Изменения поверхностных структур клетки, а именно: S-ЛПС, приводят к образованию SR-, R-форм диссоциантов, которые отличаются по способности бактерии вызывать инфекционный процесс.

**Ф.І. Товкач, Л.В. Романюк, Т.Ю. Горб, А.М. Остапчук, Ф.В. Мучник**

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

**ДИСОЦІАЦІЯ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. *CAROTOVORUM*, ПОВ'ЯЗАНА ЗІ ЗМІНАМИ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ**

**Резюме**

Вперше показано, що популяційна гетерогенність у *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* розповсюджується на велику кількість штамів, тобто має універсальний характер. Використовуючи метод специфічної селекції за допомогою каротоворицинів типу фагових хвостових відростків, було отримано набір популяційних диссоціантів різних типів, оскільки S-ЛПС є тією частиною клітинної оболонки, яка містить сайти їх прикріплення. Встановлено, що зміни S-ліпополісахариду призводять до утворення SR-, R-форм у *P. carotovorum*. Зроблено припущення, що зміни поверхневих структур диссоціантів суттєво впливають на системи секреції II і III типів – головних факторів патогенності пектобактерій.

Одержані результати є передумовою для вивчення напрямку і причини процесу диссоціації, а також впливу її на патогенність *Pectobacterium carotovorum*.

Ключові слова: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, клітинна оболонка, ліпополісахарид, диссоціація, селекція, каротоворицини.

**F.I. Tovkach, L.V. Romanyuk, T.E. Gorb, A.N. Ostapchuk, F.V. Muchnyk**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

**DISSOCIATION OF *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. *CAROTOVORUM* RELATED TO THE CHANGES IN THE CELL WALL LIPOPOLYSACCHARIDE**

**Summary**

It is shown for the first time that population heterogeneity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* is applicable to a wide range of strains and therefore is a universal characteristic. Using the method

of specific selection with the help of carotovoricins which are identical to the phage tails a set of population dissociants of different types was obtained, due to the fact that S-LPS is the part of the cell wall which contains their attachment sites. It was determined that changes in S-lipopolysaccharides lead to the formation of SR-, R-forms of *P.carotovorum*. A suggestion is made that the changes in the surface structures of dissociants have a significant impact on secretion types II and III – the main pathogenicity factor of some bacteria. The results presented are a prerequisite for studying the direction, the reasons for dissociation process and its impact on the pathogenicity of *P.carotovorum*.

The paper is presented in Russian.

**К е у w o r d s:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, cell, wall, lipopolysaccharides, dissociation, selection, carotovoricins.

**The a u t h o r ' s a d d r e s s:** *Tovkach F.I.* Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St. Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Кушкіна А.И., Романюк Л.В., Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Влияние профага ZF40 на секрецию пектаттиазы у *Erwinia carotovora* // Доп. НАН України. – 2006. - №6. – С. 154-156.
2. Матора Л.Ю., Серебренникова О.Б., Петрова Л.П. и др. Нетипичный характер R-S диссоциации *Azospirillum brasilense* // Микробиология. – 2003. -72, №1. –С. 60-63.
3. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 144с.
4. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 436с.
5. Товкач Ф.И., Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. - 1998. – 67. №6. – С. 767-774.
6. Товкач Ф.И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – 70, №6. – С. 804-810.
7. Товкач Ф.И. Изучение фагоустойчивости *Erwinia carotovora* с помощью умеренного бактериофага ZF40 // Микробиология. – 2002. – 71, №1. – С.82-88.
8. Товкач Ф.И., Мороз С.Н., Гвоздяк Р.И. Изучение адсорбционных рецепторов макромолекулярных бактериоцинов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Мікробіол.журн., -2001. – 63, №1. – С.23-33.
9. Товкач Ф.И., Романюк Л.В., Горб Т.Е. Использование макромолекулярных бактериоцинов для селекции популяционных диссоциантов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Доп. НАН України. – 2010. - №1. – С. 164-169.
10. Barras F., Gijsegem F.V., Chatterjee A.K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia* // Annu. Rev. Phytopathol. – 1994. – 32. – P.201-234.
11. Bauer D.W., Bogdanove A. J., Beer S.V., Collmer A. *Erwinia chrysanthemi* *hrp* genes and involvement in soft-rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response // Mol. Plant Microbe Interact. – 1994. – 7. – P. 573-581.
12. Condemine G., Castillo A., Passeri F., Enard C. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi* // Mol. Plant Microbe Interact. – 1999. – 12. – P 45-52.
13. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels // J. Bacteriol. – 1983. – 154, №1. – P. 269-277.
14. Hossain M.M., Shibata S., Aizawa S-I., Tsuyumu S. Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Physiol. Mol. Plant Pathology – 2005. – 66. – P.134-143.
15. Jap M.-N., Barak J.D., Charkowski A.O. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 70, №5. – P. 3013-3023.
16. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of dacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P.680-685.
17. Mulholland V., Hinton J.C.D., Sidebotham J., Toth I.K., Hyman L.J. et al. A pleiotropic reduced virulence (Rvi) mutant of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* is defective in flagella assembly proteins that are conserved in plant and animal bacterial pathogens // Mol. Microbiol. – 1993. – 9. – P. 343-356.

Отримано 08.01.2011