

Ф. И. Товкач, Л. В. Романюк, Т. Е. Горб

Использование макромолекулярных бактериоцинов для селекции популяционных диссоциантов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины И. Г. Скрипалем)

*Запропоновано метод специфічної селекції за допомогою каротоворицинів типу фагових хвостових відростків, який дозволяє проводити ефективний відбір популяційних дисоціантів різних типів *Erwinia carotovora*. Показано, що спонтанні дисоціанти і дисоціанти, одержані за допомогою селекції бактериоцинів, відрізняються колоніально-морфологічними, ростовими характеристиками і такою біохімічною ознакою, як синтез позаклітинної пектатліази. Встановлено, що зміна поверхневих структур дисоціантів приводить до зміни апаратів секреції II і III типу — основних факторів патогенності пектолітичних ервіній. Одержані результати є передумовою для вивчення напряму і механізму дисоціації у практично важливої бактерії *E. carotovora*.*

Популяционная диссоциация является одной из форм естественной изменчивости бактерий. Ее результат — это расщепление однородной популяции на варианты, отличающиеся от исходной формы морфологическими, культуральными, физиологическими и биохимическими признаками. Изменения при диссоциативных переходах носят постоянный и обратимый характер и происходят с высокой частотой порядка 10^{-2} – 10^{-4} на одно клеточное деление. Частота процесса диссоциации на несколько порядков выше частоты спонтанных мутаций [1].

Интерес к процессу диссоциации в последние годы значительно возрос в связи с развитием биотехнологии. Именно, нестабильность штаммов-продуцентов — одна из главных причин снижения продуктивности микробов при синтезе биологически активных веществ.

Основной вклад в популяционное разнообразие вносят изменения в компонентах клеточных оболочек. У грамотрицательных бактерий диссоциация затрагивает поверхностные структуры или части наружной мембраны. Так, многочисленными биохимическими и иммунологическими исследованиями установлено, что диссоциативные варианты бактерий характеризуются отсутствием или изменением O-специфических полисахаридных цепей или отличаются по составу белков наружной оболочки по сравнению с исходной бактерией [2].

Так как диссоциация затрагивает поверхностные структуры или части наружной мембраны бактерии, то, соответственно, это приводит к утрате фаговых рецепторов [3]. Таким образом, фаги могут быть применены для направленной и быстрой селекции популяционных диссоциантов.

Целью проведенного нами исследования было изучение возможности применения макромолекулярных каротоворицинов (MCTV) типа фаговых хвостовых отростков для селекции популяционных диссоциантов и сравнение их с диссоциантами, полученными при спорадических отборах в ходе длительных наблюдений колониального роста *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

В работе использовали коллекционные штаммы *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc): 33А, 35А, 48А, 62А, 66А из музея бактериальных культур кафедры микробиологии Белорусского государственного университета, Минск (Ю. К. Фомичев), Ecc 2 из музея Московской сельскохозяйственной академии им. К. А. Тимирязева (Е. В. Матвеева). Штамм *Erwinia* sp. ZM1 выделен из пораженных клубней картофеля и предварительно идентифицирован как *E. carotovora* (Т. Е. Горб, Ф. И. Товкач — Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев).

Бактерии выращивали в полноценной (LB) и минимальной солевой среде А с лактозой (0,2%), пектином (1,0%), а также на ЕМВ-агаре [4].

Для получения индуцированных лизатов эрвиний бактерии выращивали в минимальной среде А с интенсивной аэрацией при 28 °С. По достижении клетками середины логарифмической фазы роста ($5,0 \cdot 10^8$ кл./мл) в среду добавляли митомицин С до конечной концентрации 1,0 мкг/мл. Индуцированные лизаты обрабатывали хлороформом и осветляли центрифугированием при 8000 g, 45 мин. Обнаружение и титрование бактериоцинов осуществляли методом негативных пятен [5].

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

Выделение плазмидных ДНК и их электрофоретический анализ проводили по методу [6]. Молекулярную массу криптических плазмид *E. carotovora* определяли как описано ранее [7].

Гиперчувствительную реакцию исследовали на листьях табака. Бактериальные клетки выращивали до плотности $2,0 \cdot 10^8$ кл./мл при 28 °С и отмывали солевой средой А. Полученной суспензией с помощью инсулинового шприца инокулировали полностью развитые листья табака. Измеряли площадь заражения, которая была хорошо видна на внутренней стороне листа. Растения анализировали через 48–72 ч после инокуляции, измеряя площадь поражения [8]. Величину гиперчувствительной реакции (%) высчитывали как отношение площади пораженного участка к общей площади заражения.

Исследования показали, что каротоворицины являются удобным инструментом для селекции популяционных вариантов *E. carotovora*. С их помощью были отобраны специфические диссоцианты с нарушениями наружной оболочки бактериальной клетки. Установлено, что в пределах одного и того же штамма для отбора таких диссоциантов пригодны представители не менее шести групп бактериоцинов.

Обнаружено, что спонтанные диссоцианты и диссоцианты *E. carotovora*, полученные при селекции бактериоцинами, имеют множественные изменения фенотипа. В результате исследований роста бактерий родительских штаммов и их фенотипических производных установлено, что на среде с лактозой хорошо различаются S-колонии ветвистой формы и неветвистые R-колонии. Такой рост отсутствует на среде с пектином (рис. 1).

Вариабельность диссоциантов S- и R-типов наблюдали по изменению скорости линейного роста колоний. Она существенно уменьшалась у R-вариантов (рис. 2).

Использование дифференциальной среды с эозин-метиленовым-синим показало, что интенсивность развития окраски растущих колоний в случае диссоциантов происходит зна-

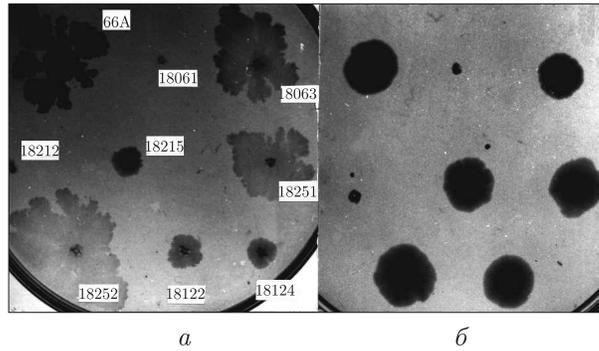


Рис. 1. Морфологические различия диссоциантов *E. coli* 66A на среде А с лактозой (а) и пектином (б). Пятизначные числа — лабораторные номера диссоциантов

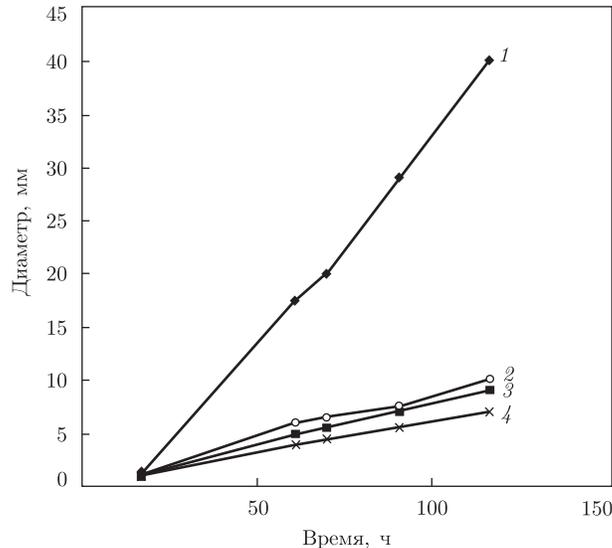


Рис. 2. Рост колоний S- (1) и R-диссоциантов (2, 3, 4) штамма *E. coli* 33A на твердой минимальной среде с лактозой

чительно медленнее, чем у природных штаммов *E. carotovora*. На этой среде колонии диссоциативных вариантов имели вид сухих “звездочек”, были выпуклыми или шероховатыми (рис. 3).

Для установления связи между возникновением фенотипических вариантов и изменением плазмидного спектра бактериальные клетки проверяли на содержание экстрахромосом. Показано, что процесс диссоциации не затрагивает плазмидный состав клеток и спектр экстрахромосом остается неизменным у всех исследуемых диссоциантов.

Таким образом, спонтанные диссоцианты и варианты, отобранные с помощью бактериоцинов, отличаются от родительских штаммов *E. carotovora* по росту на средах с лактозой, пектином и эозин-метиленовым-синим. Такие колониально-морфологические изменения не связаны с потерей криптоических плазмид [7].

Далее мы исследовали влияние популяционной диссоциации на патогенность. У фитопатогенной бактерии *E. carotovora* обратимые изменения поверхностных структур клетки, при которых обычно меняется морфология колоний, могут рассматриваться исключитель-

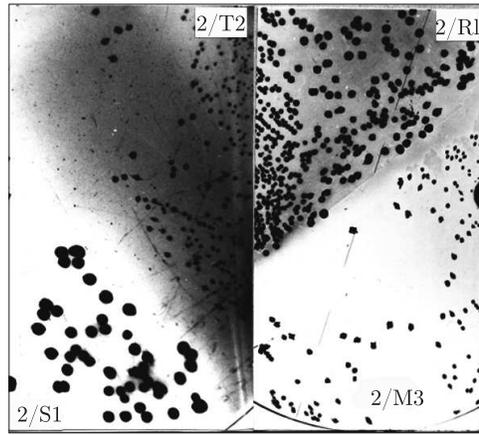


Рис. 3. Гетерогенность популяционных диссоциантов штамма *Ecc 2* на среде EMV. 2/S1 — исходный штамм; 2/T2, 2/R1 и 2/M3 — диссоцианты R-типа

но с точки зрения способности вызывать патогенный процесс. Ключевая роль в нем принадлежит комплексу пектолитических ферментов, основную долю которых составляют внеклеточные пектатлиазы. Именно, внеклеточная локализация активного фермента, который обеспечивает эффективный гидролиз пектиковых компонентов клеточной стенки растения и составляет особенность поражения растения-хозяина этой бактерией.

Ранее в тесте на патогенность с использованием ткани клубня картофеля было установлено, что исходные штаммы эрвиний и различные популяционные диссоцианты вызывают развитие поражений двух типов — так называемой черной и белой гнили [9]. При черной гнили нарушается целостность растительной ткани, что приводит к осмотическому шоку клеток. Белая гниль является следствием преимущественного разрушения срединной пластинки растительной ткани. Эти данные свидетельствуют о том, что на уровне секреции II типа популяционная диссоциация может действительно влиять на патогенность *E. carotovora*.

Однако патогенный процесс у эрвиний в основном обусловлен системами секреции II и III типа, функционирование которых, как установлено, является взаимосвязанным. Система секреции III типа задействована в формировании вирулентности на ранней стадии развития инфекции. Об эффективности ее действия можно судить по интенсивности гиперчувствительной реакции, которая является специфическим защитным механизмом против патогена в устойчивых индикаторных растениях. Опыты показали, что селектированные каротоворицинами диссоцианты имеют разную степень гиперчувствительной реакции, которая проявляется характерными поражениями (рис. 4).

Таким образом, можно предположить, что изменения поверхностных структур клетки *E. carotovora* приводит к изменению аппарата секреции II и III типа. При этом происходят нарушения локализации внеклеточной пектатлиазы, а также других экстрацеллюлярных ферментов [9]. Не исключено, что такие нарушения приводят к изменению патогенности микроба по отношению к растению. Особенно наглядно это видно на примере селекционного популяционного диссоцианта 62A-RC5195 (табл. 1). Следует подчеркнуть, что у этого диссоцианта R-типа, кроме значительного усиления реакции гиперчувствительности и увеличения количества экзогенной пектатлиазы, возникают способность к репродукции бактериофага T7 и неспособность к адсорбции фага ZF40 [10]. Последнее свидетельствует

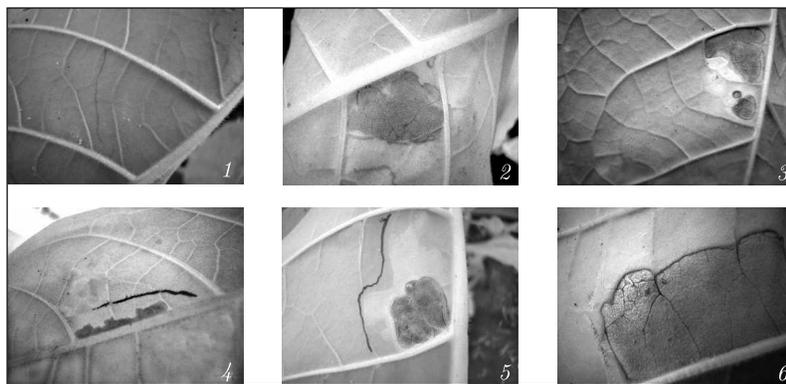


Рис. 4. Реакция гиперчувствительности, вызванная штаммом *Ecc* 62A и его диссоциантами на листьях табака. 1 — незараженный лист; 2 — *Ecc* 62A; 3 — *Ecc* 62A-5d; 4 — *Ecc* 62A-RC5297; 5 — *Ecc* 62A-RC5S-3; 6 — *Ecc* 62A-RC5195

Таблица 1. Гиперчувствительная реакция, пектолитическая активность и чувствительность диссоциантов к фагам

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

о глубоком изменении структуры S-LPS. Наличие такого типа диссоциантов создает перспективы для фундаментального изучения процесса секреции II и III типа как основных факторов патогенности *E. carotovora*.

Таким образом, предложенный метод специфической селекции с помощью каротово-рицинов — типа фаговых хвостовых отростков позволяет проводить эффективный отбор популяционных диссоциантов различных типов и изучать направление, скорость, причины и механизмы процесса диссоциации, а также причастность к этому процессу умеренных фагов у важной фитопатогенной бактерии *E. carotovora*.

1. Милько Е. С., Егоров Н. С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. — Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1991. — 144 с.
2. Матора Л. Ю., Серебрянникова 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. О роли умеренного фага в диссоциации бактерий // Биол. науки. — 1986. — № 4. — С. 6–19.
4. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. — Москва: Мир, 1976. — 436 с.
5. Товкач Ф. И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. — 1998. — **67**, № 6. — С. 767–774.
6. Kado C. I., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. — 1981. — **145**, No 3. — P. 1365–1373.
7. Товкач Ф. И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. — 2001. — **70**, № 6. — С. 804–810.
8. 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**, No 5. — P. 3013–3023.
9. Кушклина А. И., Романюк Л. В., Горб Т. Е., Товкач Ф. И. Влияние профага ZF40 на секрецию пектатлазы у *Erwinia carotovora* // Доп. НАН України. — 2006. — № 6. — С. 154–156.

10. Товкач Ф. И. Изучение фагоустойчивости *Erwinia carotovora* с помощью умеренного бактериофага ZF40 // Микробиология. – 2002. – 71, № 1. – С. 82–88.

*Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев*

Поступило в редакцию 06.04.2009

F. I. Tovkach, L. V. Romanyuk, T. E. Gorb

The selection of populative dissociants of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* with the use of macromolecular bacteriocins

*We propose a method of specific selection of dissociants of various strains of *Erwinia carotovora*, by using carotovoricins that are identical to the phage tails. It is shown the spontaneous dissociants and those which were obtained by the selection of bacteriocins differ by morphological and growing features and by the synthesis of outer pectinase. It is found that the modifications of the surface structures of dissociants are the reason for the change of mode secretions of II and III types – the main factors of pathogenicity of pectolytic erwinia. The obtained data are the prerequisite for studying the direction and the mechanism of dissociation of such practically important bacteria as *E. carotovora*.*