УДК 578.81+57.083.33

© 2012

Л. А. Максименко, Ф. И. Товкач

Серологическое родство белков бактериоцинов *Erwinia carotovora*, выделенных из различных экологических ниш, со структурными белками бактериофага ZF-40

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Н. Я. Спиваком)

С помощью антисыворотки, полученной к бактериоцинам типа фаговых хвостовых отростков, макромолекулярных каротоворицинов (MCTV), выделенных из Erwinia carotovora subsp. carotovora (Ecc) J2 (Япония), выявлены серологически родственные белки в каротоворицинах Ecc 2M (Россия), Ecc 62A (Беларусь) и Ecc 153 (США), а также показано серологическое родство белков бактериоцинов с белками бактериофага ZF-40. Антисыворотка оказывает нейтрализующее действие на бактериоцины, выделенные из E. carotovora различных экологических ниш, относительно индикаторных штаммов эрвиний и не снижает киллерную активность каротоворицинов в отношении бактерий Escherichia coli, кроме бактериоцинов американского штамма Ecc 153. Лизирующая активность бактериофага ZF-40 после обработки его антисывороткой, полученной к бактериоцинам, снижается.

Известно, что некоторые виды энтеробактерий могут синтезировать такие производные фагового вириона, как хвостовые отростки [1–3]. При лизогенной индукции клетки многих штаммов фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* продуцируют фаговые отростки длиной 128–192 нм, несколько типов головок диаметром 18, 56, 70 и 95 нм и структуры типа базальных пластинок шириной от 39 до 53 нм [4]. Существует мнение, что различные штаммы пектолитических бактерий *E. carotovora* персистируют в природе как сложные дефектно-полилизогенные системы и их умеренные вирусы распространены в таком же количестве, как и полноценные бактериофаги. Изучение полипептидного состава каротоворицинов и их киллерной специфичности у *E. carotovora* показало, что в одном и том же штамме может находиться не менее трех различных типов биологически активных хвостовых отростков неполных умеренных бактериофагов [5].

Кроме макромолекулярных каротоворицинов (MCTV), у *E. carotovora* существует множество мелких бактериоцинов или колициноподобных каротоворицинов (CCTV) [6–8].

Существует генетическое родство между различными бактериоцинами и специфическими белками фитопатогенных бактерий. Так, у *Pectobacterium carotovorum* 21 определена локализация генов на геномной ДНК, которые кодируют кароцин D. Эти гены кодируют также белок иммунности [6].

Гены, кодирующие бактериоцин S1 у *E. carotovora*, гомологичны генам пиоцина S3 и пиоцина AP41 *Pseudomonas aeruginosa*. Эти гены также кодируют нуклеазу, поэтому кароцин S1 обладает ДНКазной активностью [7].

Однако природа множественности профаговых элементов у бактерий и ее экологическая роль пока еще мало исследованы. В связи с изложенным представляет интерес изу-

чение родственности и отличий неполных и полноценных бактериофагов *Erwinia carotovora*.

Целью исследования было с помощью антисыворотки, полученной к каротоворицинам *E. carotovora subsp. carotovora (Ecc)* J2, изучить серологическое родство белков каротоворицинов, выделенных из эрвиний разных экологических ниш.

При выполнении работы использовали штаммы *E. carotovora*, полученные на территории России (*Ecc* 2M), Беларуси (*Ecc* 62A), США (*Ecc* 153) и Японии (J2). Были выделены бактериоцины типа фаговых хвостовых отростков. Для этого выращивание бактериальных клеток и индукцию бактериоцинов проводили как описано в [4]. К лизату прибавляли сульфат аммония до концентрации 50% в присутствии 0,1 M NaCl. Преципитат частиц осаждали центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 30 мин. Осадки ресуспендировали в А-буфере [4] с добавлением 20 мМ $MgSO_4$. Затем суспензию обрабатывали РНКазой и ДНКазой из расчета 1 мкг/мл, 30 мин при 37 °C. Смесь бактериоцинов разделяли в роторе SW-40 центрифуги Beckman при 30000 об/мин в течение 4 ч в сахарозном градиенте (5–20%), содержащем 20% спирта в 0,01 M *трис*-HCl буфере, pH 7,2. Осадки каротоворицинов ресуспендировали в буфере А, не содержащем глюкозы, диализировали против физраствора и использовали для дальнейших исследований. К бактериоцинам *Ecc* J2 получали кроличью антисыворотку.

Концентрацию белка бактериоцинов определяли по оптической плотности раствора при длине волны 278 нм на спектрофотометре Specord. Согласно J. F. Shepard и G. A. Socor [9], 12,3 опт. ед. соответствуют 1 мг/мл белка. Белковую смесь бактериоцинов в концентрации 4 мг/мл смешивали с равным объемом адьюванта Фрейнда и иммунизировали кроля подкожно. Через 30 сут его реиммунизировали, затем по истечении 7 сут отбирали кровь, отделяли сыворотку, титровали и использовали ее для серологических реакций [9].

Бактериофаг ZF-40 получали методом слитного лизиса [10].

Серологическое родство белков бактериоцинов, выделенных из бактерий разных экологических ниш, со структурными белками бактериофага ZF-40 определяли методом двойной иммунодиффузии в 1% агарозе по O. Ouchterlony [11].

В результате проведенной реакции оказалось, что с сывороткой, полученной к бактериоцинам, выделенным из *Ecc* J2, прореагировали как белки бактериоцинов бактерий различных экологических ниш, так и белки, входящие в состав частиц бактериофага ZF-40 (рис. 1). Это может свидетельствовать о серологической родственности структурных белков бактериоцинов и бактериофага ZF-40 фитопатогенной бактерии *E. carotovora*. В литературе также имеются сведения о генетическом родстве бактериоцинов и бактериофагов [12].

Активность бактериоцинов и нейтрализующее их действие сыворотки определяли на индикаторных культурах *Ecc* 66A, RC 5297, а также *E. coli* B и K12. Бактериоцины, предварительно обработанные полученной нами антисывороткой, утрачивают киллерную активность относительно индикаторных штаммов *E. carotovora* (рис. 2). Однако она не влияет на активность бактериоцинов, выделенных из японского, российского и беларусского штаммов, которые способны убивать клетки *E. coli* (рис. 3). Только лизирующее действие бактериоцинов американского штамма *Ecc* 153 нейтрализуется исследуемой сывороткой и относительно бактерий *E. coli*. Можно предположить, что белки, имеющие в своем составе последовательности с общими антигенными детерминантами, сопряжены с киллерной специфичностью некоторых бактериоцинов. Ранее [13] были описаны колиспецифические макромолекулярные каротоворицины штамма *E. carotovora sp. carotovora Ec* 153, обладающие неспецифической

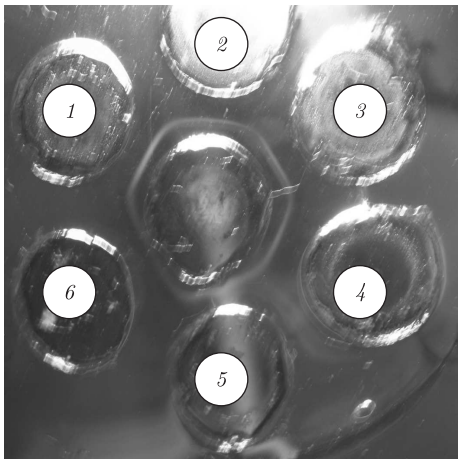


Рис. 1. Реакция иммунопреципитации белков бактериоцинов, выделенных из бактерий *E. carotovora* разных экологических ниш, и бактериофага ZF-40 с сывороткой, полученной к MCTV.
В центре — сыворотка, полученная к MCTV, выделенных из *E. carotovora* (штамм J2); *1*, *2*, *3*, *4*, *5* — соответственно бактериоцины из *Ecc* J2 (Япония), *Ecc* 62A (Беларусь), *Ecc* 2M (Россия), *Ecc* 153 (США) и бактериофаг ZF-40, *6* — низкомолекулярный бактериоцин *Ecc* J2

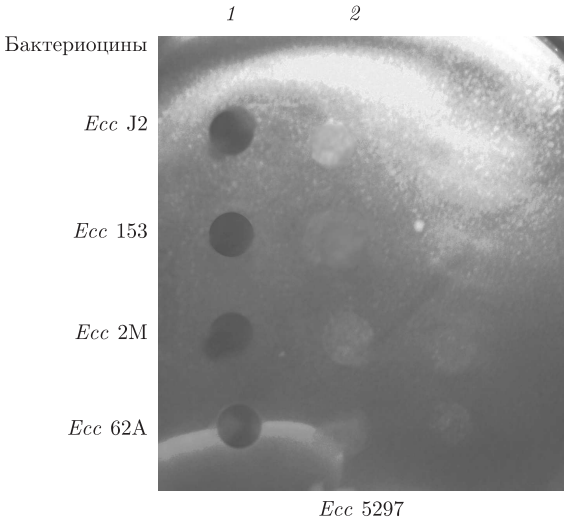


Рис. 2. Активность бактериоцинов до (*1*) и после (*2*) обработки антисывороткой относительно *E. carotovora* штамма 5297

эндонуклеазной активностью. Возможно, наряду со специфическими к *E. carotovora* бактериоцинами штамм *Ec* 153 содержит бактериоцины, которые полностью инактивируются действием исследуемой антисыворотки. Исходя из этого можно сделать вывод, что бактериоцины, полученные из бактерий *E. carotovora* разных экологических ниш, отличаются по своему составу. Штамм *Ecc* 153, выделенный в Америке, в отличие от других штаммов эрвиний продуцирует только бактериоцины, которые полностью инактивируются антисывороткой, полученной к бактериоцинам *E. carotovora* японского штамма J2. Остальные бактерии синтезируют отличающуюся смесь бактериоцинов: как минимум один из них не инактивируется антисывороткой и сохраняет киллерную активность относительно бактерий *E. coli*.

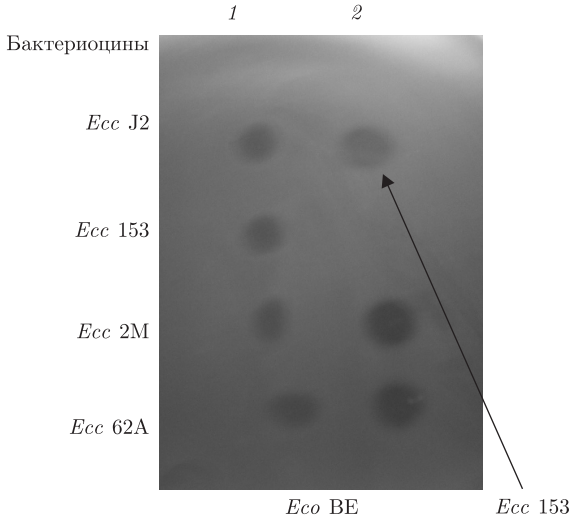
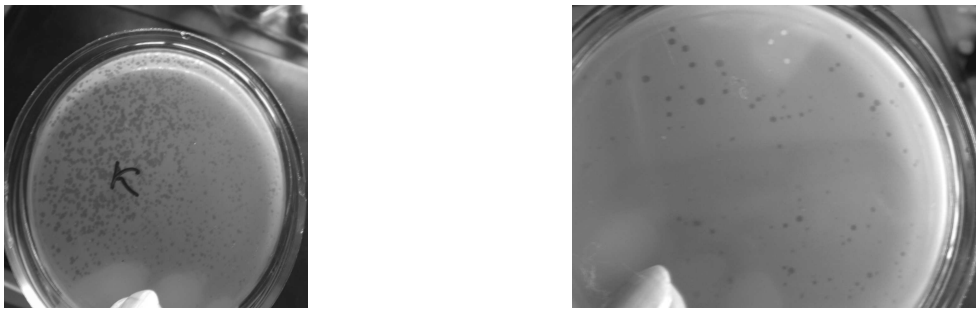


Рис. 3. Активность бактериоцинов до (*1*) и после (*2*) обработки антисывороткой относительно *E. coli* штамма BE



а *б*

Рис. 4. Лизирующая активность бактериофага ZF-40: *а* — контроль; *б* — бактериофаг, обработанный сывороткой, полученной к MCTV

Нейтрализующее действие антисыворотки по отношению к бактериофагу ZF-40 определяли на индикаторной культуре *E. carotovora* RC 5297.

Оказалась, что предварительная обработка бактериофага антисывороткой в течение 10 мин уменьшает количество бляшек на чувствительной культуре в 20 раз по сравнению с контролем. В контрольную чашку вносили такое же количество фага, как и в опытную (рис. 4).

Таким образом, фитопатогенные бактерии *E. carotovora* из разных экологических ниш имеют серологически родственные белки в составе бактериоцинов, которые, возможно, сопряжены с их киллерной специфичностью. В составе структурных белков бактериофага ZF-40 и бактериоцинов методом O. Ouchterlony также выявлены серологически родственные белки. Полученная к бактериоцинам антисыворотка инактивирует действие как бактериоцинов, так и лизирующую активность бактериофага ZF-40.

1. *Nguyen A. H., Tomita T., Hirota M. et al.* A simple purification method and morphology and component analyses for carotovoricin Er, a phage – tail-like bacteriocin from the plant pathogen *Erwinia carotovora* // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1999. – **63**, No 10. – P. 1360–1369.

2. *Strauch E., Kaspar H., Schaudinn C. et al.* Characterization of enterocoliticin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic Yersinia enterocolitica strains // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – **67**, No 12. – P. 5634–5642.
3. *Thaler J.-O., Baghdiguian S., Boemare N.* Purification and characterization of xenorhabdicin, a phage tail-like bacteriocin, from the lysogenic strain F1 of *Xenorhabdus nematophilus* // Ibid. – 1995. – **61**, No 5. – P. 2049. – 2052.
4. *Товкач Ф. И.* Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – **71**, № 3. – С. 359–367.
5. *Товкач Ф. И., Максименко Л. А.* Полипептидный состав и киллерная специфичность как показатели множественности каротоворицинов // Микробиол. журн. – 2010. – **72**, № 5. – С. 41–48.
6. *Eunjung Roh, Tae-Ho Park, Myung-il Kim et al.* Characterization of a New Bacteriocin? Carocin D, from *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* Pcc21 // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – **76**, No 22. – P. 7541–7549.
7. *Chuang D., Chien Yu., Wu H.* Cloning and Expression of the *Erwinia carotovora subsp. carotovora* Gene Encoding the Low-Molecular-Weight Bacteriocin carocin S1 // J. Bacteriol. – 2007. – **189**, No 2. – P. 620–626.
8. *Товкач Ф. И.* Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 1998. – **67**, № 6. – С. 767–774.
9. *Shepard J. F., Socor G. A.* Detection of potato virus X in infected plant tissue by radial and double-diffusion test in agar // Phytopathology. – 1969. – **59**, No 12. – P. 1838–1844.
10. *Панщина А. И., Товкач Ф. И., Романюк Л. В., Максименко Л. А.* Физико-химические свойства умеренного бактериофага ZF-40 *Erwinia carotovora* // Мікробіол. журн. – 2007. – **69**, № 2. – С. 15–22.
11. *Ouchterlony O.* Antigen-antibody reactions in gels // Hadbook of immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. – Ann Arbor, MI: Ann Arbor Sci. Publ., 1968. – P. 37.
12. *Nakayama K., Takashima K., Ishihara H. et al.* The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage // Mol. Microbiol. – 2000. – **38**, No 2. – P. 213–231.
13. *Крылова Е. Д., Товкач Ф. И.* Характеристика колиспецифических бактериоцинов *Erwinia carotovora subsp. carotovora Ec*153 // Мікробіол. журн – 2009. – **71**, № 3. – С. 25–30.

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

Поступило в редакцию 02.11.2011

Л. О. Максименко, Ф. І. Товкач

Серологічна спорідненість білків бактеріоцинів *Erwinia carotovora*, виділених з різних екологічних ніш зі структурними білками бактеріофага ZF-40

За допомогою антисироватки, одержаної до бактеріоцинів типу фагових хвостових відростків, макромолекулярних каротоворицинів (MCTV), виділених з Erwinia carotovora subsp. carotovora (Ecc) J2 (Японія), виявлені серологічно споріднені білки в каротоворицинах Ecc 2M (Росія), Ecc 62A (Білорусь) та Ecc 153 (США), а також показано серологічну спорідненість білків бактеріоцинів з білками бактеріофага ZF-40. Антисироватка виявляє нейтралізуючу дію на бактеріоцини, виділені з E. carotovora різних екологічних ніш, відносно індикаторних штамів ервіній і не знижує кілерну активність каротоворицинів щодо бактерій Escherichia coli, крім бактеріоцинів американського штаму Ecc 153. Лізуюча активність бактеріофага ZF-40 після обробки його антисироваткою, одержаною до бактеріоцинів, знижується.

L. A. Maksymenko, F. I. Tovkach

Serological relationship of bacteriocins' proteins of *Erwinia carotovora* isolated from various ecological regions and with structural proteins of bacteriophage ZF-40

With the help of antiserum, which was obtained to phage-tail-like bacteriocins, of macromolecular carotovoricins (MCTV) isolated from Erwinia carotovora subsp. carotovora (Ecc) J2 (Japan), we discovered the serological related proteins of carotovoricins of Ecc 2M (Russia), Ecc 62A (Belorussia), Ecc 153 (USA) strains and revealed the serological relation of proteins of bacteriocins proteins of bacteriophage ZF-40. The obtained antiserum expresses the neutralization action to bacteriocins, which were isolated from E. carotovora in various ecological regions, as to indicator strains of Erwinia and doesn't reduce the killer activity of carotovoricins as to bacteria of Escherichia coli besides the bacteriocins of american strains Ecc 153. After the action of antiserum which was obtained as to bacteriocines, the lysing activity of bacteriophage ZF-40 is decreasing.