

Л. О. Максименко, С. І. Войчук

Множинність бактеріоцинів, одержаних з природних ізолятів пектолітичних фітопатогенних бактерій *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, виділених у різних областях України

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Б. П. Мацелюхом)

Ізоляти фітопатогенних бактерій *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б1, Б3, Б4, Б11, Б12, Б13, Б15, Б16, Б17, Б23, Б26, виділені з бульб картоплі, вирощеної в різних регіонах України, з симптомами м'якої гнилі, здатні продукувати велику кількість високомолекулярних бактеріоцинів (МСТV). Досліджена їх кілерна активність відносно лабораторних штамів *P. carotovorum* і *Escherichia coli*. Одержані очищені фракції МСТV. Електронно-мікроскопічні дослідження показали, що вони мають вигляд хвостових відростків бактеріофагів різної довжини, а також сферичних часток різного діаметра. Виявлені серологічно споріднені білки у складі МСТV ізолятів природних штамів *P. carotovorum* та бактеріофага ZF-40 за допомогою антисироваток, одержаних до МСТV колекційного штаму *P. carotovorum* J2 NCPPB 1744 та бактеріофага ZF-40. Цей факт може також свідчити про фагову природу виділених кілерних часток.

Актуальним завданням сучасності є пошук нових природних антибіотичних речовин. Частки з антибактеріальними властивостями здатні продукувати фітопатогенні бактерії *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (раніше *Erwinia carotovora*). Під дією на них певних індукторів, наприклад налідиксової кислоти, мітоміцину С, УФ-випромінювання та ін., бактерії утворюють дефектні продукти під час фагової збірки — високомолекулярні бактеріоцини (МСТV) і низькомолекулярні кілерні частки (СТV) [1, 2]. При цьому повноцінні фагові частки не утворюються. Наявність бактеріоцинів відображає дефектно-лізогенний стан бактерій. Відомо, що клітини одного й того ж штаму ервіній можуть нести декілька різних типів фагових хвостових відростків і фагових головок [3]. Велика увага приділяється вивченню їх кілерної активності відносно родини Enterobacteriaceae з метою з'ясування можливості використання їх властивостей у народному господарстві.

Для виділення і вивчення властивостей бактеріоцинів у дослідженні використовували ізоляти штамів пектолітичних фітопатогенних бактерій з бульб *Solanum tuberosum* L., вирощеної в різних областях України (табл. 1).

Таблиця 1. Штами бактерій, використані в дослідженні (автор штамів Ф. І. Товкач)

Авторський номер штаму	Рік виділення	Місце виділення
Б1	1998 [1]	Черкаська обл.
Б3, Б4	2003 [2]	Чернігівська обл.
Б13, Б15	2003 [2]	Київська обл., Новосілки
Б2, Б11, Б12, Б16, Б17, Б23	2003 [2]	Київська обл., Васильків
Б26	2003 [2]	Вінницька обл., Сокільці

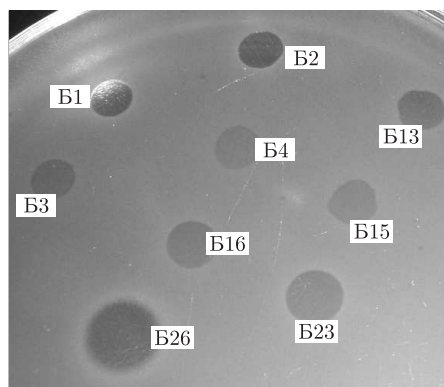


Рис. 1. Лізуюча активність МСТV, виділених із штамів *P. carotovorum*, ізолюваних в різних областях України

На основі одержаних біологічних, біохімічних, електронно-мікроскопічних та електрофоретичних даних нами було ідентифіковано ізоляти штамів фітопатогенних пектолітичних бактерій Б1, Б2, Б3, Б4, Б11, Б12, Б13, Б15, Б16, Б17, Б23, Б26 з різних областей України як *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Їх властивості подібні до таких типового штаму *P. carotovorum* J2 NCPPV 1744 [4]. Для вирощування бактерій використовували рідкі та агаризовані поживні середовища. Агаризовані поживні середовища містили 1,4% агару. Як джерело вуглецю використовували глюкозу і пектин. Мінімальне рідке середовище (М 9) містило: Na_2HPO_4 — 6 г/л, KH_2PO_4 — 3 г/л, NaCl — 0,5 г/л, NH_4Cl — 1 г/л. Після стерилізації на 1 л середовища добавляли 1 мл 1 М розчину $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 мкл 10% CaCl_2 і глюкозу в кінцевій концентрації 0,2 % [1–4]. Підрощування бактерій і індукцію бактеріоцинів проводили як описано раніше в [1, 2]. Суміш бактеріоцинів розділяли центрифугуванням у центрифугі Beckman при 30 000 об./хв протягом 4 год у сахарозному градієнті (5–20%), з вмістом 10–20% етилового спирту. Осади МСТV ресуспендували і діалізували в буфері М 9 без глюкози. Як індикаторні штами для визначення лізуючої активності каротоворіцинів використовували *P. carotovorum*: *Pca 18SS*, *Pca RC 5297*, *Pca 50R1*, а також *E. coli*: *ECO BE*, *ECO K12*.

На рис. 1 проілюстровано лізуючу активність досліджуваних штамів бактерій відносно лабораторного штаму *P. carotovorum*: *Pca 18SS*.

З табл. 2 видно, що ізоляти штамів *P. carotovorum* містять бактеріоцини, які лізують клітини бактерій-індикаторів по-різному. МСТV не можуть адсорбуватися на клітинах, з яких вони були виділені. Також є відмінність між чутливістю досліджуваних бактерій, виділених у різних регіонах України, до бактеріоцинів один одного. Це може свідчити про те, що бактерії відрізняються за набором бактеріоцинів або на поверхні їх клітин відсутні відповідні прикріплювальні рецептори.

З метою дослідження множинності бактеріоцинів очищені препарати наносили на сіточки з нітроцелюлозними підтримуючими плівками і контрастували 2% уранілацетатом. Електронно-мікроскопічні дослідження проводили за допомогою мікроскопа JEOL 1400 при інструментальному збільшенні 20 000–40 000. У складі природних штамів *P. carotovorum*, виділених у різних областях України, виявлені частки у вигляді нескорочених стержнів (МСТV) завдовжки від 550 до 780 нм; дрібні сферичні бактеріоцини діаметром 15–20 нм, МСТV у вигляді скорочених хвостових відростків завдовжки 120–170 нм, а також сферичні частки, які нагадують фагові головки різного діаметра (50–120 нм) (рис. 2). Однак механіз-

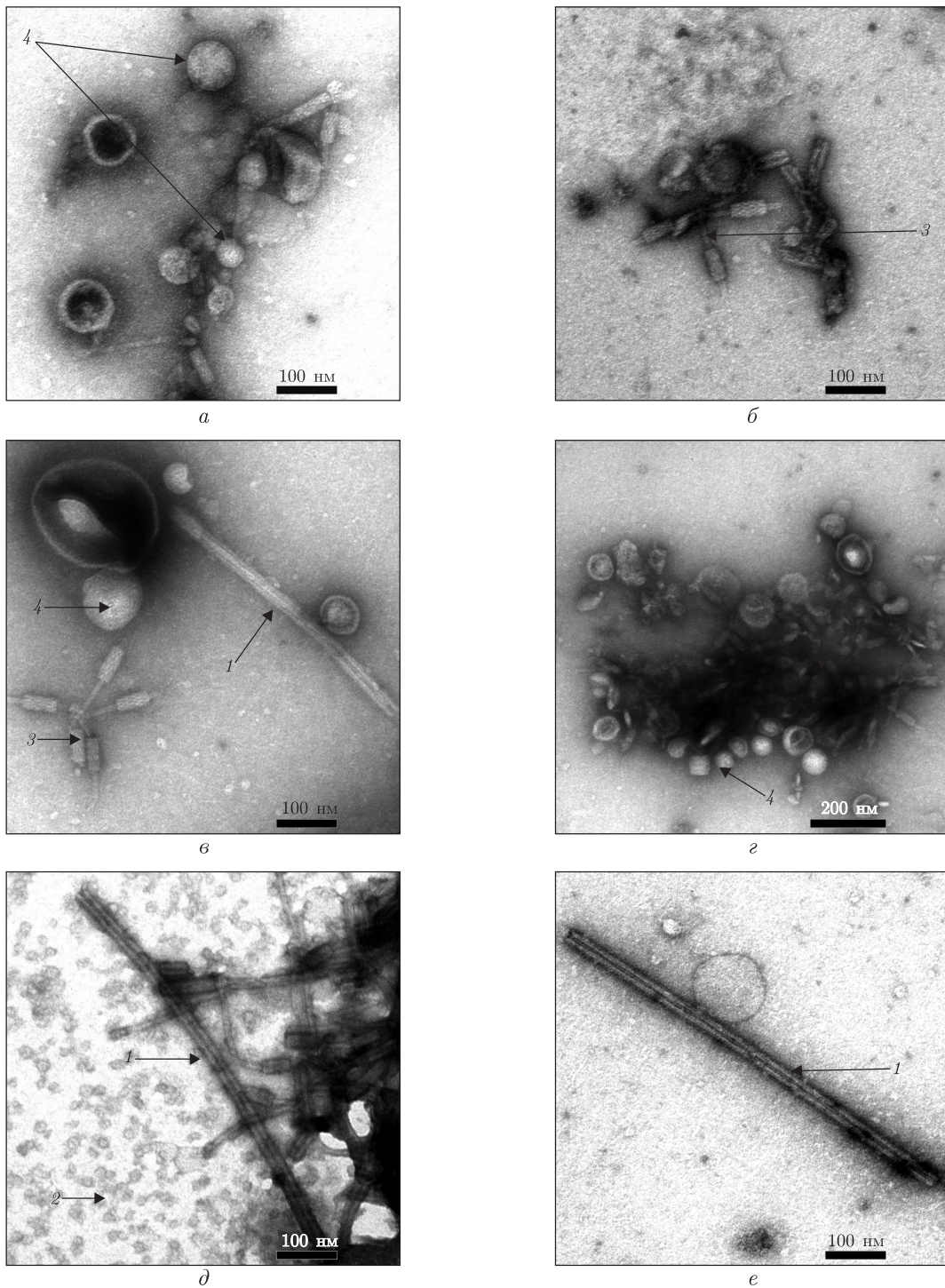


Рис. 2. Електронно-мікроскопічне дослідження суміші МСТВ з ізолятів *P. carotovorum*, одержаних в різних областях України:

1 — частки у вигляді нескорочених жорстких стержнів, завдовжки 550–780 нм (штами Б1, Б4); 2 — дрібні сферичні бактеріюцини діаметром 15–20 нм (Б1, Б2, Б3, Б15); 3 — МСТВ у вигляді скорочених хвостових відростків завдовжки 120–170 нм (Б1, Б16); 4 — частки у вигляді фагових головок різного діаметра (\approx 50–120 нм) (всі штами)

ми утворення множинності профагів у бактерій *P. carotovorum*, їх взаємозв'язок і екологічна роль поки що мало досліджені.

Раніше нами за допомогою антисироватки до каротоворицинів типу фагових хвостових відростків *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* J2, а також антисироватки до структурних білків бактеріофага ZF-40 методом перехресної реакції подвійної імунодифузії в агарозному гелі були одержані смуги преципітації, що свідчило про наявність серологічно споріднених білків у бактеріоцинах *P. carotovorum* і в складі бактеріофага ZF-40. Бактеріофаг ZF-40 виділяли методом злитого лізису [5]. До бактеріофага ZF-40 і бактеріоцинів типового штаму J2 одержували антисироватку методом, описаним у [6].

Методом імуноблотингу з використанням антисироватки, одержаної до МСТV, виявлені серологічно споріднені білки з молекулярними масами 78, 56, 39, 20 і 18 кД у бактеріоцинів та 72 і 39 кД у бактеріофага ZF-40 [7].

Із застосуванням методу Ouchterlony [8] в дослідженні природних ізолятів *P. carotovorum*, виділених у різних областях України, за допомогою антисироватки, одержаної до бактеріофага ZF-40 (рис. 3, у центрі), виявлені серологічно споріднені, але неідентичні білкові компоненти у складі бактеріофага ZF-40 та МСТV з різних штамів *P. carotovorum*. Про це свідчить наявність "шпори" між смугами преципітації антигенів з антитілами. Таким чином, за допомогою антисироватки, одержаної до бактеріофага ZF-40, встановлено, що у складі МСТV штамів Б1, Б2, Б16, Б23 наявні серологічно споріднені та ідентичні білки, а штами Б3, Б4, Б12, Б13, Б15 виділяють бактеріоцини, які мають у своєму складі серологічно споріднені, але неідентичні білкові компоненти з білками бактеріофага ZF-40.

За допомогою антисироватки до МСТV, виділених з колекційного штаму *P. carotovorum* J2, у складі бактеріоцинів, одержаних з "українських" ізолятів, а також у складі бактеріофага ZF-40 методом подвійної дифузії в агарозному гелі виявлені лише серологічно споріднені і ідентичні білкові компоненти (рис. 4).

Отже, результати дослідження показують, що ізоляти *P. carotovorum* з різних регіонів України під дією налідиксової кислоти виділяють велику кількість дефектних часток, які, імовірно, являють собою продукти збірки дефектних помірних фагів при SOS-індукції лізогенних клітин. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Б1, Б3, Б4, Б11, Б12,

Таблиця 2. Лізуюча активність МСТV відносно лабораторних штамів і бактеріоциночутливість ізолятів штамів *P. carotovorum* з різних регіонів України до МСТV один одного

МСТV штамів бактерій	Лізуюча активність МСТV на індикаторні штами					Чутливість ізолятів <i>P. carotovorum</i> до бактеріоцинів один одного									
	Рса 18SS	Рса RC 5297	Рса 50R1	ЕСО VE	ЕСО K12	Б1	Б2	Б3	Б4	Б11	Б12	Б15	Б16	Б23	
J2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Б1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
Б2	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
Б3	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
Б4	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
Б11	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Б12	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Б13	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
Б15	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
Б16	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
Б23	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Б26	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	

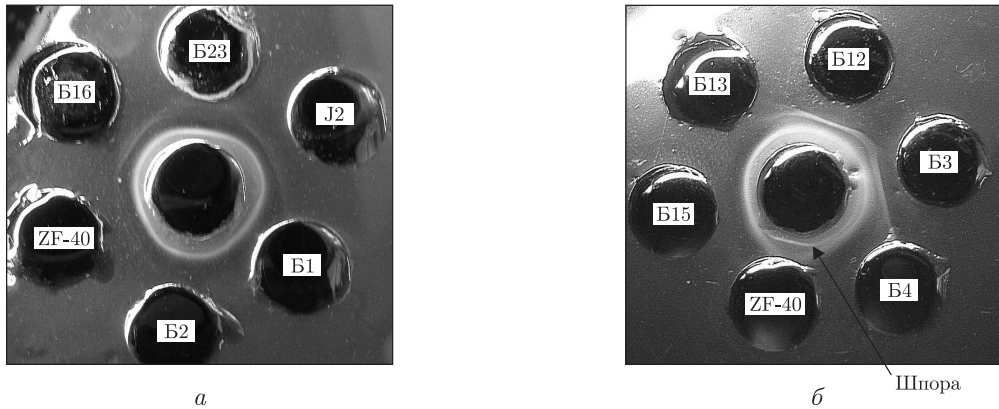


Рис. 3. Реакція імунопреципітації в агарозному гелі з використанням сироватки, одержаної до білкових компонентів бактеріофага ZF-40 (в центрі), з білками МСТV, виділених з пектолітичних бактерій різних регіонів України та бактеріофага ZF-40:

a — серологічно споріднені та ідентичні білки;

б — серологічно споріднені, але неідентичні білкові компоненти у складі бактеріофага ZF-40 та МСТV

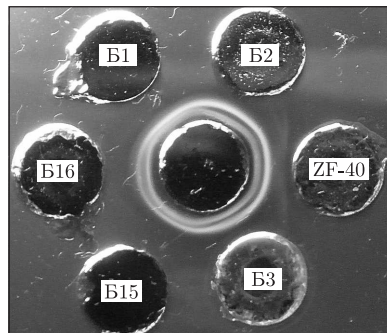


Рис. 4. Реакція імунопреципітації в агарозному гелі з використанням сироватки, одержаної до білкових компонентів МСТV (в центрі), з білками МСТV, виділених з пектолітичних бактерій різних регіонів України та бактеріофага ZF-40

Б13, Б15, Б16, Б17, Б23, Б26, крім хвостових відростків різної довжини, продукують і такі частки фагової природи, як сферичні частки, що нагадують фагові головки різного діаметра. При цьому фагоподібні частки відрізняються не тільки за лінійними розмірами, але й за морфолого-структурною організацією. Виявлені серологічно споріднені білки у складі МСТV ізолятів природних штамів *P. carotovorum* та бактеріофага ZF-40 за допомогою антисироваток, одержаних до МСТV колекційного штаму J2 та бактеріофага ZF-40, також свідчать про фагову природу виділених кілерних часток.

Таким чином, наведені результати ще раз підтверджують отримані раніше дані про те, що різні штами фітопатогенних пектолітичних бактерій *P. carotovorum* персистують у природі як дефектно-полілізогенні системи, включаючи ізоляти, виділені в різних областях України. Дефектна лізогенія тісно пов'язана з бактеріоциногенністю, носіями якої є макромолекулярні бактеріоцини. МСТV, отримані з лізатів нових ізолятів бактерій *P. carotovorum*, продукуються у великій кількості, відрізняються за розміром і мають різні морфолого-структурні показники.

Автори висловлюють подяку Ю. В. Файдюк за допомогу в роботі.

1. Товкач Ф. И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 1998. – **67**, № 6. – С. 767–774.
2. Товкач Ф. И., Муквич Н. С. Изучение бактериоцинов *Erwinia carotovora* с помощью бактериальных индикаторов, устойчивых к налиндиксовой кислоте // Там же. – 2003. – **72**, № 2. – С. 199–205.
3. Товкач Ф. И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Там же. – 2002. – **71**, № 3. – С. 359–367.
4. Максименко Л. А., Пархоменко Н. И., Мороз С. Н., Горб Т. Е. Изучение свойств изолятов пектолитических фитопатогенных бактерий, выделенных в Украине // Микробиол. журн. – 2013. – **75**. № 6. – С. 66–72.
5. Паницина А. И., Товкач Ф. И., Романюк Л. В., Максименко Л. А. Физико-химические свойства умеренного бактериофага ZF-40 *Erwinia carotovora* // Микроб. журн. – 2007. – **69**, № 2. – С. 15–22.
6. Максименко Л. А., Товкач Ф. И. Серологическое родство белков бактериоцинов *Erwinia carotovora*, выделенных из различных экологических ниш, со структурными белками бактериофага ZF-40 // Доп. НАН України. – 2012. – № 7. – С. 158–163.
7. Максименко Л. А., Пархоменко Н. И. Серологически родственные белки в составе бактериоцинов типа фаговых хвостовых отростков и бактериофага ZF-40 *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* // Там само. – 2013. – № 12. – С. 144–148.
8. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels // In Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis. – Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Sci. Publ., 1968. – P. 37.

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

Надійшло до редакції 24.09.2014

Л. А. Максименко, С. И. Войчук

Множественность бактериоцинов, полученных из природных изолятов пектолитических фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*, выделенных в разных областях Украины

*Изоляты фитопатогенных бактерий *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* B1, B3, B4, B11, B12, B13, B15, B16, B17, B23, B26, выделенные из клубней картофеля, выращенного в разных регионах Украины, с симптомами мягкой гнили, способны продуцировать множество высокомолекулярных бактериоцинов (МСТV). Исследована их киллерная активность относительно лабораторных штаммов *P. carotovorum* и *Escherichia coli*. Получены очищенные фракции МСТV. Электронно-микроскопические исследования показали, что они имеют вид хвостовых отростков бактериофагов разной длины, а также сферических частиц разного диаметра. Выявлены серологически родственные белки в составе МСТV изолятов природных штаммов *P. carotovorum* и бактериофага ZF-40 с помощью антисывороток, полученных к МСТV коллекционного штамма *P. carotovorum* J2 NCPPB 1744 и бактериофага ZF-40. Этот факт может также свидетельствовать о фаговой природе выделенных киллерных частиц.*

L. A. Maksymenko, S. I. Voychuk

Multiplicity of bacteriocins obtained from natural strains of pectolytic phytopathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* isolated in various regions of Ukraine

*Phytopathogenic bacteria *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* strains B1, B3, B4, B11, B12, B15, B16, B17, B23, B26 isolated from potato tubers grown in various regions of Ukraine with symptoms of soft rot disease are able to produce a variety of macromolecular bacteriocins (MCTV). Their killing activity against laboratory strains of *P. carotovorum* and *Escherichia coli**

is studied. Pure fractions of MCTV are obtained. Electron microscopic analysis showed them to have shape of bacteriophage tails of various lengths, as well as phage capsids of various diameters. Serologically related proteins within MCTV of natural P. carotovorum strains and bacteriophage ZF-40 are detected, by using antiserum against MCTV of collection strain P. carotovorum J2 NCPPB 1744 and bacteriophage ZF-40. This fact can also be indicative of the phage nature of obtained killing particles.