

УДК 579.869.1.826.2

Ф. І. Товкач

д. б. н.

Л. О. Максименко

к. б. н.

О. Б. Балко

аспірант

Інститут мікробіології і вірусології НАН України

## МНОЖИННІСТЬ БАКТЕРІОЦИНІВ *ERWINIA CAROTOVORA*

Дія налідиксової кислоти на клітини *Erwinia carotovora* призводить до виділення суміші бактеріоцинів із різною біологічною активністю. Використовуючи метод іонообмінної хроматографії, нам вдалося розділити каротоворіцини у відповідності із показником кілерної активності щодо різних індикаторних культур.

### Постановка проблеми

Для виживання і повноцінної адаптації в навколишньому середовищі мікроорганізми застосовують широкий арсенал різноманітних засобів. В конкурентних умовах існування бактерії часто використовують такі кілерні фактори, як бактеріоцини [8]. Відомо два види цих літичних агентів – коліциноподібні і макромолекулярні (бактеріоцини типу фагових хвостових відростків).

У широко розповсюдженій фітопатогенній бактерії *Erwinia carotovora*, яка здатна викликати м'яку гниль у різноманітних рослинах, виявлено обидва види каротоворіцинів (СТВ) – коліциноподібні (ССТВ) і макромолекулярні (МСТВ). Вони утворюються при дії на клітини ервіній індукуючих факторів, які руйнують ДНК або порушують її синтез – УФ опромінення, налідиксова кислота, мітоміцин С та ін. Широке розповсюдження МСТВ дозволяє розглядати дефектну лізогенію у *E. carotovora* як видову ознаку [6]. Було також встановлено, що дефектна лізогенія в цієї бактерії є множинною і проявляється через різну біологічну специфічність МСТВ [3].

Дослідження макромолекулярних каротоворіцинів дозволяє не лише встановити їх природу і походження, але й визначити механізми виникнення профагових дефектів. Крім того, фундаментальне дослідження бактеріоцинів має також і практичне значення. Воно обумовлене широким спектром антибактеріальної дії цих кілерів по відношенню не лише до близькоспоріднених фітопатогенних бактерій, але й до інших представників родини *Enterobacteriaceae* [2].

### Завдання досліджень

Мета нашої роботи полягала в роздільному отриманні бактеріоцинів за допомогою традиційних біохімічних методів. Для досягнення цієї мети було проведено наступні дослідження. Використовуючи налідиксову кислоту, ми отримували лізати клітин *E. carotovora* та концентрували їх

© Ф. І. Товкач, Л. О. Максименко, О. Б. Балко

преципітацією за допомогою ПЕГ–6000, ультрацентрифугуванням і висолюванням сульфатом амонію. Для розділення суміші на окремі активні компоненти застосовували іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-целюлозі. Показником множинності лізогенії була кілерна активність бактеріоцинів, яка визначалася на двох основних індикаторних культурах – *E. carotovora* і *Escherichia coli*.

### Об'єкти досліджень

Як продуцент бактеріоцинів застосовували штам *E. carotovora subsp. carotovora* (ЕСА) J2. Як індикаторні культур були використані штами *E. carotovora* ЕСА 66А і ЕСАМ2-4/RI, а також *E. coli* ВЕ (ЕСО ВЕ) і К12 (ЕСО К12).

Для індукції СТV клітини продуцента вирощували в мінімальному середовищі М9 протягом 18 годин. Отриману добову культуру підрощували протягом 3 год при 28°C та інтенсивній аерації і добавляли налідиксову кислоту до кінцевої концентрації – 20 мг/мл. Після цього бактерії інкубували протягом 3 год в аналогічних умовах. Подальший ріст культури зупиняли за допомогою внесення хлороформу у співвідношенні 1:100 до, об'єму. Для підвищення виходу бактеріоцинів суспензію залишали на ніч при кімнатній температурі. Від залишків бактеріальних клітин лізат звільняли центрифугуванням протягом 30 хв при 6 тис. об/хв і температурі 4°C на центрифугі РС-6. До аліквот (20 мл) надосаду добавляли до кінцевих концентрацій 40–70 %. сірчаноокислий амоній Потім розчини осаджували при 10 тис. об/хв (20 хв., 4°C) на центрифугі К-24. Отриманий осад ресуспензували в 0,01 М фосфатному буфері (РВ), рН=7,2 – буфер РВ. Суспензію діалізували проти РВ при 4°C протягом 24 год.

Крім висолювання сульфатом амонію, суміш бактеріоцинів преципітували ПЕГ–6000 [9]. Частки МСТV концентрували також за допомогою ультрацентрифугування при 28 тис. об/хв (90хв, t=10°C) на центрифугі УЦП-50. Отриманий осад ресуспензували в 2 мл буферу STMG [1].

Концентровані суміші каротоворіцинів розділяли, використовуючи іонообмінну хроматографію на колонці із ДЕАЕ-целюлозою: 17×50 мм, попередньо врівноважену РВ. Єлюцію проводили зі швидкістю 90 мл/год із застосуванням РВ різної іонної сили – 0,1М, 0,2М, 0,3М, 0,4М розчини NaCl.

Концентрацію білка в отриманих фракціях встановлювали за допомогою модифікованого методу Bradford [7]. Спектр фракцій бактеріальних лізатів визначали на спектрофотометрі Beckman в діапазоні довжини хвилі 250–300 нм. Кількість речовини в досліджуваній фракції виражали за піковою концентрацією з допомогою одиниць оптичної щільності.

У процесі очистки фракції тестували за біологічною активністю на наявність СТ<sub>V</sub>, використовуючи вказані вище індикатори. Кількісне визначення кілерної активності бактеріоцинів проводили за діаметром зон лізису [4] або за відсотком бактерій, що вижили використовуючи при цьому показник 37-відсоткової виживання. [5]. Враховуючи показники літичної активності та кількості білку, визначали питому кілерну активність.

### Результати досліджень

Результати експериментів показали, що оптимальна концентрація налідиксової кислоти, необхідної для утворення бактеріоцинів, які впливали на всі використані нами індикаторні штами, складала 20 мкг/мл. В серійних дослідженнях активність вихідного препарату умовно прирівнювали до одиниці, із якою співвідносили активності СТ<sub>V</sub>, що отримали на різних етапах концентрування та очищення. Для отримання концентрованих розчинів із високою активністю бактеріоцинів ми використовували методи ПЕГ-преципітації, диференціального центрифугування і осадження за допомогою сульфату амонію.

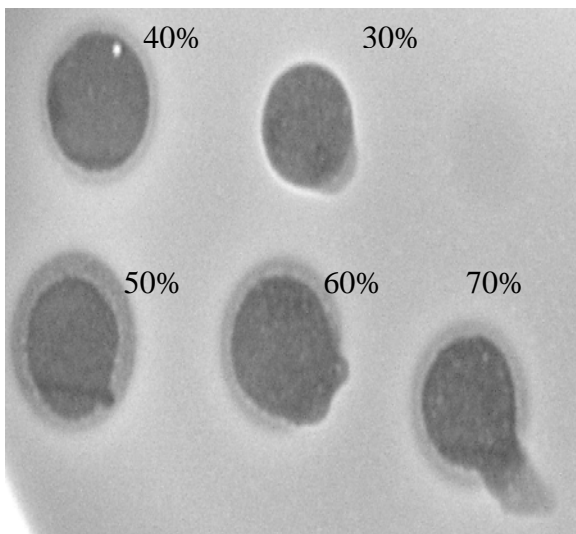
Застосування методу ПЕГ-преципітації дало можливість незначною мірою підвищити концентрацію бактеріоцинів. При цьому загальна активність отриманої суспензії зростала на 11,7 % і 17,5 % по відношенню до індикаторів ЕСО К12 і ЕСА 66А відповідно, а зони лізису на ЕСО ВЕ збільшились на 88,7 %. Більш точне визначення кілерної активності за допомогою методу серійних розведень дозволило встановити, що активність ПЕГ-лізатів при дії на чутливу культуру ЕСО ВЕ на один порядок вища, ніж у вихідного матеріалу. Слід також відмітити, що преципітати бактеріоцинів характеризувалися більшими розмірами зон лізису, а також нехарактерною для них морфологією. На газонах індикаторних культур навколо основних негативних зон виявляли зовнішні ободки із дифузними розмитими контурами.

Використання диференційного ультрацентрифугування для концентрування частинок СТ<sub>V</sub>, на відміну від попереднього методу, дозволило отримати препарати, які виявляли зворотній характер лізису чутливих індикаторів. При цьому було відзначено зростання активності концентрату на 50 і 25 %, яка проявлялась по відношенню до індикаторних культур ЕСА 66А і ЕСА М2-4/RI відповідно.

За допомогою двох вищезазначених методів, ми сконцентрували вихідний лізат, але виділити окремі бактеріоцини, які б відрізнялися за спектром бактеріальної дії, нам все ж таки не вдалося. Але, отримані результати дозволяють зробити висновок, який опосередковано підтверджує множинність СТ<sub>V</sub>.

Далі в роботі застосовували концентрування суміші каротоворіцинів за допомогою сульфату амонію. Сіль вносили у вихідні лізати до 40–70 %-ого насичення. Було встановлено, що після розділення методом центрифугування супернатанти і осадки суттєво відрізняються за біологічною активністю. Ефективність дії вмісту фракцій, отриманих після ресуспендування осадків, залишалася однаково високою, і на індикаторах ЕСА 66А, ЕСА М2-4/RI і ЕСО К12 її приріст становив у середньому 11 %. Проте слід відмітити, що вміст супернатантів (розчини 30–60 % насичення) зон лізису не утворювали.

Ці дані дозволяють зробити висновок, що сульфат амонію не лише високоефективно концентрує суміш бактеріоцинів (збільшує розміри негативних зон лізису на 150 % при використанні індикаторної культури ЕСА 66А), але і в деякій мірі розділяє її на частини – неоднакові активності супернатантів та осадків із розчинів 40–70 %-ого насичення. Поява плям лізису складної морфології на деяких індикаторах, при збільшенні концентрації сульфату амонію, безсумнівно свідчить на користь множинності СТV-кілерів (рис. 1). Описані зміни морфології зон лізису можуть виникати внаслідок впливу на чутливі культури не лише МСТV,



**Рис. 1. Морфологія зон лізису, отриманих внаслідок впливу бактеріоцинів із осаджених фракцій на індикаторну культуру ЕСО ВЕ**

Помітні зовнішні ободки навколо негативних колоній. Цифрами наведено насичення вихідних розчинів сульфатом амонію, %.

але й ССТV, які значно менші за молекулярною масою і характеризуються вищою дифузійною швидкістю в агарі. Згодом було встановлено, що наявність в розчинах  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  не зменшує кілерної активності СТV.

Для планування подальших експериментів препарати отримували за допомогою преципітації вмісту індукованих лізатів 40 %-вим  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Аналітичне розділення здійснювали на колонії із ДЕАЕ-целюлозою. Використовуючи розчини РВ із 0,1М, 0,2М, 0,3М і 0,4М NaCl, нам вдалося розділити СТV із різними типами кілерної активності, яка проявлялася при дії на використані індикаторні культури (рис. 2).

Так, фракції, отримані при елюції розчином РВ із 0,2М NaCl, містили СТВ, активні по відношенню до чутливих культур ЕСО К12; у фракціях 21–30 виявлені кілери, які вбивали клітини індикаторів ЕСО К12 і ЕСО ВЕ, а каротоворіцини, виділені при елюції розчином РВ із 0,4М NaCl, діяли на бактеріальні клітини ЕСА М2-4/RI і ЕСА 66А. Ці дані вказують на перспективність використання описаних вище методів для розділення суміші бактеріоцинів, отриманих при індукції *E. carotovora* J2 налідиксовою кислотою. Ймовірно, що застосування традиційного підходу, який було описано в даній роботі, можна в подальшому розширити, використовуючи його для вивчення фізичної множинності СТВ різних штамів *E. carotovora*. Крім того, цей метод дозволяє здійснити масштабування для отримання часток біологічно активних каротоворіцинів у великих кількостях.

### Висновки та перспективи подальших досліджень

Отже, каротоворіцини являють собою множинні кілерні фактори фітопатогенної бактерії *E. carotovora*. В першу чергу, така множинність проявляється через наявність у вказаної бактерії двох основних кілерів – коліциноподібних бактеріоцинів (ССТВ) і макромолекулярних або бактеріоцинів типу фагов хвостових відростків (МСТВ). Крім лізуючої активності щодо близькоспоріднених штамів, СТВ вбивають бактерії роду *Escherichia*. Розширений спектр антимікробної дії робить можливим в перспективі застосування каротоворіцинів у якості антимікробних речовин.

### Література

1. Кушкіна А. І., Панцина А. І.; Товкач Ф. І. Довгострокове зберігання нестабільних бактеріофагів ентеробактерій // Методи одержання чистих культур мікроорганізмів та їх довгострокове зберігання в колекціях: Роботи співробітників Музею патогенних для людини мікроорганізмів / Уклад.: Сельнікова О. П. та ін. – Київ: Т-во “Знання” України. – 2004. – 3. – С. 52–59.

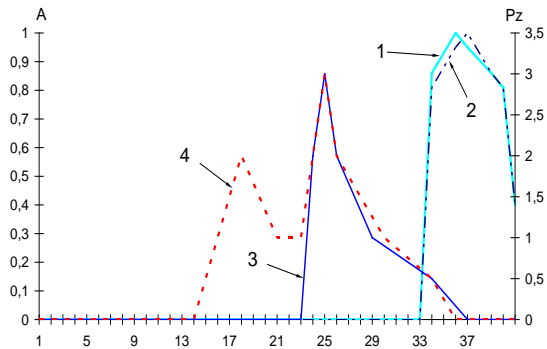


Рис. 2. Розділення суміші СТВ на окремі фракції, активні щодо різних індикаторних культур, за допомогою іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-целюлозі

Фракції 1–10 елюювали розчинами РВ із 0,1М NaCl; 11–20 – РВ із 0,2 М NaCl; 21–30 – РВ із 0,3М NaCl; 31–41 – РВ із 0,4М NaCl.

Ординатні осі: А – активність компонентів фракцій до культур ЕСА 66А (1) і ЕСА М2-4/RI (2); Pz – ступінь прозорості зон лізису на індикаторах ЕСО ВЕ (3) і ЕСО К12 (4).

2. Товкач Ф. И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 1998. – 67, №6. – С. 767–774.
3. Товкач Ф. И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – 71, №3. – С. 359–367.
4. Товкач Ф. И., Муквич Н. С. Изучение бактериоцинов *Erwinia carotovora* с помощью бактериальных индикаторов, устойчивых к налидиксовой кислоте // Микробиология. – 2003. – 72, №2. – С. 199–205.
5. Товкач Ф. И., Товкач А. Ф., Мороз С. Н. Изучение популяционной диссоциации музейных культур *Erwinia carotovora* // Микробиол. журн. – 2002. – 64, №1. – С. 11–19.
6. Товкач Ф. И. Лизогения і бактеріофаги *Erwinia carotovora*: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. – Київ, 2002. – 39с.
7. Löffler B.-M. and Kunze H. Refinement of the Coomassie Brilliant Blue G Assay for Quantitative Protein Determination // Analytical Biochemistry. – 1989. – 177. N1 - P. 100–102.
8. Riley M. A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution // Annu. Rev. Genet. – 1998. – 32. – P. 255–278.
9. Yamamoto K. R., Alberts B. M., Benzinger R. et al. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylenglycol and its application to large-scale virus purification // Virology. – 1970. – 40, N3. – P. 734–744.