

**Е.Д. Крылова<sup>1</sup>, Т.Е. Горб<sup>2</sup>, Л.В. Романюк<sup>2</sup>, Ф.И. Товкач<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65029, Украина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

## ДЕСТАБИЛИЗАЦИЯ ДЕФЕКТНОЙ ЛИЗОГЕНИИ КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ПОПУЛЯЦИОННОЙ ДИССОЦИАЦИИ *ERWINIA CAROTOVORA*

*На основе индикаторных бактериальных мутантов, устойчивых к налидиксовой кислоте, разработан метод количественного определения бактериоциногенности у диссоциантов *Erwinia carotovora*. Показано, что популяционная диссоциация дестабилизирует дефектную лизогению пектолитических эрвиний. У многих диссоциантов увеличивается выход активных бактериоцинов при лизогенной индукции дефектных профагов, о чем свидетельствует снижение выживаемости клеток индикатора. Выявлена обратная зависимость между выживаемостью клеток индикатора после индукции бактериоцинов у диссоциантов и вызываемой ими гиперчувствительной реакцией на листья устойчивого растения *Nicotiana tabacum*. Аналогичная зависимость обнаружена также между диссоциацией и активностью пектацелиязы. В свою очередь жизнеспособные эрвиниофаги в процессе лизогенизации – индукции могут играть роль «переключателей» бактериального фенотипа, повышая адаптивные реакции фитопатогена.*

*Ключевые слова:* *Erwinia carotovora*, дефектная лизогения, популяционная диссоциация, гиперчувствительная реакция, пектолитическая активность.

Ранее было показано, что дефектная лизогения может рассматриваться как фенотипический признак *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Есс), который распространяется на штаммы различного происхождения [7]. Можно считать, что лизогенное состояние этой бактерии является очень стабильным, так как многие штаммы, хранившиеся долгое время при комнатной температуре в обычной среде LB, остаются дефектно-полилизогенными [6]. При лизогенной индукции митомицином С или налидиксовой кислотой они выделяют бактериоцины типа фаговых хвостовых отростков. Тем не менее, было обнаружено, что при многолетнем хранении штаммы Есс подвержены популяционной диссоциации. При этом они выщепляют разнообразные варианты, которые отличаются от исходной бактерии морфологией колоний. Неизвестно, однако, как влияет популяционная диссоциация на лизогенное состояние и каково ее значение для поддержания патогенного статуса того или иного штамма эрвиний. В связи с этим целью настоящих исследований было установление взаимосвязи между популяционной диссоциацией, дефектной лизогенией и патогенностью *E. carotovora*.

**Материалы и методы.** В работе исследовали диссоцианты природных штаммов *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Есс) 62А, 2М и 66А [5]. Для обнаружения бактериоцинов использовали устойчивые к налидиксовой кислоте (Nal<sup>r</sup>) индикаторные штаммы Есс 5297/33 Nal<sup>r</sup> (для бактериоцинов штаммов 2М и 66А) и Есс 71/1 Nal<sup>r</sup> (для бактериоцинов штамма 62А).

Для получения индуцированных лизатов эрвиний бактерии выращивали в минимальной среде А [3] с интенсивной аэрацией при температуре 28 °С. По достижении клетками середины логарифмической фазы роста ( $2-5 \times 10^8$  кл/мл) в среду добавляли митомицин С или налидиксовую кислоту (Nal) до конечных концентраций 1 и 20 мкг/мл, соответственно. После 18-часового инкубирования при температуре 28 °С без аэрации, лизаты обрабатывали хлороформом и осветляли центрифугированием при 8000g 45 мин. [5].

Испытание бактериоциногенности штаммов эрвиний проводили методом [7]. В нашем

случае нижний слой состоял из 1,2 %-ного агара LB, а верхний – содержал мягкий агар (0,5 %), налидиксовую кислоту и клетки индикатора NaI<sup>r</sup>. Наличие негативных пятен, образующихся бактериоцинами на газонах чувствительных клеток NaI<sup>r</sup>-мутанта, было позитивным тестом на лизогенную индукцию.

Эффективность индукции определяли по выживаемости клеток индикатора после действия индуктора на клетки диссоциантов. Для этого на верхний слой агара с 20 мкг/мл налидиксовой кислоты и NaI<sup>r</sup> чувствительного к бактериоцинам индикатора наносили по 5 мкл исследуемых культур, подрощенных до средней логарифмической фазы роста. Чашки инкубировали 18 час при температуре 28 °С. Из середины пятен лизиса, а также из газона вырезали агаровые блоки размером 3х3х3 мм, помещали в 2 мл жидкой среды Ах1 [3]. Выживаемость клеток определяли как соотношение количества клеток из пятна к таковому из газона.

Получение селективных популяционных диссоциантов осуществляли на твердой среде LB с 0,2 % лактозой. На бактериальные газоны наносили по 5 мкл исходного каротоворицина. Чашки инкубировали 18 ч при температуре 28 °С. В местах образования пятен вырезали агаровые блоки размером 3х3х3 мм. Затем их помещали в 2 мл жидкой среды LB и выращивали 18 ч при температуре 28 °С. Выросшие бактериальные клетки пассировали под селективным прессом бактериоцина до получения устойчивых к нему диссоциантов.

Для получения мутантов NaI<sup>r</sup>, устойчивых к налидиксовой кислоте, по 5 мкл свежей ночной культуры штаммов Есс наносили каплями на чашки с LB, содержащие налидиксовую кислоту в концентрации 20 мкг/мл, инкубировали 2–3 суток при температуре 28 °С. Выросшие устойчивые колонии перекалывали 2–3 раза на ту же селективную среду. Полученные таким образом NaI<sup>r</sup> бактериальные мутанты использовали в качестве чувствительных индикаторов для каротоворицинов.

Активность пектатлиазы определяли спектрофотометрически по образованию ненасыщенной дигалактуроновой кислоты [13]. За единицу активности (Е) принимали количество фермента, вызывающее изменение оптической плотности реакционной смеси при  $\lambda_{235}$  на 1,6 за 1 мин, что соответствовало образованию 1 мкмоль продуктов реакции [8].

Гиперчувствительную реакцию (HR), вызываемую диссоциантами на устойчивом растении, определяли согласно [12]. Полностью развитые листья табака (*Nicotiana tabacum*) инокулировали суспензией, содержащей  $2 \times 10^8$  клеток/мл, после чего измеряли площадь инокуляции ( $S_{\text{зар}}$ ). Растения анализировали через 48 часов, измеряя площадь поражения листа ( $S_{\text{пор}}$ ). Процент поражения высчитывали по формуле:  $HR (\%) = S_{\text{пор}} / S_{\text{зар}} \times 100$ .

**Результаты и их обсуждение.** Наиболее распространенным типом популяционной диссоциации в бактериальном мире являются переходы S/R-типа [4]. У грамтрицательных патогенных бактерий R-вариант отличается от S отсутствием O-специфических полисахаридных цепей в липополисахариде клеточной стенки. Уменьшение длины полисахарида приводит к образованию промежуточных вариантов. Изменение только одного этого признака коррелирует с изменением ряда других свойств, многие из которых характерны для патогенных бактерий: вирулентность, антигенность, устойчивость к бактериофагам и др. У диссоциантов большинство различий носят количественный характер [1,4]. Поэтому при исследовании популяционной диссоциации у фитопатогенных бактерий и ее связи с дефектной лизогенией определяли количественные показатели бактериоциногенности.

В экспериментах использовали диссоцианты 3-х штаммов *E. carotovora* 62A, 66A и 2M, которые подразделялись на два вида: селективные популяционные диссоцианты, полученные с помощью бактериоцинов (в табл. 1 все эти мутанты обозначены как мутанты RC-типа – "resistance for carotovocins"), а также спонтанные, обнаруженные после длительного хранения клеток – диссоцианты штамма 2M и диссоцианты 62A – 5S-3 и 62A-d1 (табл. 1).

Результаты количественного определения эффективности индукции бактериоцинов и гиперчувствительной реакции диссоциантов *E. carotovora*

Штамм	Индикатор NaI <sup>r</sup>	Выживаемость индикаторных бактерий (%)	Гиперчувствительная реакция (HR) %
62A	71/1 NaI <sup>r</sup>	4,8	51,5
RC5297	— “ —	7,8	34,3
5d	— “ —	0,6	55,1
RC5195	— “ —	0,2	68,0
5S-3	— “ —	0,04	52,6
66A	RC5297/33 NaI <sup>r</sup>	8,0	68,3
RC1812/4	— “ —	7,0	35,0
RC1806/1	— “ —	28,0	38,7
RC1806/3	— “ —	29,0	33,4
RC1805/3	— “ —	30,0	22,5
RC1812/3	— “ —	20,0	25,0
RC1812/2	— “ —	18,0	15,7
RC1838/4	— “ —	34,0	16,7
RC1821/2	— “ —	34,0	12,5
2M/S2	RC5297/33 NaI <sup>r</sup>	100,0	4,2
2M/I2	— “ —	50,0	9,5
2M/II2	— “ —	10,0	4,7
2M/M2	— “ —	11,0	27,5
2M/RIII	— “ —	2,0	48,3
2M/RI	— “ —	0,015	35,0

Применение в качестве индикаторных бактериальных мутантов, устойчивых к налидиксовой кислоте, является весьма эффективным для обнаружения и детальной характеристики дефектной лизогении эрвиний [7].

В представленной табл. 1 величина выживаемости клеток индикатора 71/1NaI<sup>r</sup> после действия индуцированными бактериоцинами штамма 62A и его диссоциантов находятся в широком диапазоне от 0,042 (у 5S-3) до 7,8 % (у RC5297). При этом диссоциант RC5297 имеет самый низкий уровень активности бактериоцинов. Несмотря на это активность общего пула бактериоцинов остальных диссоциантов (RC5195, 62A-d1 и 5S-3) на один-два порядка выше, чем таковая исходного штамма 62A. Эти данные свидетельствуют о том, что популяционная диссоциация, в целом, сопряжена с дестабилизацией дефектной лизогении *E. carotovora* 62A.

При исследовании *E. carotovora subsp. carotovora* 66A и ее диссоциантов RC-типа были получены другие данные. Как видно из табл. 1, доля выживших клеток индикаторного штамма RC5297/33 NaI<sup>r</sup> после индукции бактериоцинов находится в пределах 8–34 %. При этом уровень лизогенной индукции каротоворицинов значительно снижен по сравнению с исходным штаммом.

Пока трудно объяснить кардинально противоположное поведение диссоциантов штаммов Эсс 66A и 62A при обработке их клеток налидиксовой кислотой. Возможно, отбор “глубоких” диссоциативных форм с помощью поиска бактериоциноустойчивых мутантов является не вполне удовлетворительным в случае *E. carotovora* 66A.

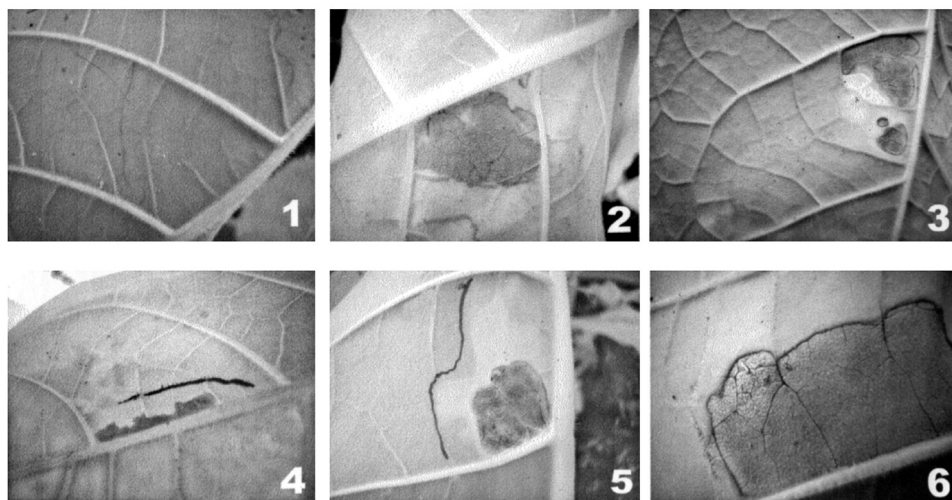
Наибольший диапазон эффективности индукции бактериоцинов (до 5000 раз) показали спонтанные диссоцианты штамма 2M, среди которых особо можно отметить штаммы 2M/RI и 2M/RIII, вероятно, являющиеся типичными R-формами. Как видно из табл. 1, с увеличением глубины диссоциации данного штамма, увеличивается выход активных бактериоцинов.

Это приводит к тому, что диссоциант становится более эффективным в плане лизогенной индукции бактериоцинов, чем исходный тип. Увеличение выхода бактериоцинов и, соответственно, дестабилизация лизогении связаны с направлением диссоциации от S к R-форме.

*E. carotovora* является фитопатогеном, вызывающим у растений мягкую гниль в результате действия пектолитических ферментов. У этих бактерий продукция деградирующих растительную клеточную стенку ферментов, а также белков-харпинов, преодолевающих защитный барьер растений-хозяев и вызывающих гиперчувствительную реакцию устойчивых растений, осуществляется системами секреции II и III типа. Их характерной особенностью является секреция всех перечисленных белков через цитоплазматическую и внешнюю мембраны бактериальной клетки [11]. Следовательно, у диссоциантов вариации свойств поверхности клетки могут изменить связанную с ней активность ферментов [4].

Исходя из этого можно предположить, что у фитопатогенных эрвиний диссоциация может влиять на тот или иной путь секреции ферментов, о чем можно судить по количеству выделяемого фермента или (как в III типе секреции) по величине реакции устойчивого растения (HR – гиперчувствительная реакция) на проникновение бактерий-диссоциантов в его ткани.

Представленные в табл. 1 данные по определению эффективности гиперчувствительной реакции на листьях *N. tabacum* свидетельствуют о различной ее степени, вызываемой диссоциантами. В большинстве случаев выявлена корреляция между выживаемостью клеток индикатора после индукции бактериоцинов и гиперчувствительной реакцией диссоциантов – чем выше выживаемость после индукции, тем ниже HR, и наоборот (рис. 1). Это связано у диссоциантов с переходом от S к R-форме, что влечет за собой не только увеличение проницаемости мембраны для поступающих в клетку веществ, но и увеличение секреции ферментов, имеющих отношение к патогенному процессу.



**Рис. 1 Эффективность гиперчувствительной реакции на листьях *N. tabacum*, инокулированных клетками диссоциантов *E. carotovora* 62A:**

1 – контроль (листья инокулированы средой Ax1); 2 – Есс 62А; 3 – 62А-d1;  
4 – RC5297; 5 – 5S-3; 6 – RC5195

Ранее было установлено, что умеренный бактериофаг ZF40 *E. carotovora* осуществляет лизогенную конверсию клетки-хозяина. Причем, при действии налидиксовой кислоты на клетки Есс 62А и 62А-d1 индуцируются только собственные профаги, однако, присутствие в этих штаммах профага ZF40 увеличивает выход дефектных [2].

Лизогенизация штаммов 62А и RC5297 не влияет значительно на выход индуцируемых бактериоцинов. Однако лизогенные варианты спонтанного диссоцианта 62А-d1, которые несут профаг дикого типа ZF40wt, характеризуются повышенным выходом бактериоцинов – в 480 и в 60 раз по сравнению с исходной бактерией 62А и 62-d1 соответственно (табл. 2).

Эффективность индукции бактериоцинов, гиперчувствительная реакция и пектолитическая активность диссоциантов и их лизогенов по фагу ZF40 *E. carotovora*

Штамм	Выживаемость индикаторных бактерий (%)	Гиперчувствительная реакция (HR) %	Активность пектатлиазы (% к контролю)
62A	4,8	51,5	100,0
62lys	12,0	47,5	95,8
RC5297	7,8	34,3	62,5
RC5297lys	8,1	23,5	46,9
62A-d1	0,6	55,1	72,9
19lys	0,02	56,4	125,0
23lys	0,01	67,0	145,8
5S-3	0,04	52,6	114,5
5S-3lys	0,02	59,3	109,4

Наличие профага ZF40wt в клетках Есс 62А и RC5297 способствует уменьшению выхода бактериоцинов, о чем свидетельствует повышение выживаемости клеток индикатора после лизогенной индукции с 4,8 до 12,0 % (в 2,5 раза) у 62А, и с 7,8 до 8,1 % у RC5297. В других лизогенных по фагу ZF40wt диссоциантах выживаемость снижается незначительно – от 0,04 (5S-3) до 0,02 (у 5S-3lys) – в 2 раза. Возможно, бактериофаг ZF40 в клетках диссоциантов осуществляет их лизогенную конверсию в зависимости от конкретной структуры поверхности клетки, тем самым расширяя возможности бактерий приспосабливаться к изменяющимся условиям окружающей среды.

Как для диссоциантов, так и их лизогенов, выявлена обратная зависимость между выживаемостью клеток индикатора после индукции бактериоцинов у диссоциантов и вызываемой ими гиперчувствительной реакцией на листьях устойчивого растения *N. tabacum* (табл. 2).

У мягкогнилостных эрвиний главным фактором развития заболевания является комплекс пектолитических ферментов, основная роль среди которых отводится ферменту пектатлиазе, выделяющемуся через внутреннюю и внешнюю мембрану клетки в окружающую среду по II типу секреции. При анализе активности пектатлиазы у штаммов диссоциантов и их лизогенов также установлена обратная взаимосвязь между выживаемостью клеток индикатора после индукции бактериоцинов и пектолитической активностью этих штаммов (табл. 2). Исследования взаимосвязи систем секреции II и III типа показывают, что способность бактерий вызывать HR в несвойственном растении согласуется со способностью вызывать мягкую гниль в чувствительном растении-хозяине [9], а недавние работы подтвердили координированную регуляцию харпинов и пектатлиазы у *E. chrysanthemi* [10]. Мы допускаем, что эти две системы секреции у *E. carotovora* работают согласованно.

Таким образом, популяционная диссоциация дестабилизирует дефектную лизогению пектолитических эрвиний. У многих диссоциантов увеличивается выход активных бактериоцинов при лизогенной индукции дефектных профагов, о чем свидетельствует снижение выживаемости клеток индикатора. Выявлена обратная зависимость между выживаемостью клеток индикатора после индукции бактериоцинов у диссоциантов и вызываемой ими гиперчувствительной реакцией на листьях устойчивого растения *N. tabacum*. Аналогичная зависимость обнаружена также между диссоциацией и активностью пектатлиазы. В свою очередь жизнеспособные эрвиниофаги в процессе лизогенизации – индукции могут играть роль «переключателей» бактериального фенотипа, повышая адаптивные реакции фитопатогена.

## ДЕСТАБІЛІЗАЦІЯ ДЕФЕКТНОЇ ЛІЗОГЕНІЇ ЯК ПОКАЗНИК ПОПУЛЯЦІЙНОЇ ДИСОЦІАЦІЇ *ERWINIA CAROTOVORA*

### Резюме

На основі індикаторних бактеріальних мутантів, стійких до налідиксової кислоти, розроблено метод кількісного визначення бактериоциногенності у дисоціантів *Erwinia carotovora*. Показано, що популяційна дисоціація дестабілізує дефектну лізогенію пектолітичних ервіній. У багатьох дисоціантів збільшується вихід активних бактериоцинів при лізогенній індукції дефектних профагів, про що свідчить зниження виживаності клітин індикатору. Виявлена зворотна залежність між виживаністю клітин індикатору після індукції бактериоцинів у дисоціантів і гіперчутливою реакцією, яку вони спричиняють на листі стійкої рослини *Nicotiana tabacum*. Аналогічна залежність виявлена також між дисоціацією і активністю пектатлази. В свою чергу, життєздатні ервініофаги в процесі лізогенізації–індукції можуть виступати як «перемикачі» бактеріального фенотипу, що підвищує адаптивні реакції фітопатогена.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, дефектна лізогенія, популяційна дисоціація, гіперчутлива реакція, пектолітична активність.

**K. D. Krylova<sup>1</sup>, T. E. Gorb<sup>2</sup>, L. V. Romanyuk<sup>2</sup>, F. I. Tovkach<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Mechnikov National State University, Odessa

<sup>2</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

## DESTABILIZATION OF DEFECTIVE LYSOGENY AS THE INDEX OF POPULATION DISSOCIATION OF *ERWINIA CAROTOVORA*

### Summary

The method of quantitative determination of bacteriocinogenicity in *Erwinia carotovora* dissociants has been suggested. It is based on the application of indicator bacterial mutants that are resistant to nalidixic acid. It has been revealed that population dissociation destabilizes a defective lysogeny of pectolytic *Erwinia*. In particular, a decrease of cell indicator survivability due to an increase of active bacteriocins yield has been found under lysogenic induction of defective prophages. The reverse dependence between the indicator cell survivability caused by dissociants bacteriocins induction and the reaction of hypersensitivity on leaves of the resistant plant *Nicotiana tabacum*, has been revealed. Similar dependence has been determined between dissociation and activity of pectate lyase. It has been hypothesized, that viable erwiniophages, being involved in the process of lysogenicity and induction, could play the role of 'switches' of bacterial phenotype raising adaptive phytopathogene reactions.

The paper is presented in Russian.

К е y w o r d s: *Erwinia carotovora*, defective lysogeny, population dissociation, reaction of hypersensitivity, activity of pectate lyase.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s : T.E.Gorb, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Головлев Е.Л. Метастабильность фенотипа у бактерий // Микробиология. – 1998. – 67, № 2. – С. 149–155.
2. Кушкіна А.И., Товкач Ф.И. Функциональная организация профага и лизогения у *Erwinia carotovora* с участием умеренного бактериофага ZF40 // Микробиол. журн. – 2006. – 68, № 3. – С. 21–32.
3. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
4. Милько Е.С. Нестабильность синтеза практически ценных веществ бактериями и процесс диссоциации // Прикл. Биохим. Микробиол. – 1990. – 26, № 6. – С. 732–742.
5. Товкач Ф.И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 1998. – 67, № 6. – С. 767–774.

6. Товкач Ф.И. Популяционная гетерогенность коллекционных штаммов *Erwinia carotovora subsp. carotovora* и ее связь с фаговой лизогенной конверсией // Материалы международной конференции «Микробиология и биотехнология XXI столетия» – Минск, 2002. – С. 103–104.
7. 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.
8. Шевчик В.Е., Евтушенко А.Н., Фомичев Ю.К. Изоферменты внеклеточных пекаттлаз бактерий рода *Erwinia* // Биохимия. – 1988. – **53**, № 10. – С. 1628–1638.
9. Collmer A., Bauer D.W. *Erwinia chrysanthemi* and *Pseudomonas syringae* plant pathogens trafficking in virulence proteins // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 1994. – **192**, N1. – P. 43 – 78.
10. Nasser W., Reverchon S., Vedel R., Boccardo M. PecS and PecT coregulate the synthesis of HrpN and pectate lyases, two virulence determinants in *Erwinia chrysanthemi* 3937 // Mol. Plant Microbe Interact. – 2005. – **18**, N11. – P. 1205 – 1214.
11. Sandkvist M. Type II secretion and pathogenesis // Infection and Immunity. 2001. – **69**, N6. – P. 3523 – 3535.
12. Yap 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**, N5. – P. 3013 – 3023.
13. Zink R.T., Engwall J.K., McEvory J., Chatterjee A.K. RecA is required in the induction of pectin lyase and carotovoricin in *Erwinia carotovora subsp. carotovora* // J. Bacteriol. – 1985. – **164**, N1. – P. 390 – 396.

Отримано 12.11.2008