

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТИМИНОВЫХ АУКСОТРОФНЫХ МУТАНТОВ *ERWINIA CAROTOVORA* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЧАСТИЦ ДЕФЕКТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Впервые показано, что нектолитические эрвинии существуют в природе не только как дефектно-полилизогенные системы, но и такие, которые несут профаги жизнеспособных бактериофагов. Множественная лизогения у *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ZM1 характеризуется дефектными и жизнеспособными бактериофагами, колициноподобными бактериоцинами, которые, возможно, представляют продукты фагового синтеза. Использование тиминовых ауксотрофных мутантов для получения частиц дефектных бактериофагов позволило создать чувствительную систему, которая может быть использована для выборочного получения бактериоцинов разных типов с высоким показателем киллерной активности. В перспективе процесс масштабирования менее затратного и трудоёмкого метода индукции за счёт голодания тиминовых ауксотрофов может создать условия для разработки большого количества бактериоцинов и открывает перспективу получения отдельных фаговых компонентов, которые могут быть использованы в нанотехнологии в качестве разнообразных матриц.

Ключевые слова: *Erwinia carotovora*, бактериофаг, дефектные фаговые частицы, каротоворицины, киллерная активность.

В микробном мире дефектные умеренные вирусы распространены наравне с полноценными бактериофагами. Данные современной геномики демонстрируют наличие значительного сектора профаговых элементов в бактериальном геноме [9]. При этом неполные профаговые элементы преобладают над функциональными профагами. За счет генетических дефектов профаги образуют не зрелые вирусные частицы, а неполные вирионы или VLP – virus like particles [10,11]. Среди неполных фаговых продуктов бактериальной клетки часто наблюдают фаговые хвостовые отростки. Особое внимание к этой составной части вириона обусловлено её киллерной активностью, проявляемой по отношению к родственным бактериям.

Штаммы фитопатогенной бактерии *Erwinia carotovora* существуют в природе как дефектно-полилизогенные системы, биологическим проявлением которых есть бактериоциногенность [4,5]. Носителями последней выступают макромолекулярные каротоворицины (MCTV) или хвостовые отростки индуцированных дефектных бактериофагов. Известно, что основным фактором индукции бактериоцинов является повреждение бактериальной ДНК, которая не исправляется системой SOS – репарации клеток [5,8]. Бактериоцины выделяются спонтанно или при обработке клеток индукторами, нарушающими метаболизм клеток. Среди традиционных индуцирующих факторов, таких как митомицин С, налидиксовая кислота, равное место занимает голодание мутантных клеток по тимину. Голодание ауксотрофных мутантов по дефектному фактору роста приводит к повреждению клеточной ДНК [14]. Однако, процесс голодания не так широко изучен, как другие факторы индукции, хотя отмечается высокая эффективность тиминовых мутантов как универсальных продуцентов бактериоцинов.

Цель представленной работы состояла в использовании менее затратного и трудоёмкого метода лизогенной индукции за счет голодания тиминовых ауксотрофов *E. carotovora*, который создаёт условия для выборочного получения бактериоцинов разных типов с высокими показателями киллерной активности.

Материалы и методы. Объектом настоящего исследования был штамм *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) – ZM1 [1]. Для биологического тестирования бактериоцинов в работе применены два индикаторных штамма Ecc: 64А и популяционный диссоциант Ecc 66А/18-40.

Тиминзависимые мутанты *E. carotovora* получали согласно стандартной методике [2], основанной на спонтанном образовании Thy⁻ – клеток при росте бактерий на минимальной среде с триметопримом – 10 мкг/мл. Для выращивания бактерий использовали полноценную среду LB и минимальную среду А с 0.2 % глюкозы.

© Л.В. Романюк, Н.С. Муквич, Т.В. Иваница, Ф.И. Товкач, 2011

Индукцию бактериоцинов у изучаемого мутанта вызывали «методом истощения тимина» [6]. Экспериментальный мутант выращивали на агаровых чашках LB. Готовили «затравку» в дистиллированной воде и переносили в минимальную среду А используя различные стартовые концентрации тимина (0.2 – 2.0 %), при этом титр опытной суспензии составлял 10^7 клеток/мл. Клетки ауксотрофов выращивали при 28°C, 48 часов с интенсивной аэрацией. Постепенное истощение ростового фактора в среде вызывало накопление бактериоцинов без заметного лизиса клеток. Индуцированные лизаты бактериальных клеток обрабатывали хлороформом (об.масса 1–5 %) и очищали центрифугированием на центрифуге ELM1 (10000 об/мин, 5 мин).

Киллерную активность бактериоцинов в препаратах оценивали по наличию зон лизиса, на газонах индикаторных культур полученных после нанесения 5 мкл образца. Отношение диаметра тестируемой зоны к диаметру максимальной зоны лизиса определяли как значения относительной киллерной активности (A_{rel}), которые были меньшими или равными единице и хорошо воспроизводились в серийных опытах [6]. После инкубации каротоворицинов при оптимальных условиях в течение 18 часов с мест нанесения препаратов вырезали агаровые блочки размером 3x3x3 мм. Блочки помещали в стерильный буфер А на 5 часов при 4°C. Далее определяли титр выживших клеток и соотносили его с концентрацией клеток, которые не подвергались воздействию бактериоцинов. Количественные показатели киллерной активности бактериоцинов выражали через величину:

$$KA = - \ln B/B_0,$$

где B/B_0 – выживаемость бактерий, B_0 и B – концентрация клеток в блочке, отобранного с бактериального газона и негативного пятна, формируемого бактериоцином, соответственно.

Частицы бактериоцинов осаждали в роторе SW-28 на ультрацентрифуге Spinco L7-70 при 26000 об/мин, 3 часа при 10°C [7].

Электронномикроскопический анализ вирусных частиц проводили методом описанным ранее [7].

Результаты и их обсуждение. В работе для получения Thu^- мутантов использовали штамм *Ecc* ZM1 [1]. Отбор Thu^- клонов с помощью триметоприма предварительно указал на 107 вариантов. В дальнейшем все клоны были проверены как на агаризованной, так и на жидкой минимальной среде на предмет их ауксотрофности при концентрациях тимина от 0.2 мкг/мл до 50 мкг/мл. Треть мутантов ревертировали к Thu^+ – фенотипу с частотой 10^{-7} , что указывает на точечный характер мутаций. Около 64 % мутантов были стабильны и предварительно были отнесены к мутантам с высокой потребностью в тимине (50 мкг/мл). Среди них семь ауксотрофов изучались более детально. Для каждого из них была установлена потребность в тимине (50 мкг/мл), частота спонтанных реверсий равная $>10^{-9}$ кл/мл, а также количественный выход каротоворицинов (по значениях относительной киллерной активности – A_{rel}). Учитывая все вышеназванные показатели, преимущество было отдано тиминному ауксотрофному мутанту *Ecc* ZM1/40-81.

Общезвестна высокая эффективность применения Thu^- мутантов как универсальных продуцентов бактериоцинов. У тиминных ауксотрофов при дефиците тимина нарушается синтез бактериальной ДНК, что в свою очередь запускает клеточный SOS – ответ, который приводит к активации белка RecA и протеолитическому расщеплению фаговых репрессоров [8,14]. В результате исследования мутанта 40-81 «методом истощения тимина» удалось получить SOS-индуцированные факторы *E. carotovora* – бактериоцины и бактериофаг (рис. 1).

В процессе индукции выделяется различное количество киллеров, которые можно зафиксировать по размеру зон лизиса, а также по их прозрачности на индикаторных штаммах (рис. 2). На индикаторе *Ecc* 18-40 зоны лизиса имеют ярко выраженную морфологию, особенно при больших концентрациях бактериоцинов (24, 26, 28 часов). Они характеризуются очень четкими краями с ореолом. Это указывает на то, что зоны лизиса формируются макромолекулярными каротоворицинами (MCTV), для которых показателен незначительный коэффициент диффузии в агаре [3]. Противоположная картина наблюдалась при формировании зон лизиса той же суспензией на индикаторе *Ecc* 64A. Даже в случае совпадающих максимумов отмечаются зоны лизиса с размытыми и нечеткими краями. Исходя из вышесказанного, можно сделать заключение, что в смеси содержится два типа бактериоцинов – MCTV

и CCTV с различными показателями диффузной и киллерной активности (рис. 2) [6,3]. При центрифугировании ($g=85000$) этой смеси действительно были обнаружены макромолекулярные каротоворицины (МСТV); они представляют собой сократимые хвостовые отростки длиной около 150 нм (рис. 1). В изучаемом препарате количество нативных хвостовых отростков составляет всего 13 %. Однако, этого достаточно, чтобы вызвать эффективное убийство чувствительных клеток индикатора *Ecc* 18-40. С другой стороны, в надосадочной жидкости при указанных параметрах центрифугирования были обнаружены исключительно низкомолекулярные бактериоцины или CCTV, которые формируют диффузные зоны на индикаторе *Ecc* 64A. Большинство частиц в данном препарате представляют собой формы с сокращенным чехлом и коровым стержнем. Эти структуры, по-видимому, не обладают киллерной активностью и имеют очень нестабильные стержни отростков.

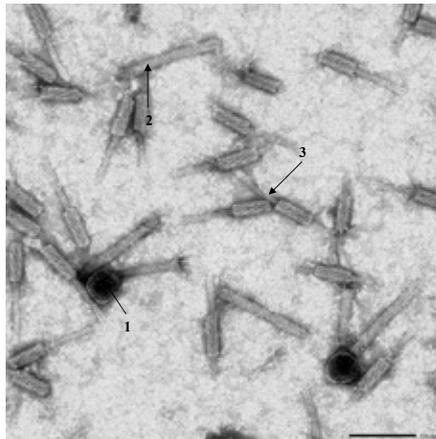


Рис. 1. Микрофотография частиц дефектного бактериофага, обнаруженных в индуцированном лизате *Erwinia carotovora subsp. carotovora* ZM1. (см. текст). Стрелками обозначены: 1 – фаг ZF40, 2 – релаксированные хвостовые отростки, 3 – сокращенные хвостовые отростки

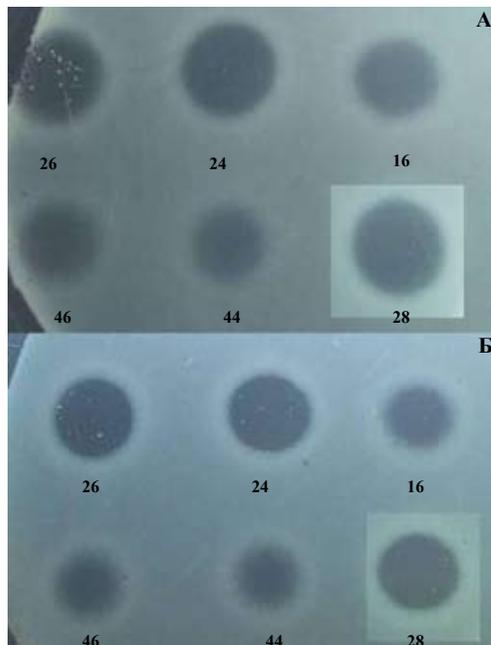


Рис. 2. Морфология негативных колоний макромолекулярных (МСТV) и колициноподобных каротоворицинов CCTV *Erwinia carotovora subsp. carotovora* ZM1 на индикаторах *Ecc* 64A (а) и *Ecc* 66A/18-40 (б). Цифрами обозначено время “истощения тимина” в часах.

Следующий этап исследований был направлен на изучение количественных показателей киллерной активности бактериоцинов *Ecc* ZM1 на двух разных индикаторных культурах (рис. 3). В экспериментах по длительному голоданию «методом истощения тимины» был отмечен максимальный выход киллеров после 26 часов инкубации (рис. 3). В этом часовом диапазоне было отмечено значительное падение титра клеток до 10^4 кл/мл, что позволило сделать предположение о связи индукции и выходом бактериоцинов с уменьшением количества клеток ауксотрофов. Определение киллерной активности (см. Материалы и методы) показало совпадение максимального выхода бактериоцинов двух типов в диапазоне 24–28 часов инкубации. Однако, киллерная активность бактериоцинов типа CCTV выше в 1,5 раза по амплитуде, чем у MCTV. Это можно объяснить двумя причинами. Во-первых, CCTV, в целом, стабильнее MCTV, во-вторых, макромолекулярные каротоворицины теряют свою активность за счет спонтанного сокращения хвостовых отростков (рис. 1).

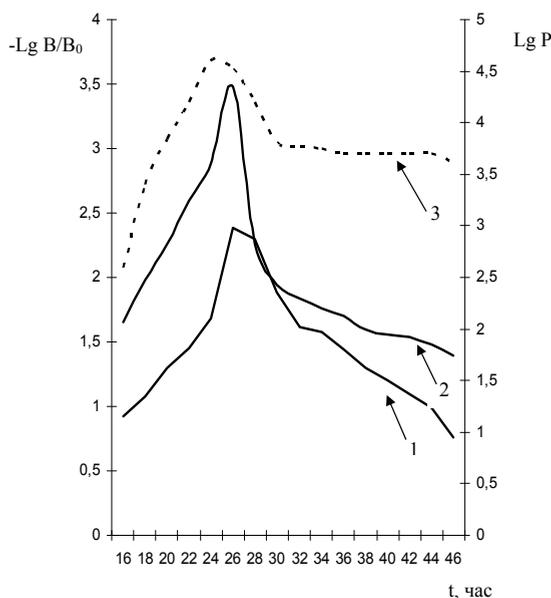


Рис. 3. Изменения киллерной активности ($-LnB/B_0$) и количества бактериофага ZF40 (lgP) в зависимости от времени «истощения тимины» в минимальной среде *Thu* мутантом *Ecc* ZM1/40-81 (см. текст). Показатели киллерной активности для MCTV и CCTV определены на индикаторах *Ecc* 66A/18-40(1) и *Ecc* 64A (2) соответственно, титр фага на культуре *Ecc* 62AR/C5297 (3).

При нанесении суспензии штамма ZM1, полученной при тиминовом голодании, на индикаторный штамм *Ecc* RC5297 мы обнаружили фаговые бляшки, которые способны размножаться в последующих пассажах. Наличие полноценных фаговых частиц было продемонстрировано при электронномикроскопических исследованиях. Их выход составлял около 7 % от общего количества киллерных агентов (рис. 1). Титрование образцов показало, что пик выхода фага совпадает и находится в том же диапазоне, который соответствует максимальному выходу для двух типов бактериоцинов. Это свидетельствует о том, что все три типа киллеров находятся под контролем репрессоров чувствительных к SOS-индукции [12, 13]. Одновременный выход этих агентов может свидетельствовать также о совпадающем единственном репрессоре, или же о разных репрессорах, которые подвержены одинаковому влиянию *Rec A* – протеазы штамма *Ecc* 40-81.

Результаты представленной работы впервые доказали, что пектолитические эрвинии существуют в природе не только как дефектно-полилизогенные системы, но и такие, которые несут профаги жизнеспособных бактериофагов. Явление множественной лизогении *E. carotovora* subsp. *carotovora* ZM1 характеризуется синтезом дефектных частиц и жизнеспособного бактериофага ZF40, CCTV, которые, скорее всего, представляют продукты фа-

говой природы. С другой стороны, использование тиминовых ауксотрофных мутантов для получения частиц дефектных бактериофагов позволило создать чувствительную систему, которая может быть использована для выборочного получения бактериоцинов разных типов с высоким показателем киллерной активности. Последующий процесс масштабирования менее затратного и трудоёмкого метода индукции за счёт голодания тиминовых ауксотрофов создает условия для наработки большого количества бактериоцинов и открывает перспективу получения отдельных фаговых компонентов, которые могут быть использованы в нанотехнологии как матрицы для различных систем фаговой природы.

Представленная работа частично профинансирована из фонда государственной программы «Нанотехнологии и наноматериалы» и выполняется в рамках научного проекта №0110U006114.

Л.В. Романюк¹, М.С. Муквич¹, Т.В. Іваниця², Ф.І. Товкач^{1,2}

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, ГСП, Д03680, Україна

² Одеський державний університет ім. І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ВИКОРИСТАННЯ ТИМИНОВИХ АУКСОТРОФНИХ МУТАНТІВ ERWINIA CAROTOVORA ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЧАСТОК ДЕФЕКТНИХ БАКТЕРІОФАГІВ

Резюме

Вперше показано, що пектолiтичнi ервінії існують в природі не тільки як дефектно-полілізогенні системи, але й такі, які несуть профаги життєздатних бактеріофагів. Множинна лізогенія у *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ZM1 характеризується дефектними і життєздатними бактеріофагами, колициноподібними бактеріоцинами, які, можливо, представляють продукти фагового синтезу. Використання тимінових ауксотрофних мутантів для отримання часток дефектних бактеріофагів дозволило створити чутливу систему, яка може бути використана для вибіркового отримання бактеріоцинів різних типів з високим показником кілерної активності. У перспективі процес масштабування менш витратного і трудомісткого методу індукції за рахунок голодування тимінових ауксотрофів, може створити умови для одержання великої кількості бактеріоцинів і відкриває перспективу отримання окремих фагових компонентів, які можуть бути використані в нанотехнології як різноманітні матриці.

Ключові слова: *Erwinia carotovora*, бактеріофаг, дефектні фагові частки, каротоворіцини, кілерна активність.

L.B. Romanyuk¹, N.S. Mukvich¹, T.V. Ivanytsia², F.I. Tovkach^{1,2}

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Mechnikov Odessa National University

USE OF THYMINE AUXOTROPHIC MUTANTS OF ERWINIA CAROTOVORA FOR OBTAINING PARTICLES OF DEFECTIVE BACTERIOPHAGES

S u m m a r y

It is shown for the first time that pectolytic erwinia exist in nature not only as defect-polylysogenic system, but also as those which carry prophages of viable bacteriophages. Multiple lysogeny in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ZM1, is characterized by defective and viable phages, colicin-like bacteriocins which may represent the products of phage synthesis. Use of thymine auxotrophic mutants for obtaining defective bacteriophage particles allowed to create a sensitive system, which can be used to obtain selectively different types of bacteriocins with high killer activity. In the future, the process of scaling a less cost- and time-consuming method of induction by thymine starvation auxotrophs, can create conditions for propagation of bacteriocins in large quantities and opens the prospect for obtaining individual phage components that can be used in nanotechnology as a variety of matrixes.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: *Erwinia carotovora*, bacteriophage, defective phage particles, carotovoricins, killer activity.

The author's address: *Romanyuk L.B.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Типирование фитопатогенных штаммов *Erwinia carotovora* на основе пектолитической активности и чувствительности к бактериоцинам (каротоворицинам) // Микробиология. – 1997. – **66**, № 6. – С.823-828.
2. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
3. Товкач Ф.И. Биологические свойства и классификация бактериоцинов *E. carotovora* // Микробиология. – 1998. – **67**, № 6. – С. 767 - 774.
4. Товкач Ф.И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2002. – **71**, №3. – С. 359 – 367.
5. 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.
6. Товкач Ф.И., Балко А. Б., Муквич Н.С. Особенности лизогенной индукции бактериоцинов у тиминового мутанта *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2006. – **68**, №3. – С. 33 – 46.
7. Товкач Ф.И., Иванюца Т.В., А.И. Куликина А.И. Характеристика дефектных частиц вирусной природы у бактерий рода *Erwinia* // Доповіді Національної Академії Наук України. – 2008. – №7. – С. 170 – 175.
8. Borek E., Ryan A. Lysogenic induction // Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. – 1973. – **13**. – P. 249–300.
9. Canchaya C., Proux C., Fournous G., Bruttin A., Brussow H. Prophage genomics // Microbiol.Mol.Biol. Rev. – 2003. – **67**, N2. – P.238–267.
10. Chiura H.X. Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria // Aquat. Microb. Ecol. – 1997. – **13**, N1. – P.75–83.
11. Eiserling F., Pushkin A., Gingery M., Bertani G. Bacteriophage-like particles associated with the gene transfer agent of *Methanococcus voltae* PS // J. Gen.Virol. – 1999. – 80, N12. – P.3305–3308.
12. Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggleston A.K. et al. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli* // Microbiol. Rev. – 1994. – **58**, №3. – P. 401–465.
13. 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**, №2. – P.213– 231.
14. Roberts J.W., Devoret R. Lysogenic induction // Lambda II / Ed. by R.W. Hendrix, J.W. Roberts, F.W. Stahl. – New York: Cold Spring Harbor, 1983. – P.123– 144.

Отримано 16.10.2010