

Ф.И. Товкач, Л.В. Романюк, Т.Е. Горб, А.Н. Остапчук, Ф.В. Мучник

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, ГСП, D03680, Украина*

ДИССОЦИАЦИЯ *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. *CAROTOVORUM*, СВЯЗАННАЯ С ИЗМЕНЕНИЯМИ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА КЛЕТочНОЙ СТЕНКИ

*Впервые показано, что популяционная гетерогенность у *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* распространяется на большое количество штаммов, т.е. носит универсальный характер. Используя метод специфической селекции с помощью каротоворицинов типа фаговых хвостовых отростков, был получен набор популяционных диссоциантов различных типов, поскольку S-ЛПС является той частью клеточной оболочки, которая содержит места их прикрепления. Установлено, что изменения S-липополисахарида приводят к образованию SR-, R-форм у *P. carotovorum*. Сделано предположение, что изменения поверхностных структур диссоциантов существенно влияют на системы секреции II и III типов – основных факторов патогенности пектобактерий.*

*Представленные результаты создают предпосылки для изучения направления и причины процесса диссоциации, а также ее влияния на патогенность *Pectobacterium carotovorum*.*

*Ключевые слова: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, клеточная оболочка, липополисахарид, диссоциация, селекция, каротоворицины.*

В настоящее время процесс диссоциации рассматривается как один из важных факторов, приводящий к гетерогенности микробной популяции. Важную роль в изменении свойств популяции играет перестройка её возрастной структуры. В результате клеточного и жизненного циклов бактерий морфологические, биохимические и физиологические свойства клеток существенно отличаются. Диссоциация происходит с высокой частотой порядка $10^{-2} - 10^{-4}$ на одно клеточное деление и, как правило, носит постоянный характер [3].

С развитием биотехнологии интерес к явлению диссоциации в последние годы значительно возрос. Расщепление штаммов-продуцентов ведет к изменениям количества и качества синтезируемых ими биологически активных веществ, что приводит к снижению выхода целевого продукта.

Первичные фенотипические изменения, создающие популяционное разнообразие, происходят в нарушенной оболочке клеток. У большинства грамотрицательных бактерий диссоцианты характеризуются отсутствием или изменением O-специфических полисахаридных цепей либо отличаются по составу белков наружной оболочки по сравнению с исходной бактерией [2].

Многочисленные биохимические и иммунологические исследования показали, что диссоциация затрагивает поверхностные структуры или части наружной мембраны бактерии, что, соответственно, приводит к утрате фаговых рецепторов. Очевидно, не только фаги, но и макромолекулярные каротоворицины (MCTV) типа фаговых хвостовых отростков могут быть применены для направленной и быстрой селекции популяционных диссоциантов [5]. Такой подход позволил получить и сравнить селекционные диссоцианты с вариантами, полученными при спорадических отборах в ходе длительных наблюдений колониального роста *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Целью данной работы было изучение основных свойств, связанных с изменениями липополисахарида клеточной стенки у популяционных диссоциантов разных типов, а также установление направления и причины процесса диссоциации у *Pectobacterium carotovorum*.

Материалы и методы. В работе использовали коллекционные штаммы *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc): 62A (из музея бактериальных культур кафедры микробиологии БГУ, г. Минск (Ю.К. Фомичев)), 2M (из музея Московской с/х академии, г. Москва (Е.В. Матвеева)).

Для получения индуцированных лизатов эрвиний бактерии выращивали в минимальной среде А [4] с интенсивной аэрацией при температуре 28 °С. При достижении клетками середины логарифмической фазы роста ($5,0 \times 10^8$ кл/мл) в среду добавляли митомицин С до

© Ф.И. Товкач, Л.В. Романюк, Т.Е. Горб, А.Н. Остапчук, Ф.В. Мучник, 2012

конечной концентрации 1,0 мкг/мл. Индуцированные лизаты обрабатывали хлороформом и осветляли центрифугированием при 8000g в течение 45 мин. Обнаружение и титрование бактериоцинов осуществляли методом негативных пятен [5].

Селекцию популяционных диссоциантов проводили на твердой среде с лактозой, используя следующую схему. На бактериальные газоны наносили по 5 мкл исходного каротоворицина. Чашки инкубировали 18 часов при 28 °С. Агаровые блоки размером 3х3х3 мм с клетками, которые выжили после инфицирования указанным бактериоцином, вырезали в местах образования пятен. Затем их помещали в раствор 2 мл жидкой среды LB и выращивали 18 часов при 28 °С. Выросшие бактериальные клетки пассировали под селективным прессом бактериоцина до получения устойчивых к нему диссоциантов [5].

Предварительную идентификацию форм липополисахарида у диссоциантов определяли методом SDS-ПААГ при окрашивании пластины геля нитратом серебра или кумасси [13]. Клетки разрушали 2 % SDS с последующей обработкой проназой в конечной концентрации 50 мкг/мл.

Гиперчувствительную реакцию исследовали на листьях *Nicotiana tabacum* и *Sedum spectabile*. Бактериальные клетки выращивали до плотности $2,0 \times 10^8$ кл/мл при 28 °С и отмывали солевой средой А. С помощью инсулинового шприца полностью развитые листья инокулировали полученной суспензией. Измеряли площадь заражения, которая была хорошо видна на внутренней стороне листа. Результаты учитывали через 48-72 часа после инокуляции [15]. Величину гиперчувствительной реакции (%) высчитывали как отношение площади пораженного участка к общей площади заражения.

Исследование подвижности клеточек у штаммов и диссоциантов проводили путем откалывания колоний ночной культуры на чашки с полужидкой (0,3 % агара) LB-средой [4] и инкубировали при 28 °С. Результаты учитывали через 24 часа [14].

Результаты и их обсуждение. Естественное направление диссоциации у штаммов *Pectobacterium carotovorum* представляет собой переход от S-формы к промежуточной SR-форме, которая характеризуется утратой части О-антигена и далее к R-форме, у которой наблюдаются более глубокие изменения в структуре липополисахарида. Низкая степень такой диссоциации возможна только для первоначально изолированного штамма. В этом случае можно говорить об исходном природном штамме [3]. В нашей работе штаммы, использованные для получения селекционных вариантов, уже представляли смесь различных диссоциантов, так как подвергались многократным пересевам и длительное время хранились на агаровых столбиках. Длительное хранение штаммов можно рассматривать как один из факторов воздействия внешней среды на клетку, что ведет к естественной изменчивости бактерий.

Используя разработанный нами метод специфической селекции с помощью каротоворицинов, для которых рецепторами (как и для фагов пектобактерий) является S-ЛПС [8], мы получили набор популяционных диссоциантов различных типов (рис. 1).

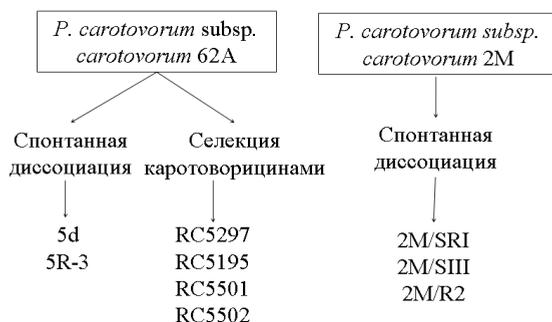


Рис. 1. Происхождение диссоциантов

RC – обозначение устойчивости к каротоворицинам.

Было обнаружено, что спонтанные диссоцианты и варианты, полученные при селекции бактериоцинами, характеризуются множественными изменениями фенотипа. От родительских штаммов пектобактерий они отличаются по росту на среде с лактозой, пектином, эозин-

метилловым синим [9]. Такие колониально-морфологические изменения не были связаны с потерей криптических плазмид [6].

Изменения в клеточных оболочках при диссоциативных переходах приводят к гетерогенности популяции бактерий. Идентификацию форм липополисахарида клеточной оболочки диссоциантов проводили экспресс-методом путем дезинтеграции клеток SDS с последующей обработкой проназой или без такой обработки. Продукты разделяли в денатурирующей системе SDS-ПААГ [16]. Гели окрашивали нитратом серебра или кумасси. При окраске кумасси на электрофореграмме мы наблюдали только белковые структуры (рис. 2), которые указывали на идентичность штамма *Psc* 62A с его диссоциантами. Окраска препаратов нитратом серебра давала возможность визуализировать липополисахарид после разрушения всех клеточных белков. На рис. 3 представлены парные профили нерасщепленных и расщепленных лизатов популяционных диссоциантов *Psc* 62A, окрашенные нитратом серебра. В результате удаления белков на профиле остаётся окрашенная часть ЛПС. У селекционного диссоцианта 62A-RC5297 липополисахаридные дуплетные фрагменты распределяются практически по всей высоте профиля, что свидетельствует о целостности или незначительных нарушениях в структуре ЛПС. Это позволяет выделить его в S-форму. Профили диссоциантов 62A-5d, 62A-RC5195, 62A-RC5502 подобны, но не идентичны. У вышеперечисленных вариантов отмечается наличие «неполной» молекулы ЛПС, о чем свидетельствует изменение профиля. Это указывает на полную или частичную потерю O-антигена и позволяет отнести диссоцианты к SR-типу. Незначительная часть дуплетных фрагментов на ЛПС-профилях штаммов *Psc* 62A, 62A-5R/3, 62A-RC5501 свидетельствует о более глубоких и значимых изменениях в структуре липополисахарида и позволяет причислить их к R-форме (рис. 3).

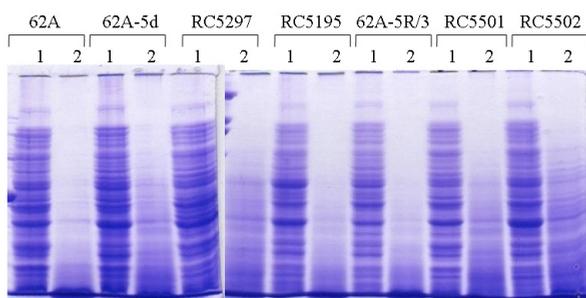


Рис. 2. Электрофореграмма SDS-ПААГ клеточных лизатов *P. carotovorum* 62A:

1 – клетки обработаны SDS;

2 – клетки обработаны SDS и проназой.

Гели окрашены кумасси. Сверху обозначены варианты диссоциантов.

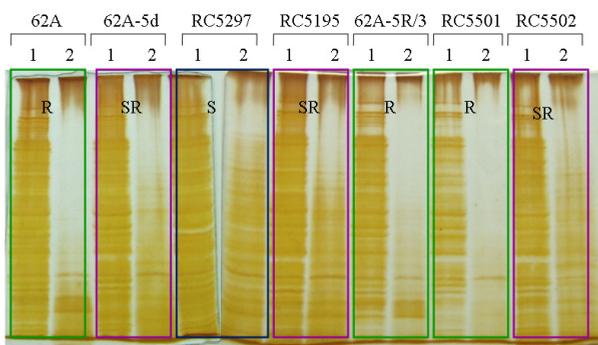


Рис. 3. Электрофореграмма SDS-ПААГ клеточных лизатов *P. carotovorum* 62A:

1 – клетки обработаны SDS;

2 – клетки обработаны SDS и проназой.

Гели окрашены нитратом серебра. Сверху обозначены варианты диссоциантов.

Аналогичные формы липополисахарида были обнаружены у бактерий штамма *Psc* 2M. Данные, представленные на электрофореграмме (рис. 4), позволили идентифициро-

вать S-форму у диссоцианта 2M/SIII, у которого дуплетные фрагменты распределяются по всей высоте профиля. Степень окраски липополисахарида на треках расщепленных лизатов *Pcc* 2M и диссоцианта 2M/SRI позволила отнести их к SR-типу, а диссоциант 2M/R2 к R-типу соответственно.

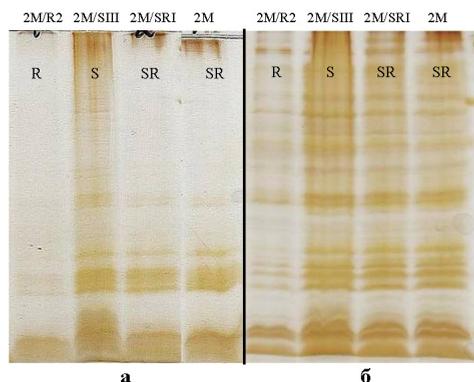


Рис. 4. Электрофореграмма SDS-ПААГ клеточных лизатов *P. carotovorum* 2M:

а – клетки обработаны SDS и проназой;

б – клетки обработаны SDS.

Гели окрашены нитратом серебра. Сверху обозначены варианты диссоциантов.

Изменения поверхностных структур клетки у пектобактерий мы рассматривали исключительно в связи с их способностью вызывать патогенный процесс. Ключевая роль в нем принадлежит комплексу энзимов, деградирующих клеточную стенку, основную долю которых составляют внеклеточные пектатлиазы [10]. Вторая группа факторов (таких как: экзополисахариды, липополисахариды, Нгр-система и подвижность) также вносит вклад в вирулентность фитопатогенных пектобактерий [12,11,17].

Ранее в тесте на патогенность с использованием ткани клубня картофеля было установлено, что исходные штаммы пектобактерий и различные популяционные диссоцианты вызывают развитие поражений двух типов – так называемой «черной» и «белой» гнили [1]. При «черной» гнили, вследствие осмотического шока клеток, нарушается целостность растительной ткани. «Белая» гниль является следствием преимущественного разрушения срединной пластинки растительной ткани. Эти данные свидетельствуют о том, что на уровне секреции II типа, которая является основным путем для секреции внеклеточных деструктивных ферментов, популяционная диссоциация, связанная с ЛПС, может действительно влиять на патогенность *Pectobacterium carotovorum*.

Однако, патогенный процесс у эрвиний, в основном, обусловлен системами секреции II и III типов, функционирование которых, как установлено, являются взаимосвязанными. Система секреции III типа задействована в формировании вирулентности на ранней стадии развития инфекции. Об эффективности её действия можно судить по интенсивности гиперчувствительной реакции, которая является специфическим защитным механизмом против патогенна в устойчивых индикаторных растениях. Представленные результаты (рис. 5) продемонстрировали, что селектированные каротоворицинами диссоцианты *Pcc* 62A вызывают разную степень гиперчувствительной реакции, которая проявляется характерными поражениями на индикаторном растении (рис. 5). Существенные изменения листовой поверхности *Sedum spectabile* были «спровоцированы» штаммом *Pcc* 2M и его диссоциантами (рис. 6). В экспериментах по исследованию гиперчувствительной реакции было показано, что наиболее характерные поражения на листьях индикаторного растения вызваны бактериями S- и SR-типов: *Pcc* 2M/SIII, 2M/SRI.

Существенные отличия у диссоциантов в строении клеточных оболочек обуславливают различия в текучести клеток, вызывая тем самым активность ряда ферментов, вовлеченных в патогенный процесс пектобактерий [14]. На рисунке 7 мы наблюдаем отсутствие подвижности клеток у вариантов R-типа: *Pcc* 62A, 2M/R2 (рис. 7). У вышеперечисленных штаммов отмечено снижение вирулентности по характерным показателям гиперчувствительной реакции

(рис. 5, 6). Обратная зависимость была обнаружена у селекционных диссоциантов S-типа: 62A-RC5297, 2M/SIII (рис. 7). Они демонстрируют существенную подвижность и проявляют значительную агрессивность в исследованиях гиперчувствительной реакции. Эти данные подтверждают, что подвижность клеток и, в свою очередь, целостность ЛПС-молекул имеют отношение к патогенности *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

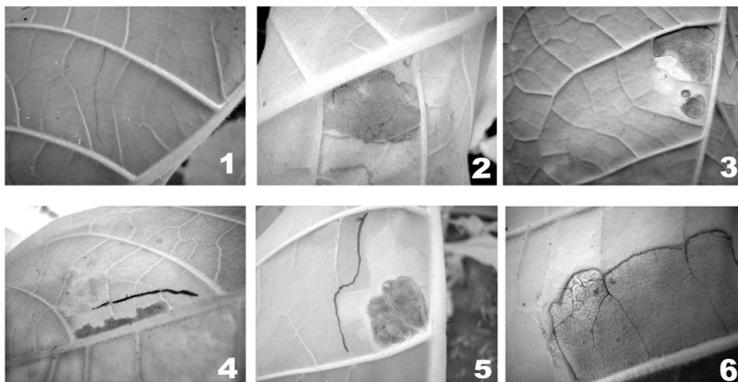


Рис. 5. Реакция гиперчувствительности, вызванная штаммом *Pcc* 62А и его диссоциантами на листьях *Nicotiana tabacum*: 1 – контроль, 2 – *Pcc* 62А, 3 – *Pcc* 62А-5d, 4 – *Pcc* 62А-RC5297, 5 – *Pcc* 62А-5/R3, 6 – *Pcc* 62А-RC5195.

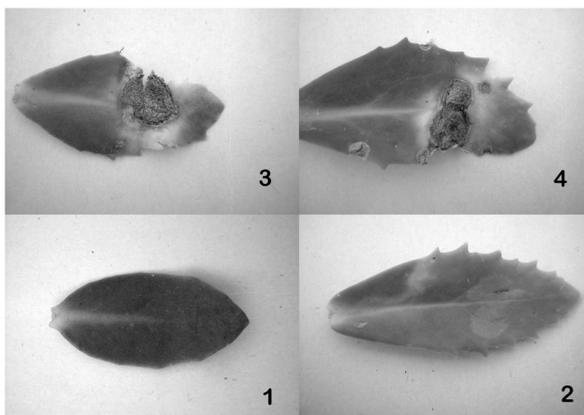


Рис. 6. Реакция гиперчувствительности, вызванная штаммом *Pcc* 2М и его диссоциантами на листьях *Sedum spectabile*:

1 – контроль, 2 – *Pcc* 2М/R2, 3 – *Pcc* 2М/SIII, 4 – *Pcc* 2М/SRI.

Таким образом можно предположить, что изменения поверхностных структур клеток *P. carotovorum* существенно влияют на системы секреции II и III типов. При этом наблюдаются нарушения локализации внеклеточной пектатлиазы, а также других экстрацеллюлярных ферментов [1]. Не исключено, что такие нарушения приводят к изменению патогенности микроба по отношению к растению. Особенно наглядно это проявляется на примере селекционного популяционного диссоцианта 62A-RC5195 (таблица). Следует отметить, что у этого диссоцианта SR-типа, кроме значительного усиления реакции гиперчувствительности и увеличения количества экзогенной пектатлиазы, возникает способность к репродукции бактериофага T7 и неспособность к адсорбции фага ZF40 [7]. Последнее свидетельствует о глубоком изменении структуры S-LPS. Наличие такого типа диссоциантов создает перспективы для фундаментального изучения процесса секреции II и III типов как основных факторов патогенности у пектобактерий.

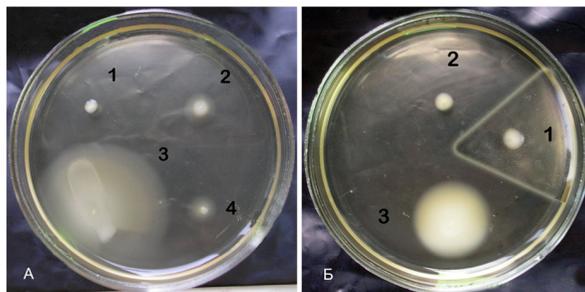


Рис. 7. Колонии двух штаммов *P. carotovorum* и их диссоциантов на среде LB с 0,3% агаром:
 А. 1 – *Pcc* 62А, 2 – *Pcc* 62А- RC5195, 3 – *Pcc* 62А-RC5297, 4 – *Pcc* 62А-5d
 Б. 1 – *Pcc* 2М/SRI, 2 – *Pcc* 2М/R2, 3 – *Pcc* 2М/SIII.

Таблица

Гиперчувствительная реакция, пектолитическая активность и чувствительность диссоциантов к фагам

Штамм <i>Pcc</i>	Гиперчувствительная реакция (HR), %	Удельная пектолитическая активность, % к контролю	Чувствительность к фагам	
			ZF40	T7
62А	51,5	100,0	+	-
RC5195	68,0	200,0	-	+

Таким образом, у *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* популяционная гетерогенность носит универсальный характер. Изменения поверхностных структур клетки, а именно: S-ЛПС, приводят к образованию SR-, R-форм диссоциантов, которые отличаются по способности бактерии вызывать инфекционный процесс.

Ф.І. Товкач, Л.В. Романюк, Т.Ю. Горб, А.М. Остапчук, Ф.В. Мучник

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

ДИСОЦІАЦІЯ PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM SUBSP. CAROTOVORUM, ПОВ'ЯЗАНА ЗІ ЗМІНАМИ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ

Резюме

Вперше показано, що популяційна гетерогенність у *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* розповсюджується на велику кількість штамів, тобто має універсальний характер. Використовуючи метод специфічної селекції за допомогою каротоворицинів типу фагових хвостових відростків, було отримано набір популяційних диссоціантів різних типів, оскільки S-ЛПС є тією частиною клітинної оболонки, яка містить сайти їх прикріплення. Встановлено, що зміни S-ліпополісахариду призводять до утворення SR-, R-форм у *P. carotovorum*. Зроблено припущення, що зміни поверхневих структур диссоціантів суттєво впливають на системи секреції II і III типів – головних факторів патогенності пектобактерій.

Одержані результати є передумовою для вивчення напрямку і причини процесу диссоціації, а також впливу її на патогенність *Pectobacterium carotovorum*.

Ключові слова: *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, клітинна оболонка, ліпополісахарид, диссоціація, селекція, каротоворицини.

F.I. Tovkach, L.V. Romanyuk, T.E. Gorb, A.N. Ostapchuk, F.V. Muchnyk

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

DISSOCIATION OF PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM SUBSP. CAROTOVORUM RELATED TO THE CHANGES IN THE CELL WALL LIPOPOLYSACCHARIDE

Summary

It is shown for the first time that population heterogeneity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* is applicable to a wide range of strains and therefore is a universal characteristic. Using the method

of specific selection with the help of carotovoricins which are identical to the phage tails a set of population dissociants of different types was obtained, due to the fact that S-LPS is the part of the cell wall which contains their attachment sites. It was determined that changes in S-lipopolysaccharides lead to the formation of SR-, R-forms of *P.carotovorum*. A suggestion is made that the changes in the surface structures of dissociants have a significant impact on secretion types II and III – the main pathogenicity factor of some bacteria. The results presented are a prerequisite for studying the direction, the reasons for dissociation process and its impact on the pathogenicity of *P.carotovorum*.

The paper is presented in Russian.

К е у w o r d s: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, cell, wall, lipopolysaccharides, dissociation, selection, carotovoricins.

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

1. Кушкіна А.И., Романюк Л.В., Горб Т.Е., Товкач Ф.И. Влияние профага ZF40 на секрецию пектаттлазы у *Erwinia carotovora* // Доп. НАН України. – 2006. - №6. – С. 154-156.
2. Матора Л.Ю., Серебренникова О.Б., Петрова Л.П. и др. Нетипичный характер R-S диссоциации *Azospirillum brasilense* // Микробиология. – 2003. -72, №1. –С. 60-63.
3. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. – М.: Изд-во МГУ, 1991. – 144с.
4. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. – М.: Мир, 1976. – 436с.
5. Товкач Ф.И., Биологические свойства и классификация бактериоцинов *Erwinia carotovora* // Микробиология. - 1998. – 67. №6. – С. 767-774.
6. Товкач Ф.И. Выделение и предварительная характеристика криптических плазмид *Erwinia carotovora* // Микробиология. – 2001. – 70, №6. – С. 804-810.
7. Товкач Ф.И. Изучение фагоустойчивости *Erwinia carotovora* с помощью умеренного бактериофага ZF40 // Микробиология. – 2002. – 71, №1. – С.82-88.
8. Товкач Ф.И., Мороз С.Н., Гвоздяк Р.И. Изучение адсорбционных рецепторов макромолекулярных бактериоцинов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Мікробіол.журн., -2001. – 63, №1. – С.23-33.
9. Товкач Ф.И., Романюк Л.В., Горб Т.Е. Использование макромолекулярных бактериоцинов для селекции популяционных диссоциантов *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Доп. НАН України. – 2010. - №1. – С. 164-169.
10. Barras F., Gijsegem F.V., Chatterjee A.K. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia* // Annu. Rev. Phytopathol. – 1994. – 32. – P.201-234.
11. Bauer D.W., Bogdanove A. J., Beer S.V., Collmer A. *Erwinia chrysanthemi hrp* genes and involvement in soft-rot pathogenesis and elicitation of the hypersensitive response // Mol. Plant Microbe Interact. – 1994. – 7. – P. 573-581.
12. Condemine G., Castillo A., Passeri F., Enard C. The PecT repressor coregulates synthesis of exopolysaccharides and virulence factors in *Erwinia chrysanthemi* // Mol. Plant Microbe Interact. – 1999. – 12. – P 45-52.
13. Hitchcock P.J., Brown T.M Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels // J. Bacteriol. – 1983. – 154, №1. – P. 269-277.
14. Hossain M.M., Shibata S., Aizawa S-I., Tsuyumu S. Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // Physiol. Mol. Plant Pathology – 2005. – 66. . – P.134-143.
15. Jap 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, №5. – P. 3013-3023.
16. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of dacteriophage T4 // Nature. – 1970. – 227. – P.680-685.
17. Mulholland V., Hinton J.C.D., Sidebotham J., Toth I.K., Hyman L.J. et.al. A pleiotropic reduced virulence (Rvi) mutant of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* is defective in flagella assembly proteins that are conserved in plant and animal bacterial pathogens // Mol. Microbiol. – 1993. – 9. – P. 343-356.

Отримано 08.01.2011