

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2019.06.067>

УДК 578.81 + 57.083.33

**Л.О. Максименко, Т.Ю.Горб**

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

E-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

## **Властивості низькомолекулярних каротоворицинів, виділених з природних ізолятів *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum***

*Представлено членом-кореспондентом НАН України Ф.І. Товкачем*

*Коліциноподібні каротоворицини (CCTV), одержані індукцією налідиксовою кислотою з природних ізолятів *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, виявлених у різних областях України, відрізняються за ступенем кілерної дії відносно індикаторних бактерій *P. carotovorum* та *Escherichia coli*. CCTV, виділені з сумарних фракцій *P. carotovorum* J2 та природних ізолятів бактерій з різних областей України, мали однаковий набір білків з молекулярними масами 18, 20, 24, 30, 46, 54 кДа. В результаті очищення на колонії з ДЕАЕ-сефарозою отримані фракції каротоворицинів, які склалися з пептидів з молекулярними масами 18, 24, 30, 38 кДа; вони не втрачали кілерної активності. За допомогою імуноблотингу з використанням антисироватки у складі низькомолекулярних каротоворицинів і бактеріофага ZF40 виявлені серологічно споріднені білкові компоненти з молекулярними масами близько 10, 11, 18 і 20 кДа. Встановлено, що каротоворицини містять також не ідентичні, але серологічно споріднені з ZF40 білки.*

**Ключові слова:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, коліциноподібні каротоворицини (CCTV), кілерна активність, білки, бактеріофаг ZF40, серологічна спорідненість.

Дослідження бактеріоцинів як кілерних агентів є перспективним з наукової та практичної точки зору в зв'язку з унікальними механізмами їх протибактеріальної дії. Це пов'язано з нагальною потребою збільшити арсенал засобів боротьби з мультирезистентними до антибіотиків патогенними бактеріями.

Відомо, що фітопатогенна бактерія *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* при лізогенній індукції здатна одночасно синтезувати бактеріоцини двох типів — макромолекулярні (неповні помірні фаги типу хвостових відростків, MCTV) та низькомолекулярні коліциноподібні каротоворицини (CCTV) [1]. Низькомолекулярні бактеріоцини більш стійкі до впливу температурного чинника, ніж MCTV. Вони можуть витримувати нагрівання протягом 30 хв при 70 °С без втрати кілерної активності. Низькомолекулярні каротоворицини — це протеазочутливі білки, які не седиментують за умов ультрацентрифугування, не виявляються в електронному мікроскопі і вільно дифундують в агарі. Утворення біль-

шості високо- і низькомолекулярних кілерних часток залежить від SOS-системи клітини-хазяїна [2]. Дослідження механізмів кілерної дії низькомолекулярних бактеріоцинів показало, що вони здатні блокувати більшість процесів, які відбуваються в бактеріях [2, 3]. Низькомолекулярні каротоворицини також реалізують свій антимікробний потенціал за рахунок нуклеазної активності, асоційованої з частками [4]. Крім того, каротоворицини *P. carotovorum* можуть являти собою стійкі комплекси, що складаються з білка і ліпиду, в якому розчинений каротиноїд.

Є дані про спорідненість між бактеріофагами P2, PS17 і R-піоцинами *Pseudomonas aeruginosa*. Так, методом імуноблоту показано, що за допомогою сироватки, одержаної до білків бактеріофага PS17, виявляються фагові білки у складі піоцину R2 *P. aeruginosa* [5].

Раніше нами була показана серологічна спорідненість білків MCTV *P. carotovorum*, виділених з різних географічних регіонів (Японія, Росія, Білорусь та США), зі структурними білками бактеріофага ZF40 [6].

Мета даного дослідження полягала у вивченні білкового складу, кілерних властивостей CCTV та серологічної спорідненості низькомолекулярних каротоворицинів з білками бактеріофага ZF40.

**Матеріали і методи.** У дослідженні використані бактерії, які були виділені в трьох областях України та ідентифіковані нами як *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* [5], а також японський штам J2, який занесений до світового банку ервіній (таблиця). Усі бактерії є продуцентами низькомолекулярних бактеріоцинів.

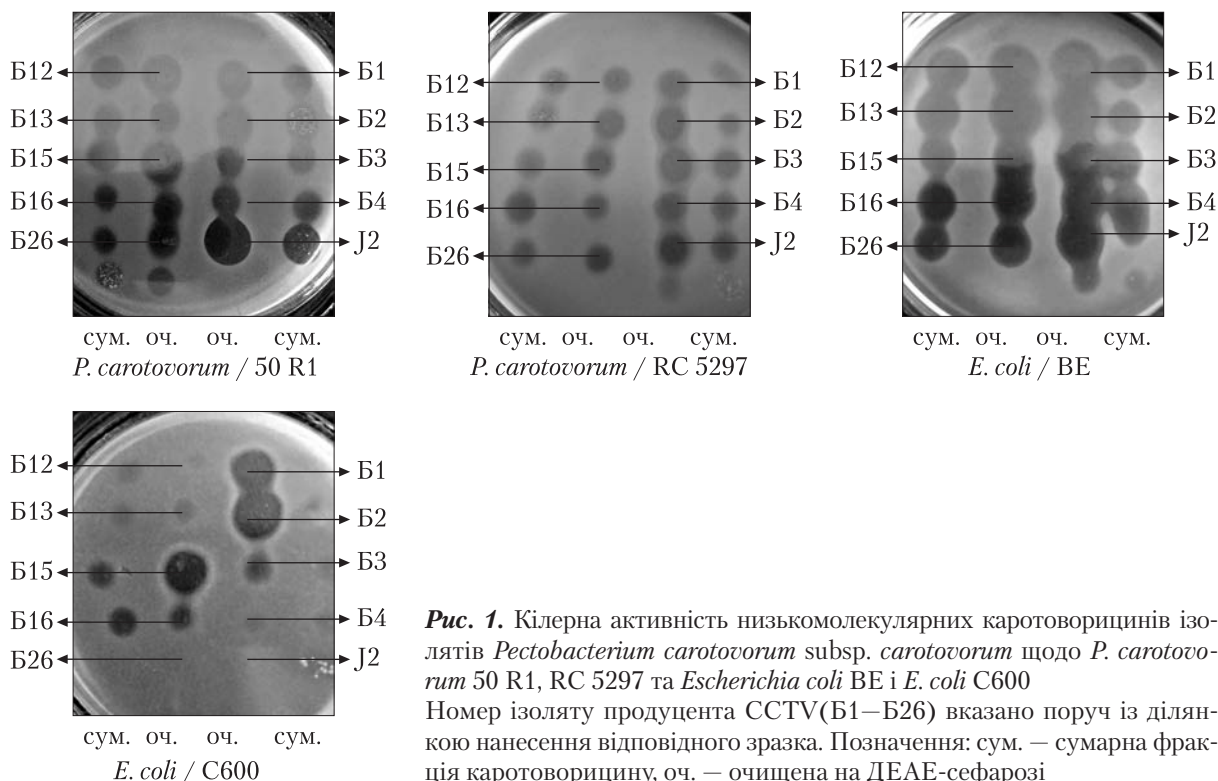
Бактеріальні клітини вирощували в мінімальному середовищі M9 протягом 24 год. Індукторами бактеріоцинів можуть бути УФ промені, мітоміцин С і налідиксова кислота. Однак у лізатах, одержаних за допомогою налідиксової кислоти, міститься менша кількість часток типу фагових хвостових відростків, ніж низькомолекулярних бактеріоцинів [1]. З цієї причини індукцію каротоворицинів *P. carotovorum* проводили налідиксовою кислотою [1, 8]. Концентрування каротоворицинів здійснювали методом висолювання 50 % сульфатом амонію, який вносили до лізату за наявності 0,1 М NaCl.

Суміш часток каротоворицинів осаджували центрифугуванням при 10000 об/хв протягом 30 хв. Осад ресуспендували в А-буфері [8] з додаванням 20 мМ MgSO<sub>4</sub>.

**Штами *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, продуценти каротоворицинів**

Штами бактерій	Рослина-хазяїн	Місце виділення
NCPPB 1744 J2	<i>Daucus sativus</i> Roehl.	Японія
Б1	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Україна, Черкаська обл.
Б2, Б3, Б4, Б11, Б12, Б13, Б15, Б16, Б17, Б23	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Україна, Київська обл.,
Б26	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Україна, Вінницька обл.

Потім суспензію обробляли РНКазою і ДНКазою з розрахунку 1 мкг/мл, 30 хв за температури 37 °С. Суміш бактеріоцинів розділяли в роторі SW-40 центрифуги Beckman при 30000 об/хв протягом 4 год у сахарозному градієнті (5–20 %), який містив 20 % етанолу в 0,01 М *трис*-HCl буфері, рН 7,2. Після центрифугування в осаді виявляли високомолекулярні бактеріоцини типу хвостових відростків. Цей факт неодноразово було підтверджено електронномікроскопічними дослідженнями. У дослідженні ми використовували “легку” фракцію каротоворицинів, яка сформувалася над сахарозним шаром. Цю

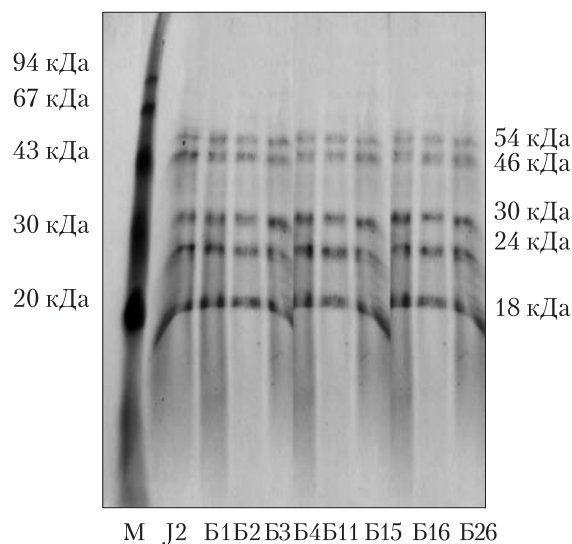


**Рис. 1.** Кілерна активність низькомолекулярних каротоворицинів ізолятів *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* щодо *P. carotovorum* 50 R1, RC 5297 та *Escherichia coli* BE і *E. coli* C600  
Номер ізоляту продуцента ССТV(Б1–Б26) вказано поруч із ділянкою нанесення відповідного зразка. Позначення: сум. — сумарна фракція каротоворицину, оч. — очищена на ДЕАЕ-сефарозі

фракцію ми відбирали шприцем, концентрували за допомогою сульфату амонію, діалізували і досліджували як сумарну. Додаткове очищення низькомолекулярних каротоворицинів здійснювали методом колончатої хроматографії за допомогою ДЕАЕ-сефарози як описано раніше [8]. Фракції ССТV, одержані в результаті елюції 0,2 М NaCl, концентрували і використовували в дослідженні. Кілерну активність каротоворицинів визначали на індикаторних культурах *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) 50R1, RC5297, а також *Escherichia coli* BE і C600. Електрофоретичне розділення білків виконували за методом Laemmli [9]. Як маркери використовували суміш білків фірми “Pharmacia” (Швеція).

Бактеріофаг ZF40 одержували методом злитного лізису [10]. Імуноблотинг білків здійснювали за Towbin зі співавт. [11]. Після електрофоретичного розділення в ПААГ білкові смуги переносили на нітроцелюлозний фільтр Schleicher & Schul з розміром пор 0,45 мкм. Далі нітроцелюлозу обробляли як описано в [12].

**Результати досліджень та обговорення.** На першому етапі дослідження визначали кілерні властивості отриманих низькомолекулярних каротоворицинів, виділених з бактерій *P. carotovorum* J2 та Б1–Б26. Кілерну дію спостерігали на індикаторних культурах *P. carotovorum* 50R1, RC5297 та *E. coli* В і С600. Результати антибактеріальної дії одержаних речовин наведено на рис. 1. Зразки ССТV, виділені з фітопатогенних бактерій різних екологічних ніш, нанесені в однаковій дозі, відрізняються ступенем кілерної активності відносно індикаторних бактерій. Зразки наносили в одному порядку від Б1 до Б26. З рис. 1 видно, що елюйовані на ДЕАЕ-целюлозі 0,2 М NaCl каротоворицини були більш активними щодо індикаторних штамів бактерій, ніж сумарна фракція. Діаметри зон лізису коливалися від 3



сумарних фракцій *P. carotovorum* J2 та природних ізолятів бактерій з різних областей України (B1–B26) (рис. 2), вони мали однаковий набір білків з молекулярними масами 18, 20, 24, 30, 46, 54 кДа. Каротоворицини, додатково очищені методом іонообмінної хроматографії на ДЕАЕ-сефарозі, використовували в подальших дослідженнях. Застосовуючи для почергової елюції різні концентрації NaCl (0,1, 0,2 та 0,3 М), можна розділити ССТV за кілерною активністю відносно різних ентеробактерій. Таким чином, раніше нами була отримана фракція ССТV/Б4, яка містила лише білок 54 кДа. Цей каротоворицин виявився специфічним кілерним білком відносно бактерій *E. coli* штаму BE [8].

Одержані нами низькомолекулярні каротоворицини за молекулярною масою корелюють з такими, що описані в літературі. Відомо декілька низькомолекулярних каротоворицинів *P. carotovorum*. Так, кароцин D кодується геном *caroDK*, який локалізований на геномній ДНК разом із геном *caroDI*, що кодує білок імунності. Кароцин D синтезується як білок-попередник, із якого під час дозрівання видаляються вісім амінокислот на N-кінці. Кароцин D має два домени транслокації, а N- та C-кінцеві домени є гомологічними до таких у коліцину E3 *E. coli* і піоцинів S-типу *P. aeruginosa* відповідно. Кароцин D на C-кінці містить ДНКазний домен. Цей бактеріоцин характеризується незначною стійкістю до нагрівання і чутливістю до дії протеази. Гени *caroDK* виявляються в 5 із 54 штамів *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* [13].

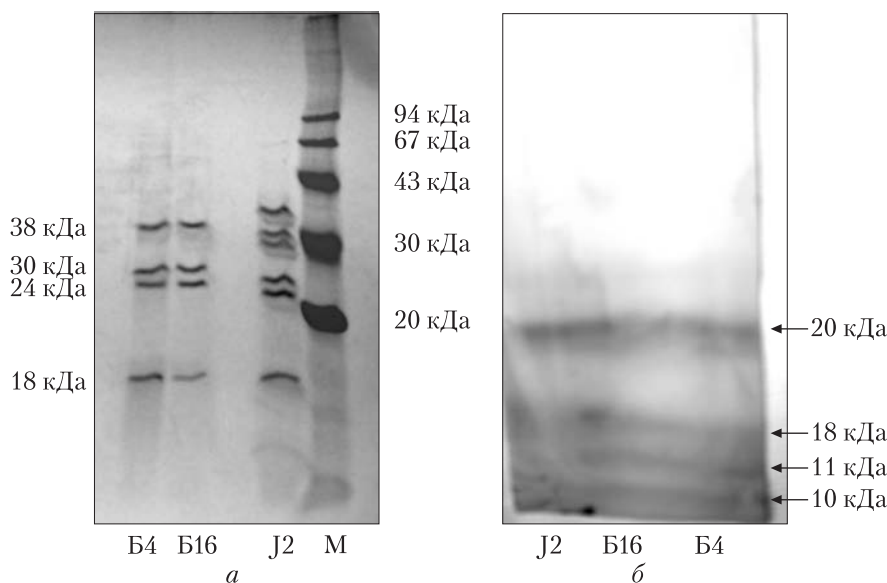
Кароцин S1 характеризується нуклеазною активністю і має розмір 1,9 kb, *caroS1K* є кілерним білком і має молекулярну масу 55,5 кДа, а *caroS1I* характеризували як білок імунності, його молекулярна маса становить 14,8 кДа. Їх гени є гомологічними до генів піоцинів S3 та AP41 [14]. Кароцин S2 – низькомолекулярний бактеріоцин, він індукується за умов УФ опромінення, проте на його виділення не впливає мітоміцин С. Молекулярна маса кілерного білка *CaroS2K* становить 85 кДа, а білка імунності *CaroS2I* – 10 кДа. Він є бактеріоцином з рибонуклеазним типом активності [4].

Є дані про спорідненість між бактеріофагами P2, PS17 і R-піоцинами *P. aeruginosa*. Так, методом імуноблоту показано, що за допомогою сироватки, одержаної до білків бактеріофага PS17, виявляються фагові білки у складі піоцину R2 *P. aeruginosa* [5].

**Рис. 2.** Електрофореграма білків сумарних фракцій низькомолекулярних каротоворицинів, виділених з ізолятів *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*

до 20 мм. Особливо висока кілерна дія каротоворицинів виявлена щодо *E. coli* BE, а також ССТV з природних ізолятів B1, B2 і B15 – відносно *E. coli* С600. Відомо, що частки ССТV на індикаторних культурах зумовлюють утворення негативних зон лізису значно більшого діаметра порівняно з високомолекулярними бактеріоцинами. Це вказує на їх високу здатність до дифузії у напіврідкому агарі і, очевидно, на низьку молекулярну масу.

Як свідчить аналіз електрофореграми розділення білків препаратів ССТV, виділених із



**Рис. 3.** Електрофореграма білків очищених фракцій каротоворицинів на ДЕАЕ-сефарозі (а) та імуноблот білків з використанням сироватки, одержаної до білків бактеріофага ZF40 (б)

З літератури відомо також, що в деяких випадках рецептори є спільними для певних бактеріоцинів і фагів, наприклад таких, як коліцин К та фаг Т6 або коліцин Е та фаг ВF23 [15].

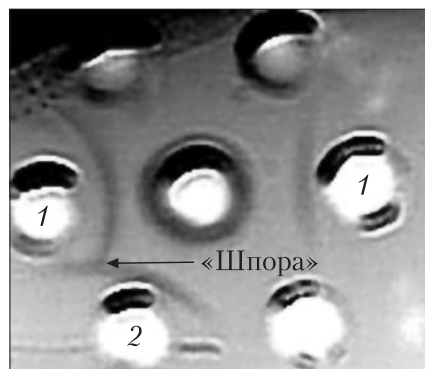
Раніше нами була показана серологічна спорідненість білків МСТV *P. carotovorum*, виділених з різних географічних регіонів (Японія, Росія, Білорусь та США), із структурними білками бактеріофага ZF40 [6].

Крім того, за допомогою сироватки, одержаної до білків бактеріофага ZF40, у складі МСТV *P. carotovorum* методом імуноблоту виявлені споріднені білки з молекулярними масами 72, 66, 39 і 24 кДа. Також нами показано, що адсорбційна здатність фага ZF40 і МСТV/J2 корелює з наявністю серологічної спорідненості білків у складі їх часток [12].

У зв'язку з цим за допомогою антисироватки, одержаної до бактеріофага ZF40, методом імуноблоту визначали можливі серологічно споріднені фагові білки у складі низькомолекулярних каротоворицинів. Методом електрофорезу в ПААГ у складі елюйованих на ДЕАЕ-сефарозі фракцій ССТV *P. carotovorum* були виявлені такі білки з кілерною активністю: 18, 24, 30, 38 кДа (рис. 3, а). Деяка різниця між сумарними і елюйованими 0,2 М NaCl фракціями каротоворицинів, найімовірніше, може бути обумовлена нестійкими зв'язками між білковими субодинацями, а також дією протеаз.

Описані в літературі низькомолекулярні каротоворицини *P. carotovorum* кароцин Д (мол. м. 29 кДа), кароцин S11 (мол. м. 14,8 кДа) та білок імунності Саго S21 (мол. м. 10 кДа) мають близьку молекулярну масу до таких, що є у складі одержаних нами фракцій. Методом імуноблоту з використанням сироватки, одержаної до білків бактеріофага ZF40 в низькомолекулярних, очищених на ДЕАЕ-сефарозі каротоворицинах, нами виявлені серологічно споріднені білки з молекулярними масами близько 10, 11, 18 і 20 кДа (див. рис. 3, б). Очевидно, що імунохімічним методом виявляються білки, які містяться в мінімальній кількості, порівняно з тими, які видимі на електрофореграмі. Можна зробити припущення, що у каротоворицинів у процесі їх утворення та функціонування відбувається перерозподіл біл-





**Рис. 4.** Реакція імунопреципітації білків CCTV (1) та бактеріофага ZF40 (2). У центрі нанесена антисироватка до білків бактеріофага ZF40

ків між мажорними, проміжними і мінорними компонентами, які, можливо, впливають на їх кілерну дію. Суть такого явища ще необхідно досліджувати. Можна припустити, що вони утворюються під дією протеаз.

Методом подвійної імунодифузії в 1 % агарі встановлено також, що каротоворицини мають не ідентичні, але серологічно споріднені з ZF40 білки. Про це свідчить наявність “шпори” в реакції імунопреципітації (рис. 4).

Таким чином, на підставі даних літератури та отриманих нами результатів вивчення низькомолекулярних каротоворицинів, індукованих налідиксовою кислотою, можна зробити висновок, що у різних штамів *P. carotovorum* внаслідок SOS-індукції можуть утворюватися різні низькомолекулярні каротоворицини, які відрізняються між собою за механізмом, ступенем антимікробної дії, білковим складом та серологічною спорідненістю з фаговими білками.

Залишається актуальною необхідність подальшого вивчення властивостей низькомолекулярних каротоворицинів, оскільки вони можуть розглядатися як важливі інструменти мікробного антагонізму.

#### ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Товкач Ф.И. Дефектная лизогения *Erwinia carotovora*. *Микробиология*. 2002. **71**, № 3. С. 359–367.
2. Lu F.M., Chak K.F. Two overlapping SOS boxes in Col E1 operon are responsible for the viability of cells harbor ring the Colplasmid. *Mol. Gen. Genet.* 1996. **251**, № 4. P. 407–411.
3. Zakharova S.D., Gramer W.A. Colicin crystal structure: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. **1565**, № 2. P. 333–346.
4. Chan Y.C, Wu J.L, Wu H.P, Tzeng K.C., Chuang D.Y. Cloning, purification, and functional characterization of Carocin S2, a ribonuclease bacteriocin produced by *Pectobacterium carotovorum*. *BMC Microbiol.* 2011. **12**. P. 11–99. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-99>
5. Nakayama K., Takashima K., Ishihara H., Shinomiya T., Kageyama M., Kanaya Sh., Ohnishi M., Murata T., Mori H., Hayashi T. 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.
6. Максименко Л.А., Товкач Ф.И. Серологическое родство белков бактериоцинов *Erwinia carotovora*, выделенных из различных экологических ниш, со структурными белками бактериофага ZF40. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2012. № 7. С. 158–163.
7. Максименко Л.А., Пархоменко Н.И., Мороз С.Н., Горб Т.Е. Изучение свойств изолятов пектолитических фитопатогенных бактерий, выделенных в Украине. *Мікробіол. журн.* 2013. **75**, № 6. С. 66–72.
8. Максименко Л.О., Балко О.І., Балко О.Б. Низькомолекулярні каротоворицини *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Мікробіологія і біотехнологія*. 2017. № 3. С. 75–83.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*. 1970. **227**, № 5259. P. 680–685.
10. Панцина А.И., Товкач Ф.И., Романюк Л.В., Максименко Л.А. Физико-химические свойства умеренного бактериофага ZF40 *Erwinia carotovora*. *Мікробіол. журн.* 2007. **69**, № 2. С. 15–22.
11. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1979. **76**. № 9. P. 4350–4354.

12. Максименко Л.О., Романюк Л.В. Связь серологического родства белков с адсорбцией частиц бактериоцина *Pectobacterium carotovorum* J2 и бактериофага ZF40. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2016. № 12. С. 90–95. doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2016.12.090>
13. Roh E., Park T.H., Kim Mi, Lee S., Ryu S., Oh Cs., Rhee S., Kim Dh., Park Bs., Heu S. Characterization of a new bacteriocin, carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc 21. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, **22**, № 76. P. 7541–7549.
14. Chuang D.-Y., Chien Y.-C., Wu H.-P. Cloning and expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gene encoding the low-molecular-weight bacteriocin carocin S1. *J. Bacteriol.* 2007. **189**, № 2. P. 620–626.
15. Ito K., Kageyama M., Egami F. Isolation and characterization of pyocins from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 1970. **16**. P. 205–214.

Надійшло до редакції 04.03.2019

## REFERENCES

1. Tovkach, F. I. (2002). Defective lysogeny in *Erwinia carotovora*. *Microbiology*, 71, No. 3, pp. 359-367 (in Russian).
2. Lu, F. M. & Chak, K. F. (1996). Two overlapping SOS boxes in Col E1 operon are responsible for the viability of cells harbor ring the Colplasmid. *Mol. Gen. Genet.*, 251, No. 4, pp. 407-411.
3. Zakharova, S. D. & Gramer, W. A. (2002). Colicin crystal structure: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1565, No. 2, pp. 333-346.
4. Chan, Y. C., Wu, J. L., Wu, H. P., Tzeng, K. C. & Chuang, D. Y. (2011). Cloning, purification, and functional characterization of Carocin S2, a ribonuclease bacteriocin produced by *Pectobacterium carotovorum*. *BMC Microbiol.*, 12, pp. 11-99. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-99>
5. Nakayama, K., Takashima, K., Ishihara, H., Shinomiya, T., Kageyama, M., Kanaya, Sh., Ohnishi, M., Murata, T., Mori, H. & Hayashi, T. (2000). The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol. Microbiol.*, 38, No. 2, pp. 213-231.
6. Maksymenko, L. A. & Tovkach, F. I. (2012). Serological relationship of bacteriocins' proteins of *Erwinia carotovora* isolated from various ecological regions and with structural proteins of bacteriophage ZF 40. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 7, pp. 158-163 (in Russian).
7. Maksymenko, L. A., Parkhomenko, N. I., Moroz, S. N. & Gorb, T. E. (2013). Properties investigation of isolates of pectolytic phytopathogenic bacteria obtained in Ukraine. *Microbiol. Zhurn.*, 75, No. 6, pp. 66-72 (in Ukrainian).
8. Maksymenko, L. A., Balko, O. I. & Balko, O. B. (2017). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* low-molecular-weight carotovoricins. *Mikrobiol. and biotechnol.*, No. 3, pp. 75-83 (in Ukrainian).
9. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*, 227, No. 5259, pp. 680-685.
10. Panshchina, A. I., Tovkach, F. I., Romaniuk, L. V. & Maksymenko, L. A. (2007). Physico-chemical properties of temperate bacteriophage ZF40 of *Erwinia carotovora*. *Microbiol. Zhurn.*, 69, No. 2, pp. 15-22 (in Russian).
11. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 76, No. 9, pp. 4350-4354.
12. Maksymenko, L. A. & Romaniuk, L. V. (2016). The relation between the serological similarity of proteins and the adsorption of particles of *Pectobacterium carotovorum* J2 bacteriocins and bacteriophage ZF40. *Dopov. Nac. akad. nauk Ukr.*, No. 12, pp. 90-95 (in Russian). doi: <https://doi.org/dopovidi2016.12.090>
13. Roh, E., Park, T. H., Kim, Mi, Lee, S., Ryu, S., Oh, Cs., Rhee, S., Kim, Dh., Park, Bs. & Heu, S. (2010). Characterization of a new bacteriocin, carocin D, from *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc 21. *Appl. Environ. Microbiol.*, 22, No. 76, pp. 7541-7549.
14. Chuang, D.-Y., Chien, Y.-C. & Wu, H.-P. (2007). Cloning and expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gene encoding the low-molecular-weight bacteriocin carocin S1. *J. Bacteriol.*, 189, No. 2, pp. 620-626.
15. Ito, K., Kageyama, M. & Egami, F. (1970). Isolation and characterization of pyocins from several strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 16, pp. 205-214.

Received 04.03.2019

Л.А. Максименко, Т.Е. Горб

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев  
E-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

СВОЙСТВА НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ КАРОТОВОРИЦИНОВ,  
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ  
*PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. *CAROTOVORUM*

Колициноподобные каротоворицины (CCTV), полученные индукцией налидиксовой кислотой из природных изолятов *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* в разных областях Украины, отличаются степенью киллерного действия относительно индикаторных бактерий *P. carotovorum* и *Escherichia coli*. CCTV, выделенные из суммарных фракций *P. carotovorum* J2 и природных изолятов бактерий с разных областей Украины, имели одинаковый набор белков с молекулярными массами 18, 20, 24, 30, 46, 54 кДа. При очистке на колонке с ДЕАЕ-сефарозой получены фракции каротоворицинов, состоящие из пептидов с молекулярными массами 18, 24, 30, 38 кДа; они не теряли киллерной активности. С помощью иммуноблота с использованием антисыворотки в составе низкомолекулярных каротоворицинов и бактериофага ZF40 выявлены серологически родственные белковые компоненты с молекулярными массами около 10, 11, 18 и 20 кДа. Установлено, что каротоворицины содержат также не идентичные, но серологически родственные с ZF40 белки.

**Ключевые слова:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, колициноподобные каротоворицины (CCTV), киллерная активность, белки, бактериофаг ZF40, серологическое родство.

L.A. Maksymenko, T.Yu. Gorb

D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine, Kiev  
E-mail: maksymenko.l.a@gmail.com

PROPERTIES OF THE LOW MOLECULAR WEIGHT  
CAROTOVORICINS FROM THE NATURAL ISOLATES  
*PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* SUBSP. *CAROTOVORUM*

Colicin-like carotovoricins (CCTV) has been induced by the nalidixic acid treatment of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* natural isolates from the different regions of Ukraine. It has been found that CCTV exhibit the different level of killer activity against the indicator strain of *P. carotovorum* and *Escherichia coli*. CCTV isolated from total fractions of *P. carotovorum* J2 and natural bacterial isolates from different regions of Ukraine had the same set of proteins with molecular masses of 18, 20, 24, 30, 46, and 54 kDa. After the purification carried out at DEAE-sepharose, the active components with molecular masses of 18, 24, 30, and 38 kDa were isolated. Immunoblot analysis with antiserum revealed serologically related protein components with molecular masses of 10, 11, 18, and 20 kDa in low molecular weight carotovoricins and bacteriophage ZF 40. It has been established that cartovoricins also contain proteins that are not identical, but serologically related to ZF40.

**Keywords:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, colicin-like carotovoricins (CCTV), killer activity, proteins, serological similarity.