

Н.В. Лиманская¹, В.А. Иваница¹, Ж.Ю. Сергеева¹, Ф.И. Товкач²

¹Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: limmy@mail.ru

²Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

БАКТЕРИОЦИНОГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ *RHIZOBIUM VITIS* И *PANTOEA AGGLOMERANS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТЕНИЙ ВИНОГРАДА

Выделенные штаммы Rhizobium vitis и Pantoeae agglomerans проявили бактериоциногенную активность по отношению к близкородственным штаммам. Показано, что исследованные культуры различались по чувствительности к бактериоцинам. По сравнению с митомициновой индукцией, в случае спонтанного выхода бактериоцинов выявлялось значительно меньшее количество зон лизиса на газонах тест-культур, однако ряд штаммов все же демонстрировал хорошо выраженную бактериоциногенную активность.

К л ю ч е в ы е с л о в а: *Rhizobium vitis, Pantoeae agglomerans, бактериоцины.*

Бактериальный рак винограда — опаснейшее заболевание для молодых питомников. При его развитии уже на третий год возможна гибель 70% молодых растений [1]. Возбудителями бактериального рака являются *Rhizobium vitis* (ранее известная как *Agrobacterium vitis*) и *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) — граммотрицательные бактерии, населяющие ксилему растений.

Эффективные меры борьбы с данными фитопатогенами до настоящего времени не разработаны. Перспективным направлением является использование штаммов-антагонистов [2]. Так, известно, что штамм *R. rhizogenes* K84 продуцирует бактериоцин агроцин, подавляющий активность многих штаммов *Rhizobium* [7]. Из штамма *R. radiobacter* E26 был выделен новый низкомолекулярный бактериоцин Ar26. Этот бактериоцин, являясь аналогом нуклеозидов, кроме киллерной активности, способен также подавлять функции обратной транскриптазы и α - и β -глюкозидаз [6, 10]. Вещества с подобными активностями являются ценными потенциальными агентами биологического контроля бактериального рака.

Целью данной работы было изучение бактериоциногенной активности патогенных штаммов *R. vitis*, выделенных из растений винограда юга Украины.

Материалы и методы исследования

В работе использованы 10 штаммов *R. vitis*, выделенных на одном из виноградников Одесской области, и штамм *R. radiobacter* C58, несущий туморогенную плазмиду pTi-C58 нопаинового типа. Идентификацию штаммов проводили методом полимеразной цепной реакции [4].



Для исследования потенциала антагонистических взаимоотношений других представителей микробиоты растения нами было проведено изучение влияния бактериоцинов эпифитной бактерии *Pantoeae agglomerans* на рост штаммов *R. vitis*. Штаммы *P. agglomerans* были выделены из растений того же виноградника Одесской области, из которого выделяли исследуемые штаммы ризобий.

Для культивирования бактерий использовали среду LB с увеличенным содержанием компонентов (г/л): пептон — 15, дрожжевой экстракт — 10, NaCl — 5.

Индукцию бактериоцинов проводили при помощи митомицина С (1 мкг/мл), который вносили в середине логарифмической фазы роста культур, после чего бактерии культивировали 24 часа при 28 °С.

Кроме того, все штаммы проверяли на спонтанный выход бактериоцинов в стационарной фазе роста при культивировании в среде LB. Клетки осаждали центрифугированием для получения надосадочной жидкости.

Лизаты бактериальных клеток, полученные после добавления в культуры митомицина С, и надосадочную жидкость обрабатывали хлороформом (0,5–1%) и азидом натрия (0,02%), очищали центрифугированием и хранили в 0,02% растворе азида натрия при +4 °С.

Для оценки потенциала антагонистических взаимоотношений проводили перекрестную проверку бактериоциночувствительности каждого из 10 исследуемых штаммов *R. vitis* к полученным препаратам бактериоцинов. Зоны лизиса свежезасеянных газонных культур, образуемые в месте нанесения 5 мкл лизата или надосадочной жидкости, учитывали после 18 часов инкубации чашек с LB агаром при 28 °С. Все исследования проводили в двух повторностях. В качестве положительного контроля применяли *R. radiobacter* C58.

Результаты исследований и их обсуждение

Результаты изучения бактериоциногенной активности штаммов *R. vitis*, а также штамма *R. radiobacter* C58 показали, что возбудители бактериального рака значительно различались по чувствительности к бактериоцинам родственных бактерий, индуцированных митомицином С (табл. 1).

По этому показателю 11 штаммов можно условно разделить на несколько групп. Пять штаммов (*R. vitis* 1, *R. vitis* 7, *R. vitis* 11, *R. vitis* 13, *R. vitis* 15) проявили чувствительность к бактериоцинам всех исследованных культур. При этом большинство из них (кроме *R. vitis* 6 и *R. vitis* 8, а также контрольного штамма *R. radiobacter* C58) лизируются собственными бактериоцинами. Эти результаты позволяют предположить, что данные киллеры являются факторами автолизиса *R. vitis*.

Штаммы *R. vitis* 8 и *R. vitis* 6 оказались устойчивыми к лизису бактериоцинами. Уровень их чувствительности не достигал такового контрольного неродственного штамма *R. radiobacter* C58 и составил 9 и 27%, соответственно. К бактериоцинам более чем половины исследованных культур были чувствительны 70% штаммов.

В свою очередь, если рассматривать штаммы ризобий в качестве продуцентов, то они также очень разнообразны по спектру киллерной активности их бактериоцинов (табл. 1). Так, например, *R. vitis* 14 продуцировал бактериоцины, которые вызвали лизис клеток 9 штаммов (81%), тогда как киллеры из штаммов *R. vitis* 1 и *R. vitis* 7 характеризуются наименьшей активностью. Такие результаты в первую



Таблица 1
Чувствительность культур *R. vitis* к бактериоцинам близкородственных штаммов, индуцированных митомицином С

Table 1
Sensitivity of *R. vitis* cultures to mitomycin-induced bacteriocines of the close-related strains

Штамм-продукент	Тест-штамм											Лизируемые штаммы, %
	<i>R.vitis</i> 1	<i>R.vitis</i> 7	<i>R.vitis</i> 11	<i>R.vitis</i> 15	<i>R.vitis</i> 13	<i>R.vitis</i> 5	<i>R.vitis</i> 14	<i>R.vitis</i> 9	<i>R.radiobacter</i> C58	<i>R.vitis</i> 6	<i>R.vitis</i> 8	
<i>R. vitis</i> 13	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	90
<i>R. vitis</i> 14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	81
<i>R. vitis</i> 6	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	72
<i>R. vitis</i> 8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	72
<i>R. vitis</i> 11	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	72
<i>R. vitis</i> 15	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	72
<i>R. vitis</i> 5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	63
<i>R. vitis</i> 9	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	63
<i>R. radiobacter</i> C58	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	63
<i>R. vitis</i> 1	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	54
<i>R. vitis</i> 7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	54
Лизирующие штаммы, %	100	100	100	100	100	81	63	45	36	27	9	

Примечание: «+» — наличие лизиса, «-» — отсутствие лизиса.



Таблица 2
Чувствительность культур *R. vitis* к бактериоцинам близкородственных штаммов, выделенных в результате спонтанной индукции

Table 2
Sensitivity of *R. vitis* cultures to bacteriocines of close-related strains obtained as a result of spontaneous induction

Штамм-продуцент	Тест-штамм													Лизируемые штаммы, %	
	<i>R.vitis</i> 9	<i>R.vitis</i> 11	<i>R.vitis</i> 13	<i>R.vitis</i> 14	<i>R.vitis</i> 5	<i>R.vitis</i> 6	<i>R.vitis</i> 8	<i>R.vitis</i> 7	<i>R.vitis</i> 1	<i>R.vitis</i> 15	<i>R.radiobacter</i> C58	Лизируемые штаммы, %			
<i>R. vitis</i> 15	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	45
<i>R. vitis</i> 5	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	36
<i>R. vitis</i> 6	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>R. vitis</i> 8	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>R. vitis</i> 14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>R. radiobacter</i> C58	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>R. vitis</i> 9	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	18
<i>R. vitis</i> 1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
<i>R. vitis</i> 7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
<i>R. vitis</i> 11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
<i>R. vitis</i> 13	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9
Лизирующие штаммы, %	81	54	27	27	18	18	18	9	0	0	0	0	0	0	

Примечание: «+» — наличие лизиса, «-» — отсутствие лизиса.

очередь указывают на относительную неспецифичность данных бактериоцинов, хотя нельзя исключить расширение активности за счет их множественности.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что чувствительность к бактериоцинам у изученных культур *R. vitis* и *R. radiobacter* является штаммовым признаком. Высокая активность бактериоцинов и значительная чувствительность к ним свидетельствуют о жесткой конкуренции между штаммами *R. vitis* в биоценозе на уровне бактериоциногенности.

Для подтверждения этого предположения провели изучение бактериоциногенной активности веществ, выделившихся в результате спонтанной индукции клеток при их продолжительном росте. По сравнению с митомициновой индукцией, в этом случае было выявлено значительно меньшее количество зон лизиса на газонах тест-культур, однако ряд штаммов все же демонстрирует хорошо выраженную бактериоциногенную активность (табл. 2).

Установлено, что *R. vitis* 15 синтезирует вещества, убивающие клетки 5 исследованных штаммов, *R. vitis* 5 — 4 штаммов, а *R. vitis* C58, *R. vitis* 14, *R. vitis* 8 и *R. vitis* 6 — 3 штаммов.

Штаммы с широким спектром бактериоциногенной активности представляют большой практический интерес для дальнейшего выделения антагонистических веществ и использования их в биологической защите растений. По нашему мнению, бактериоцины, получаемые в результате спонтанной индукции, являются более предпочтительными для указанных целей из-за недорогой методики обработки культур, требующей меньших временных затрат.

Дальнейшее изучение межродового антагонизма с участием бактериоцинов позволило выявить некоторые особенности экологии возбудителей бактериального рака винограда. Часто *R. vitis* выделяются совместно с *P. agglomerans*, широко распространенными граммотрицательными представителями микробиоты растений, вследствие чего выделение чистой культуры возбудителей бактериального рака требует особой тщательности.

Пять штаммов этой эпифитной бактерии были выделены нами на винограднике в ассоциациях с культурами *R. vitis*. С данными штаммами были проведены исследования бактериоциногенности *P. agglomerans* по той же схеме, что и *R. vitis*. Результаты показали, что бактериоцины этой бактерии достаточно эффективно лизировали клетки целого ряда штаммов данного вида, а также многие штаммы канцерогенных ризобий (от 31 до 19%).

Кроме того, исследовали чувствительность культур *R. vitis* и выделенных из растений винограда культур *P. agglomerans* к отдельным фракциям веществ с бактериоциногенной активностью музейных штаммов *P. agglomerans*. Очищенные фракции вызывали лизис большего числа тестируемых культур (от 25 до 62,5%), чем неочищенные лизаты.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Кушкиной А.И. за оказание консультативной и технической помощи при выполнении работы.

Работа была выполнена в рамках проекта Министерства образования и науки Украины № НУ/448-2009 от 06.07.2009.



ЛИТЕРАТУРА

1. Негруль А. М. Виноградарство. — М.: Плодопромиздат, 1952. — 400 с.
2. Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. — 1999. — Vol. 37. — P. 53–80.
3. Goodner B.W., Markelz B.P., Flanagan C. et al. Combined genetic and physical map of the complex genome of *Agrobacterium tumefaciens* // J. Bacteriol. — 1999. — Vol. 181, № 17. — P. 5160–5166.
4. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. — 1995. — V. 61, № 8. — P. 2879–2884.
5. Kado C. J., Liu S.-T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids // J. Bacteriol. — 1981. — Vol. 145, № 3. — P. 1365–1373.
6. Liang Z.H., Wang H.M., Wang J.H. Preliminary study on effectiveness and the stability of E26 on controlling crown gall disease // J. China Agricult. Univ. — 2001. — Vol. 6. — P. 91–95.
7. Moore L.W., Warren G. *Agrobacterium radiobacter* strain R84 and biological control of crown gall // Annu. Rev. Phytopathol. — 1979. — Vol. 17. — P. 163–179.
8. Pionnat S., Keller H., Richer D. et al. Ti plasmids from *Agrobacterium* characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries // Appl. Environm. Microbiol. — 1999. — Vol. 65, № 9. — P. 4197–4206.
9. Tovkach F.I. Biological properties and classification of *Erwinia carotovora* bacteriocins // Microbiologiya. — 1998. — Vol. 67, № 6. — P. 636–642.
10. Wang H.M., Wang H.X., Ng T.B., Li J.Y. Purification and characterization of an antibacterial compound produced by *Agrobacterium vitis* strain E26 with activity against *A. tumefaciens* // Plant Pathol. — 2003. — Vol. 52. — P. 134–139.

Н.В. Ліманська¹, В.О. Іваниця¹, Ж.Ю. Сергеева¹, Ф.І. Товчач²

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: limmy@mail.ru

²Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України, вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

БАКТЕРІОЦИНОГЕННА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *RHIZOBIUM VITIS* І *PANTOEAЕ AGGLOMERANS*, ВИДІЛЕНИХ З РОСЛИН ВИНОГРАДУ

Реферат

Виділені штами *Rhizobium vitis* і *Pantoeae agglomerans* проявили бактеріоциногенну активність по відношенню до близькоспоріднених штамів. Показано, що досліджені культури розрізнялися за чутливістю до бактеріоцинів. У порівнянні з мітоміциновою індукцією, у випадку спонтанного виходу бактеріоцинів виявлялася значно менша кількість зон лізису на газонах тест-культур, однак низка штамів все ж виявляла добре виражену бактеріоциногенну активність.

К л ю ч о в і с л о в а: *Rhizobium vitis*, *Pantoeae agglomerans*, бактеріоцини.



N.V. Limanska¹, V.O. Ivanytsia¹, Zh.Yu. Sergeeva¹, F.I. Tovkach²

¹Odesa National Mechnykov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: limmy@mail.ru

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NASU, Academic Zabolotny str.,
154, Kyiv, Д03680, Ukraine

BACTERIOCIINOGENIC ACTIVITY OF *RHIZOBIUM VITIS* AND *PANTOEA*E AGGLOMERANS STRAINS ISOLATED FROM GRAPEVINES

Summary

Isolated *Rhizobium vitis* and *Pantoeae agglomerans* strains showed bacteriocinogenic activity against closely related strains. Investigated cultures had different susceptibility to bacteriocines. Comparing to mitomycin induction, spontaneous induction resulted in less quantity of lysis spots on test-culture lawns, but some strains still showed marked bacteriocinogenic activity.

K e y w o r d s: *Rhizobium vitis*, *Pantoeae agglomerans*, bacteriocines.

