

Ю.М. Богдан, Л.М. Буценко., Л.А. Пасічник, Р.І. Гвоздяк

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

ВІДСУТНІСТЬ МУТАГЕННОГО ЕФЕКТУ КУЛЬТУРАЛЬНИХ РІДИН *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* 9400 І *PANTOEA AGGLOMERANS* П324

*Вивчено мутагенну активність культуральних рідин фітопатогенного штаму *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 9400 і епіфітного штаму *Pantoea agglomerans* П324 у тесті Еймса та *Allium* сера-тесті. Як у про-, так і в еукаріотичній тест-системах не було виявлено здатності культуральних рідин цих бактерій впливати на спонтанний фон мутацій тест-штамів *Salmonella typhimurium* TA98 і TA100 або хромосомні аберації у клітинах апікальної меристеми корінців *Allium* сера.*

*Ключові слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*, *Pantoea agglomerans*, культуральна рідина, мутації, хромосомні аберації.*

Однією з найважливіших сільськогосподарських культур для України є пшениця. Саме тому дослідження біологічних властивостей збудників захворювань цієї зернової культури є необхідним для розуміння процесів взаємодії патогену з хазяїном, і, відповідно, розробки заходів боротьби з інфекційними агентами та одержання безпечної харчової і фуражної продукції. Необхідність вивчення властивостей фітопатогенних бактерій обумовлене також здатністю цих мікроорганізмів спричинювати захворювання у людей і тварин. Дане явище відоме як полібіотрофія [3].

Важливе місце серед збудників бактеріальних хвороб пшениці в Україні посідає *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Цей патоген уражує рослини у всіх фазах розвитку, знижує врожайність та погіршує якість зерна, зокрема він спричинює побуріння зерна, плямистість листя, колосся та стебла пшениці, ячменю і жита [6]. Окрім того, *P. syringae* pv. *atrofaciens* часто зустрічається і на поверхні здорових рослин. Таким чином, цей мікроорганізм є широко розповсюдженим і може завдавати значних збитків сільському господарству. Саме тому для наших досліджень ми обрали цього збудника захворювань зернових культур. Крім того, в дослідженнях використали *Pantoea agglomerans* П324, яка є супутнім мікроорганізмом збудників захворювань сільськогосподарських культур, в т. ч. і *P. syringae* pv. *atrofaciens*.

У процесі росту мікроорганізми виділяють різні біологічно активні сполуки, зокрема токсини, ферменти, інгібітори і стимулятори росту, фактори адгезії, антибіотики та інші. Усі ці сполуки разом з ураженими рослинами можуть потрапляти в організм людини. Відомо, що патогенні для людини і тварин мікроорганізми здатні продукувати метаболіти, які підвищують ймовірність утворення хромосомних аберацій та певних видів злоякісних пухлин [4, 10]. Серед фітопатогенних мікроорганізмів утворення генотоксичних речовин виявлено лише у грибів. Вони утворюють афлатоксини, які накопичуються у кукурудзі, арахісі та інших продуктах харчування, внаслідок чого ці сполуки потрапляють до організму людини [9]. Здатність утворювати мутагенні сполуки серед фітопатогенних бактерій майже не досліджувалася і була знайдена лише у рикетсієподібних бактерій у рослинній тест-системі [8]. Розпочаті дослідження мутагенних, антимутагенних і протипухлинних властивостей метаболітів фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* [1, 2]. Метою нашої роботи було вивчити мутагенну активність екзометаболітів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 та порівняти її з активністю екзометаболітів супутника патогену *Pantoea agglomerans* П324.

© Ю.М. Богдан, Л.М. Буценко., Л.А. Пасічник, Р.І. Гвоздяк, 2010

Матеріали і методи. У дослідженнях використовували *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 штамп 9400, виділений у 2006 році з листя пшениці ярої сорту Раня 93 у фазі кушіння у Київській області, та *Pantoea agglomerans* (Beijerinck 1888) Gavini, Mergaert, Beji, Mielcarek, Izard, Kersters & De Ley 1989 штамп П324, виділений у 1998 році з поверхні насіння пшениці ярої сорту Херсонська 86 (Херсонська область).

Бактерії вирощували на картопляному бульйоні (КБ) в колбах на качалці (240 об/хв) при температурі 28°C протягом 72 годин. Одержану культуральну рідину (КР) центрифугували при 5000 об/хв протягом 40 хв. Частина супернатанту використовували для вивчення токсичної та мутагенної активності щодо *Allium cepa*. Іншу частину супернатанту концентрували у 10 разів шляхом ліофільного висушування та наступного перерозчинення у необхідному об'ємі дистильованої води. Сконцентровану КР стерилізували фільтруванням крізь азбестові фільтри. Одержаний фільтрат сконцентрованої КР (ФСКР) використовували для вивчення токсичної та мутагенної активності екзометаболітів бактерій щодо тест-штамів *Salmonella typhimurium*.

Для визначення токсичного впливу ФСКР бактерій на тест-штами *S. typhimurium* у колбу з 20 мл м'ясо-пептонного бульйону вносили 0,1 мл ФСКР. У негативному контролі вносили 0,1 мл дистильованої води. У кожен пробірку додавали 1 мл суспензії однодобової культури *S. typhimurium* TA98 або *S. typhimurium* TA100 концентрацією $1 \cdot 10^9$ клітин/мл. Бактерії культивували протягом 24-х годин при температурі 37°C. Оптичну густину одержаної суспензії вимірювали при довжині хвилі 540 нм на мікроколориметрі МКМФ-1. Фітотоксичність КР бактерій щодо проростків насіння цибулі вивчали у концентраціях 100, 75, 67, 50, 25, 17 і 9 %, як описано у роботах J. Rank [11, 12]. Визначали ефективну концентрацію, при якій спостерігається зменшення довжини корінців на 50 %, порівняно з контролем (EC_{50}).

Мутагенну активність КР визначали у тесті Еймса [7] та у *A. cepa*-тесті [11, 12]. Для цього використали два штами *S. typhimurium*: *S. typhimurium* TA98 і TA100. Суспензії клітин цих тест-штамів, концентрацією $2 \cdot 10^8$ клітин/мл, вносили у кожен чашку по 0,25 мл і додавали 0,1 мл відповідного розчину досліджуваної речовини. У негативному контролі вносили дистильовану воду, а в позитивному контролі – біхромат калію у дозі 200 мкг на чашку. Після культивування при температурі 37°C протягом 48 год підраховували кількість колоній His^+ -ревертантів. Наявність статистично значимих відмінностей між кількістю колоній His^+ -ревертантів у досліді та контролі оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента ($p < 0,05$). Для проведення цитогенетичних досліджень було використано такі концентрації КР: EC_{50} , а також 50, 25 та 10 % від показника EC_{50} [11]. Насіння *A. cepa* послідовно пророщували протягом 48 годин у дистильованій воді та 24 годин у розчинах КР. Цитогенетичний аналіз проводили на тимчасових давлених препаратах апікальної меристеми корінців. Визначали кількість ана-телофаз з хромосомними аберациями (фрагментами та мостами) та без пошкоджень хромосом. Аналізували 10 корінців *A. cepa* та не менше 100 ана-телофаз у кожному варіанті досліді. Статистичний аналіз даних здійснювали за допомогою тесту ANOVA у програмі Statistica 5.0.

Результати та їх обговорення. Відомо, що бактерії виділяють у навколишнє середовище токсини, сигнальні молекули, глікополімери, різноманітні низькомолекулярні речовини. Дія усіх цих сполук на генетичний матеріал майже не вивчалася. Тому нами була вивчена здатність *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 та *P. agglomerans* П324 утворювати екзометаболіти з мутагенною активністю у про- та еукаріотичній тест-системах. Екзометаболіти бактерій у тесті Еймса досліджували у фільтраті сконцентрованої культуральної рідини (ФСКР), а в *A. cepa*-тесті – у культуральній рідині (КР).

ФСКР *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 та *P. agglomerans* П324 не впливав на ріст тест-штамів *S. typhimurium* (табл. 1). Натомість КР цих штамів пригнічувала ріст корінців цибулі (рис. 1). Вміст КР у розчині, який відповідав показнику EC_{50} , становив 25,0 % (рис. 1). Про токсичний вплив КР бактерій свідчать і результати аналізу мітотичного індексу (МІ) у клітинах апікальної меристеми корінців цибулі. Так, КР *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 та *P. agglomerans* П324 у концентрації 25,0 % зменшувала МІ у клітинах цибулі на 70,1 та 75,5 % відповідно (табл. 2). Також у концентрації 12,5 % КР *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 інгібувала МІ на 51,1 %. За умови пророщування насіння цибулі у розчинах КБ показник EC_{50} становив

25,0 %, як і у випадку внесення КР, а у концентраціях 25,0; 12,5 і 6,3 % КБ зменшував МІ у клітинах цибулі на 61,5; 51,2 і 24,2 % відповідно.

Таблиця 1

Вплив фільтратів сконцентрованих культуральних рідин *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 та *P. agglomerans* П324 на ріст та спонтанний фон мутацій тест-штамів *S. typhimurium*

Досліджувана речовина	Оптична густина суспензії клітин <i>S. typhimurium</i> , % від контролю		Кількість колоній His ⁺ -ревертантів <i>S. typhimurium</i> на чашку	
	ТА98	ТА100	ТА98	ТА100
ФСКР <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	108,4 ± 3,6	93,8 ± 2,6	31 ± 3	258 ± 33
ФСКР <i>P. agglomerans</i> П324	98,4 ± 2,6	103,8 ± 3,0	29 ± 5	312 ± 10
Спонтанний фон мутацій			26 ± 4	245 ± 21
Позитивний контроль (біхромат калію)			1792 ± 113	2291 ± 135

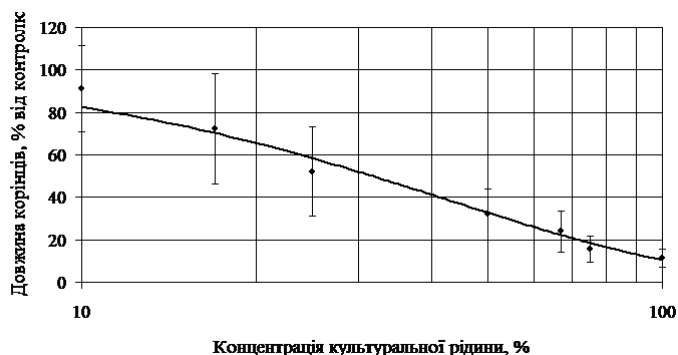


Рис. 1. Вплив культуральної рідини *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 на ріст корінців *A. cepa* сорту Халцедон

Таблиця 2

Вплив культуральних рідин фітопатогенних та сапрофітних бактерій на мітотичну активність клітин апікальної меристеми корінців *A. cepa*

Досліджувана речовина	Концентрація, %	МІ, ‰	Інгібування МІ, %
КР <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	25,0	24,1 ± 8,3	70,1
	12,5	39,5 ± 8,7	51,1
	6,3	82,8 ± 5,1	-
	2,5	77,7 ± 15,6	-
КР <i>P. agglomerans</i> П324	25,0	19,8 ± 4,9	75,5
	12,5	74,2 ± 13,6	-
	6,3	74,8 ± 18,1	-
	2,5	79,7 ± 10,5	-
Середовище КБ	25,0	31,1 ± 6,5	61,5
	12,5	39,4 ± 7,9	51,2
	6,3	61,3 ± 17,3	24,2
	2,5	76,3 ± 14,2	-
контроль (дистильована вода)		80,8 ± 13,9	

Примітка: “-” – інгібуючий ефект відсутній, МІ – мітотичний індекс.

За умови використання позитивного мутагену (біхромата калію) спостерігали статистично значиме зростання кількості реверсій у тест-штамів *S. typhimurium*, що свідчить про чутливість цих штамів до дії мутагенів. На середовищі з ФСКР штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 та *P. agglomerans* П324, одержаних на картопляному бульйоні, кількість His⁺-ревертан-

тів *S. typhimurium* TA100 становила 258 ± 33 та 312 ± 10 колоній на чашку відповідно (табл. 1). Одержані результати у досліді не мали статистично значимих відмінностей від СФМ даного тест-штаму (245 ± 21 колоній на чашку). За умови впливу ФСКР цих двох штамів бактерій на *S. typhimurium* TA98 кількість колоній His⁺-ревертантів становила 31 ± 3 та 29 ± 5 відповідно, що також не мало статистично значимих відмінностей від контролю (26 ± 4 колоній на чашку). Отже, ФСКР як фітопатогенного штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, так і епіфітного штаму *P. agglomerans* П324 не спричинювали мутагенного впливу на тест-штами *S. typhimurium* TA98 і TA100.

Оскільки *P. syringae* pv. *atrofaciens* є фітопатогеном, доцільно було вивчити вплив екзоментоболітів цих бактерій на рослинний тест-організм. Кількість клітин з абераціями визначали у апікальній меристемі корінців після 24 годин пророщування у розчинах КР, концентраціями 25,0 % (EC₅₀); 12,5 % (50 % EC₅₀); 6,3 % (25 % EC₅₀) і 2,5 % (10 % EC₅₀), які були встановлені у досліді з визначення фітотоксичності КР щодо проростків насіння *A. cepa*. Сумарна кількість ана-телофаз у апікальній меристемі корінців цибулі, пророщених у розчинах КР концентрацією 25,0 % та розчинах КБ концентраціями 25,0 і 12,5 % була менше 100, тому ці варіанти досліді в аналізі не враховували.

Хромосомну нестабільність характеризували двома показниками: частотою аберантних клітин (ЧАК) і середньою кількістю аберацій на аберантну клітину (КАБАК) [5]. ЧАК є часткою клітин з абераціями від 100 проаналізованих і вираженою у відсотках. Цей показник відображає пошкодженість популяції клітин, а КАБАК є кількісною мірою пошкодженості аберантної клітини. Обидва ці показники характеризують різні аспекти пошкодженості геному. Так, якщо одні мутагени збільшують частоту аберацій у вже пошкоджених клітинах, то інші – індукують нові мутації у непошкоджених клітинах [5].

За умови пророщування корінців цибулі у розчинах КР спостерігали підвищення показника ЧАК з такими типами хромосомних аберацій, як фрагменти і мости, у 1,2–1,7 разів (табл. 3). Проте таке підвищення ЧАК не мало статистично значимих відмінностей від контрольного показника. Досліджувані речовини не впливали і на кількість клітин із втраченими хромосомами. Як у випадку пророщування корінців цибулі у розчинах КР фітопатогенного штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400, так і у розчинах КР епіфітного штаму *P. agglomerans* П324 не спостерігали статистично значимих відмінностей від контролю. Також в усіх концентраціях КР використаних у роботі штамів бактерій та КБ не спричинювали статистично значиме підвищення показника КАБАК.

Таблиця 3

Вплив КР *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 та *P. agglomerans* П324 на кількість аберантних клітин апікальної меристеми корінців *A. cepa*

Досліджувана речовина	Концентрація, %	Всього клітин у анателофазі	Кількість клітин з мостами і фрагментами, %		Кількість клітин з втраченими хромосомами, %	
			ЧАК	КАБАК	ЧАК	КАБАК
КР <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400	25,0	47	$3,8 \pm 0,8$	-	0,0	-
	12,5	183	$3,7 \pm 1,5$	$1,3 \pm 0,8$	$0,3 \pm 0,1$	0,0
	6,3	265	$2,7 \pm 1,1$	$1,1 \pm 0,1$	$1,4 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,1$
	2,5	300	$3,8 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,6$	0,0	$1,0 \pm 0,1$
КР <i>P. agglomerans</i> П324	25,0	22	-	-	-	-
	12,5	135	$3,3 \pm 1,8$	$1,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
	6,3	272	$3,8 \pm 1,4$	$1,1 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$
	2,5	432	$3,7 \pm 1,2$	$1,3 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,1$
Середовище КБ	25,0	16	-	-	-	-
	12,5	31	-	-	-	-
	6,3	163	$2,5 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,1$	0,0	0,0
	2,5	280	$3,7 \pm 2,7$	$1,3 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
контроль (дистильована вода)		234	$2,3 \pm 1,3$	$1,3 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,6$

Примітка: “-” – не досліджували, ЧАК – частота аберантних клітин, КАБАК – середня кількість аберацій на аберантну клітину.

Таким чином, при вивченні мутагенної активності КР фітопатогенного штаму *P. syringae* pv. *atropaciens* 9400 та епіфітного штаму *P. agglomerans* П324 як у тесті Еймса, так і в *A. cepa*-тесті не було виявлено здатності цих бактерій продукувати на картопляному бульйоні сполуки з мутагенною активністю. Проте одержані результати не дають підстави стверджувати про повну відсутність мутагенної активності у екзопродуктів досліджених нами штамів бактерій. Для відповіді на це питання необхідно провести подальші дослідження із залученням інших тест-систем.

Ю.Н. Богдан, Л.Н. Буценко, Л.А. Пасичник, Р.И. Гвоздяк

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

**ОТСУТСТВИЕ МУТАГЕННОГО ЭФФЕКТА КУЛЬТУРАЛЬНЫХ
ЖИДКОСТЕЙ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS* 9400
И *PANTOEA AGGLOMERANS* П324**

Резюме

Изучено мутагенную активность культуральных жидкостей фитопатогенного штамма *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 9400 и эпифитного штамма *Pantoea agglomerans* П324 в тесте Эймса и *A. cepa*-тесте. Как в про-, так и в эукариотической тест-системах не было обнаружено способности культуральных жидкостей этих бактерий влиять на спонтанный фон мутаций тест-штаммов *Salmonella typhimurium* TA98 и TA100 или хромосомные aberrации в клетках апикальной меристемы корешков *Allium cepa*.

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, *Pantoea agglomerans*, культуральная жидкость, мутации, хромосомные aberrации.

Y.M. Bogdan, L.M. Butsenko, L.A. Pasichnyk, R.I. Gvozdyak

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

**ABSENCE OF MUTAGENIC EFFECT OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV.
ATROFACIENS 9400 AND *PANTOEA AGGLOMERANS*
P324 CULTURE LIQUIDS**

S u m m a r y

The mutagenic activity of the culture liquids of phytopathogenic strain *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* 9400 and epiphytic strain *Pantoea agglomerans* P324 was studied in the Ames test and *Allium cepa*-test. In pro- and eucariotic test-systems no effect of the culture liquids of these bacteria on spontaneous mutations of *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 or chromosome aberrations in the cells of *Allium cepa* root apical meristem was found.

The paper is presented in Ukrainian.

К е у w o r d s: *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens*, *Pantoea agglomerans*, culture liquid, mutations, chromosome aberrations.

The a u t h o r ' s a d d r e s s: Bogdan Y.M., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Буценко Л.М. Геномодулювальна активність культуральної рідини та ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 // Науковий вісник Ужгородського національного університету: Серія Біологія. – 2008. – Вип. 22. – С. 80-83.
2. Ващенко Л.М., Гвоздяк Р.І., Пасичник Л.А., Мороз С.М. Вплив екзометаболітів фітопатогенних бактерій на частоту мутацій *Salmonella typhimurium* // X з'їзд товариства мікробіологів України: тези доповідей, 15-17 вересня 2004. - Одеса: Астропринт, 2004 - С. 327.
3. Гвоздяк Р.И. Полибиотрофия бактерий // Микробиол. журн. – 1981. –43, № 2. – С. 256-261.
4. Ильинских Н.Н., Бочаров Е.Ф., Ильинских И.Н. Инфекционный мутагенез. – Новосибирск: Наука, 1984. – 168 с.
5. Куцоконь Н.К., Безруков В.Ф., Лазаренко Л.М. та ін. Кількість aberrацій на aberrантну клітину як параметр хромосомної нестабільності. 1. Характеристика дозових залежностей // Цитологія і генетика. – 2003. – 37, № 4. – С. 20-25.

6. *Билай В.И., Гвоздяк Р.И., Скрипаль И.Г.* и др. Микроорганизмы – возбудители болезней растений: Справочник. – Киев: Наук. думка, 1988. – 552 с.
7. *Фонштейн Л.М., Калинина Л.М., Полухина Г.Н.* и др. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на *Salmonella* (Методические указания). – Москва, 1977. – С. 1-52.
8. *Шевченко С.И., Садовский Ю.П., Панченко Л.П.* Токсическое и мутагенное действие продуктов жизнедеятельности риккетсиеподобных бактерий // Цитология и генетика. – 1988. – Т. 22, № 4. – С.17-22.
9. *Aflatoxins* // IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. – 2002. – **82**. – P. 171–300.
10. *Mager D.L.* Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure: A review // J. Translational Medicine. – 2006. – **4**. – P. 14.
11. *Rank J., Nielsen M.H.* A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures // Hereditas. – 1993. – **118**, N 1. – P. 49–53.
12. *Rank J.* The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay // Ekologija (Vilnius). – 2003. – N 1. – P. 38–42.

Отримано 18.06.2009