

УДК 577.114:575.224

## ГЕНОМОДУЛЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ КУЛЬТУРАЛЬНОЇ РІДИНИ ТА ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* УКМ В-1027

Л.М. Буценко

**Геномодулювальна активність культуральної рідини та ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027.** – Л.М. Буценко. – Встановлено, що культуральна рідина та ліпополісахарид (ЛПС) *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 не збільшують кількість спонтанних мутацій у тест-штамів *S. typhimurium*. ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 у дозі 1000 мкг на чашку зменшує кількість індукованих *N*-метил-*N'*-нітро-*N*-нітрозогуанідіном мутацій у *S. typhimurium* ТА100 на 19%, а в дозі 100,0 мкг на чашку – на 12%. Тобто, ЛПС цього штаму притаманні антимутагенні властивості.

**Ключові слова:** *P. syringae* pv. *syringae*, культуральна рідина, ліпополісахарид, антимутагенна дія.

**Адреса:** Інститут мікробіології і вірусології НАН України, Д03680 м. Київ, МСП, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: plant\_path@ukr.net

**Genomodulation activity of culture liquid and lipopolysaccharide *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UKM B-1027.** – L.M. Butsenko. – It has been established that culture liquid and lipopolysaccharide of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UKM B-1027 do not increase the quantity of spontaneous mutations of *S. typhimurium*. LPS of *P. syringae* pv. *syringae* UKM B-1027 in concentration 1000,0 µg per plate reduced induced by *N*-nitro-*N'*-nitrozo-guanidine mutations of *S. typhimurium* TA100 on 19% and in concentration 100,0 µg per plate – on 12%. LPS of *P. syringae* pv. *syringae* UKM B-1027 is has antimutagenic properties.

**Key words:** *P. syringae* pv. *syringae*, culture liquid, lipopolysaccharide, antimutagenic activity

**Address:** Institute of Microbiology and Virology National Academy of Sciences of Ukraine, D 03680, Kiev, Zabolotnogo str., 154, e-mail: plant\_path@ukr.net

### Вступ

Здатність спричинювати збільшення кількості мутацій притаманна багатьом біологічним агентам. Перш за все це віруси, мутагенна дія яких в більшості випадків пов'язана з їхньою здатністю вбудовуватися у геном організму хазяїна. Значною мутагенною активністю характеризуються токсини мікроміцетів. Збільшення кількості аберацій у лімфоцитах периферійної крові спостерігається у разі перебігу в макроорганізмі інфекційного процесу спричиненого вірусами, бактеріями, мікроміцетами та іншими збудниками [11]. Мутагенну дію відмічено також у бактеріальних токсинів. Так, токсифлавін, що утворюється бактеріями *Pseudomonas farinofermentans*, характеризується мутагенною дією як в рослинній, так і в тваринній тест-системах [19]. Окрім безпосереднього ризику збільшення мутацій, спричиненого бактеріями та їхніми метаболітами, відмічена здатність бактерій активувати промутагени [12].

Разом з цим, деякі види бактерій та їхні метаболіти (перш за все молочнокислі бактерії) характеризуються здатністю зменшувати кількість мутацій, індукованих хімічними або фізичними мутагенами [5, 15, 16].

Раніше нами було показано, що екзометаболіти деяких видів фітопатогенних бактерій, які утворюються у разі їхнього культивування на картопляному бульйоні, не мають мутагенної активності в тесті Еймса [3], а ліпополісахариди окремих штамів виду *Pseudomonas syringae* виявляють антимутагенну активність [4, 8].

Метою даної роботи було вивчення геномодулювальної активності культуральної рідини та ендотоксину виду *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, що є широко розповсюдженим патогеном рослин.

### Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був штам *P. syringae* pv. *syringae* (Van Hall 1902) УКМ В-1027 (NCPPV 281, ATCC 19310), який є типовим штамом виду *P. syringae*.

Бактерії культивували на наступних середовищах: картопляному бульйоні, середовищі Омелянського [2] та середовищі Вулей [18], на якому спостерігається утворення токсинів. Бактерії інкубували 6 діб при 28<sup>0</sup>С на качалках 240 об/хв. Клітини видаляли осадженням за 5000

об/хв 15 хв та потім фільтруванням крізь азбестові фільтри.

Ліпополісахарид (ЛПС) *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 одержували із сирової маси клітин бактерій, вирощеної на картопляному агарі, екстракцією 0,85%-м розчином хлориду натрію [10]. Генотипологічні властивості досліджували у тесті Еймса [1]. Як тест-культури використали ауксотрофні за гістидином штами *Salmonella typhimurium* TA100 і *S. typhimurium* TA98.

У разі вивчення мутагенної активності культуральну рідину в кількості 0,2 мл, розчин ЛПС або N-метил-N'-нітро-N-нітрозоганідину (МННГ) в кількості 0,1 мл вносили до розплавленого напіврідкого агару (3 мл) одночасно з 0,25 мл суспензії клітин *S. typhimurium* титром  $10^9$  кл/мл. Напіврідкий агар виливали в чашки Петрі з мінімальним агаром без гістидину. Після 48 год. культивування підраховували кількість колоній His<sup>+</sup> ревертантів. Мутагенна активність досліджуваної речовини вважається встановленою, якщо спостерігається перевищення кількості колоній ревертантів в досліді над спонтанним фоном мутацій для штаму *S. typhimurium* TA98 у 2,0 рази, для штаму *S. typhimurium* TA100 – у 1,8 рази [9].

У разі дослідження антимуутагенної дії ЛПС в пробірці з 3 мл розплавленого напіврідкого агару вносили 0,1 мл розчину МННГ у стерильній дистильованій воді, 0,1 мл розчину ЛПС (відповідної концентрації) та 0,25 мл суспензії клітин *S. typhimurium*, після чого вміст виливали в чашки Петрі на шар мінімального агару. Підраховували кількість колоній ревертантів. Досліди супроводжували позитивним контролем та визначенням спонтанного фону мутацій тест-штаму. Антимуутагенний ефект визначали за відсотком зменшення числа His<sup>+</sup>-ревертантів, індукованих модельним мутагеном за присутності досліджуваної речовини порівняно з кількістю ревертантів, які утворилися за наявності лише мутагену. Для статистичного оброблення експериментальних даних використовували t-критерій Стьюдента

### Результати та їх обговорення

Дослідження фітопатогенних бактерій важливе не лише для розроблення методів захисту рослин, але й з погляду вивчення їхнього впливу на здоров'я людини, оскільки ці бактерії широко поширені в природі і можуть потрапляти в їжу людей. Відомо, що штами умовно-патогенних мікроорганізмів здатні викликати ураження рослин, комах, тварин та людей [13]. Наприклад, умовнопатогенні для ссавців бактерії *Pseudomonas aeruginosa* спричиняють внутрішню бурю гниль цибулі при зберіганні [7]. Штами *P. aeruginosa*, виділені від хворих людей, в експериментальних умовах уражують рослини, нематоди і комахи [14].

Фітопатогенні бактерії також здатні уражувати як рослини, так і тварин. Бактерії роду *Erwinia*, які добре відомі виключно як патогенні для рослин, досить часто виділяють при патологічних процесах у людей та тварин [17]. Збудник судинного бактеріозу огірків *Erwinia toxica*, за введення внутрішньочеревно мишам, призводить до сепсису у тварин. Уражені цими бактеріями плоди огірків викликають отруєння людей [6]. Зважаючи на це вивчення впливу фітопатогенних бактерій на геноми інших організмів є сьогодні надзвичайно актуальним.

Для дослідження мутагенної/антимутагенної активності нами було обрано типовий штам виду *P. syringae* оскільки ці бактерії є надзвичайно розповсюдженими і зустрічаються як на уражених бактеріозами рослинах різних видів, так і на здорових рослинах (епіфітне існування).

Встановлено, що у разі внесення культуральної рідини *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, отриманої за культивування цих бактерій на середовищі Омелянського, картопляному бульйоні, середовищі Вулей, кількість His<sup>+</sup> ревертантів *S. typhimurium* TA98 була дещо нижчою ніж за внесення відповідного поживного середовища (табл. 1). Але достовірної різниці між дослідними варіантами та спонтанним фоном мутацій встановлено не було. Таким чином, у разі культивування бактерій *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 в лабораторних умовах не спостерігали утворення речовин з мутагенною дією.

Раніше [3] нами було показано, що інші фітопатогенні бактерії *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* 8281, *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9030 та *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 8982 також не утворюють екзометаболітів із вираженою мутагенною активністю в даній тест-системі. Наступним етапом нашої роботи було вивчення генотипологічної активності ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, оскільки саме ця сполука грамнегативних бактерій є токсичною для ссавців.

Нами встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 не є токсичними стосовно тест-штамів *S. typhimurium*, що дозволило використати їх для визначення генотипологічних властивостей препаратів.

ЛПС досліджували в дозах від 0,1 мкг до 1000,0 мкг на чашку. У разі внесення ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 в таких дозах не спостерігали достовірного збільшення або зменшення кількості His<sup>+</sup> ревертантів як штаму *S. typhimurium* TA98, так і *S. typhimurium* TA100 (табл. 2).

Таким чином, ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 як і ЛПС раніше досліджених штамів фітопатогенних бактерій [4, 8] не спричинює мутагенного впливу на *S. typhimurium*.

Таблиця 1. Генотипологічна активність культуральної рідини *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027

Досліджувана речовина	Кількість ревертантів <i>S. typhimurium</i> ТА98 на чашку, (X)	Перевищення спонтанного фону мутацій, (X/X сфм)
Середовище Омелянського	16,7 ± 1,1	1,00
КР на середовищі Омелянського	13,3 ± 1,4	0,81
Картопляний бульйон	14,7 ± 2,8	0,90
КР на КБ	13,3 ± 1,4	0,81
СФМ	16,3 ± 0,53	1,00
Середовище Вулей	25,0 ± 6,8	0,88
КР на середовищі Вулей	24,0 ± 3,4	0,84
СФМ	28,3 ± 1,5	1,00

Примітки: СФМ – спонтанний фон мутацій, КР – культуральна рідина.

Таблиця 2. Вплив ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на кількість спонтанних мутацій *S. typhimurium*

ЛПС, мкг/чашка	<i>S. typhimurium</i> ТА98		<i>S. typhimurium</i> ТА100	
	Кількість ревертантів на чашку, (X)	Перевищення спонтанного фону мутацій, (X/X сфм)	Кількість ревертантів на чашку, (X)	Перевищення спонтанного фону мутацій, (X/X сфм)
1000,0	27,0 ± 1,9	0,97	168,0 ± 25,0	0,95
100,0	32,0 ± 4,5	1,15	158,0 ± 5,0	0,90
10,0	30,5 ± 2,1	1,09	195,0 ± 30,0	1,10
1,0	27,7 ± 3,9	0,99	179,0 ± 35,0	1,01
0,1	26,5 ± 5,1	0,95	195,0 ± 27,0	1,10
Спонтанний фон мутацій	27,8 ± 3,1	1,00	177,0 ± 16,0	1,00

Для вивчення антимуутагенної дії ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 в якості модельного мутагену ми використали N-метил-N'-нітро-N-нітросоуганідін (МННГ), речовину, що використовується як алкілюючий агент та є класичним мутагеном. З літератури відомо, що ця речовина досить часто використовується в тесті Еймса для індукції мутацій у тест-штаму *S. typhimurium* ТА100.

В усіх досліджених нами дозах МННГ виявив мутагенну активність (табл. 3). За внесення МННГ в дозі 100,0 – 10,0 мкг/чашка спостерігалася поява великої кількості His<sup>+</sup> ревертантів *S. typhimurium* ТА100 (перевищення

спонтанного фону мутацій у 49,4 – 63,4 рази). Однак, така доза МННГ є надзвичайно токсичною і значна кількість бактеріальних клітин гине. Саме цим можна пояснити зменшення кількості His<sup>+</sup> ревертантів *S. typhimurium* ТА100 у разі використання МННГ в дозі 100,0 мкг порівняно з у десять разів меншою дозою цієї речовини.

Для проведення досліджень з вивчення антимуутагенної активності оптимальною дозою МННГ є 2,0 мкг/чашка. За такої дози МННГ кількість His<sup>+</sup> ревертантів *S. typhimurium* ТА100 у 22,8 рази перевищує спонтанний фон мутацій цього тест-штаму і більшість (71,4%) клітин бактерій залишаються живими.

Таблиця 3. Вплив N-метил-N'-нітро-N-нітросоуганідіну на кількість мутацій у *S. typhimurium* ТА100

Доза МННГ, мкг/чашка	Кількість ревертантів на чашку, (X)	Перевищення спонтанного фону мутацій, (X/Хсфм)	Вживання тест-штаму, %
100,0	3653,3 ± 365,8	49,4	7,1
10,0	4693,3 ± 685,4	63,4	57,0
2,0	1692,7 ± 240,0	22,8	71,4
1,0	540,0 ± 59,8	7,3	71,4
0,1	125,3 ± 1,3	1,7	78,5
Спонтанний фон мутацій	73,7 ± 15,6	1,0	–

ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 зменшує кількість індукованих МННГ мутацій у *S. typhimurium* ТА100 в усіх досліджених дозах. В дозі 1000,0 мкг він пригнічує індукований мутагенез на 19%, в дозі 100,0 мкг – на 12%, 10,0 мкг – 26%, 1,0 мкг – 15%, 0,1 мкг – 17% (табл. 4). Тобто, ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027

притаманні антимуутагенні властивості щодо індукованого N-метил-N'-нітро-N-нітросоуганідіном мутагенезу в тесті Еймса.

Необхідно зауважити, що ми не спостерігали прямої залежності між концентрацією ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та ступенем пригнічення індукованого МННГ мутагенезу у *S.*

*typhimurium* TA 100. На нашу думку це може бути пов'язано із особливостями механізму антимутагенної дії ЛПС, впливом досліджуваного ЛПС не лише на кількість мутацій у тест-штаму, а й на виживання бактеріальних клітин в умовах досліджу. Такі припущення потребують проведення подальших досліджень. Цікаво, що і

антимутагенна активність ЛПС *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* 8281 та *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* 9030 стосовно індукваного біхроматом калію мутагенезу в тесті Еймса майже не залежала від концентрації ЛПС [4, 8].

Таблиця 4. Антимутагенна дія ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 щодо індукваного N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном мутагенезу

ЛПС, мкг/чашку	N-нітро-N-нітрозо-гуанідін, мкг/чашку	<i>S. typhimurium</i> TA100	
		Кількість ревертантів на чашку	Пригнічення мутагенезу, %
1000,0	2	1504 ± 31	19
100,0	2	1634 ± 93	12
10,0	2	1366 ± 12	26
1,0	2	1570 ± 46	15
0,1	2	1536 ± 106	17
–	2	1856 ± 150	–
–	–	135 ± 10	–

**Висновок.** Таким чином, культуральна рідина та ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 не є мутагенами. ЛПС *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 притаманні антимутагенні властивості. Він у

дозі 1000,0 мкг на чашку зменшує частоту індукованих N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідіном мутацій *S. typhimurium* TA100 на 19%, а в дозі 100,0 мкг на чашку – на 12%.

1. Барилія І.Р., Дуган О.М., Неумержицька Л.В., Тимченко О.І., Кривошеїн Ю.С., Порошенко Г.Г., Логадир Т.А. Методичні рекомендації з оцінки мутагенних властивостей нових лікарських засобів. – К.: Фарм. ком. МОЗ України, 1996. – 32 с.
2. Бельтюкова К.И., Матышевская М.С., Куликовская М.Д., Сидоренко С.С. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений. – К.: Наук. думка, 1968. – 316 с.
3. Ващенко Л.М., Гвоздяк Р. І., Пасічник Л.А., Мороз С.М. Вплив на частоту мутацій *S. typhimurium* екзосметаболітів фітопатогенних бактерій // Вісник ОНУ. Серія: Біологія. – 2005. – Т. 10, Вип. 3. – С. 324 – 330.
4. Ващенко Л.М., Пасічник Л.А., Гвоздяк Р.І. Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на спонтанні та індуквані біхроматом калію мутації у *Salmonella typhimurium* // Біополімери і клітина. – 2004. – Т.20, №4. – С. 295 – 299.
5. Воробьева Л.И., Абишев С.К. Антимутагенные свойства бактерий (Обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. – 2002. – Т. 38, № 2. – С. 115 – 127.
6. Гвоздяк Р.И., Коробко А.П., Лемещенко Г.П. Зоопатогенные свойства возбудителя сосудистого бактериоза огурцов *E. toxica* // В кн.: Фитопатогенные бактерии. К.: Наук. думка, 1975. – С. 88 - 91.
7. Гвоздяк Р.И., Яковлева Л.М. Об особенностях патогенности *Pseudomonas aeruginosa* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 1987. – № 3. – С. 3 – 6.
8. Гвоздяк Р.И., Ващенко Л.М., Пасічник Л.А. Генотипова активність ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* 9030 // Доповіді НАНУ. – 2003. – № 4. – С. 159 – 162.
9. Дуган А.М., Журков В.С., Абишев С.К. Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса // Цитология и генетика. – 1990. – Т. 24, № 6. – С. 41 – 45.
10. Здоровенко Г.М., Яковлева Л.М., Гвоздяк Р.И., Захарова И.Я., Кошечкина Л.П. Выделение, химический состав и

- серологическая характеристика полисахарида *Pseudomonas wieringae* // Микробиол. журн. – 1982. – Т. 44, № 4. – С. 65 – 70.
11. Ильинских Н.Н., Бочаров Е.Ф., Ильинских И.Н. Инфекционный мутагенез. – Новосибирск: Наука, 1984. – 168 с.
12. Adris P., Chung K.-T. Metabolic activation of bladder procarcinogens, 2-aminofluorene, 4-aminobiphenyl, and benzidine by *Pseudomonas aeruginosa* and other human endogenous bacteria // Toxicol. in vitro. – 2006. – Vol 20. – P. 367-374.
13. Cao H., Baldini R.L., Rahme L.G. Common mechanisms for pathogens of plants and animals // Annu. Rev. Phytopathol. – 2001. – Vol. 39. – P. 259 – 284.
14. Mahajan-Miklos S., Rahme L.G., Ausubel F.M. Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts // Mol. Microbiol. – 2000. – Vol.37, № 5. – P. 981 – 988.
15. Rhee C., Park H. Three glycoproteins with antimutagenic activity identified in *Lactobacillus plantarum* KLAB21 // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67, № 8. – P. 3445 – 3449.
16. Sreekumar O., Hosono A. The antimutagenic properties of a polysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* and its cultured milk against some heterocyclic amines // Can. J. Microbiol. – 1998. – Vol. 44, № 11. – P. 1029 – 1036.
17. Starr M.P., Chatterjee A.K. The genus *Erwinia*: enterobacteria pathogenic to plant and animals // Ann. Rev. Microbiol. – 1972. – Vol. 26. – P. 389 – 426.
18. Woolley D.W., Pringle R.B., Braun A.C. Isolation of the phytopathogenic toxin of *P. tabaci*, an antagonist of methionine // J. Biol. Chem. – 1952. – Vol. 197. – P. 409 – 417.
19. Yue Q.A. Study on mutagenicity of toxoflavin from *Pseudomonas farinofementans* // Zhonghua. Yu. Fang. Yi.Xue. Za.Zhi. – 1989. – Vol. 23, № 2. – P. 77-79.

Отримано: 01 вересня 2007 р.  
Прийнято до друку: 28 грудня 2007 р.