

УДК 632.35:661.163

ГЕНОМОДУЛЮВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *SYRINGAE* І *P. SYRINGAE* PV. *ATROFACIENS*

Л. М. БУЦЕНКО, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
E-mail: plant_path@ukr.net

<https://doi.org/10.31548/bio2019.03.003>

Деякі види бактерій можуть слугувати біологічним фактором мутагенезу та активувати промутагени, що робить актуальними дослідження геномодулювальної здатності фітопатогенних бактерій, які є широко розповсюдженими в агрофітоценозах. Визначення геномодулювальної активності і здатності активувати відомий промутаген 3,3'-діамінобензидін фітопатогенними бактеріями *P. syringae* pv. *syringae* та *P. syringae* pv. *atrofaciens* було здійснено в тесті Еймса. Встановлено, що фітопатогенні бактерії *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atrofaciens* не утворюють метаболітів із мутагенною дією за культивування в лабораторних умовах та не спричинюють активацію промутагену 3,3'-діамінобензидіну.

Ключові слова: фітопатогенні бактерії, промутагени, геномодулювальна активність

Актуальність. Стабільність генетичного матеріалу є запорукою стабільного існування видів. Мінливість геному є джерелом появи нових ознак, які можуть забезпечити конкурентну перевагу організму, або стати причиною хвороб та загибелі організму (Lukash, 2013). Е сучасному світі кількість мутагенних факторів постійно зростає. Це призводить до занадто швидкого накопичення мутацій. Мутагенна дія абіотичних і біотичних факторів на рослинний геном у випадку сільськогосподарських культур призводить до зниження їх урожайності (Manova, Gruszka, 2015).

Відомо, що мутагенну активність мають деякі фітопатогенні мікроорганізми. Зокрема, при вивченні токсичного впливу *Fusarium oxysporum* на рослині вовчка (*Orobanchе* spp.), яка є паразитом кореневої системи багатьох рослин, методом RAPD-ПЛР було вста-

новлено наявність генотоксичних ефектів (Ayubeke, 2017). Показано також суттєве збільшення кількості Mn-супероксиддисмутази, Zn-супероксиддисмутази, глутамінсинтетази. Отримані дані свідчать, що *F. oxysporum* індукує окислювальний стрес у рослині вовчка; спричинює значні пошкодження ДНК рослини; порушує білковий обмін та спричинює апоптоз (Ayubeke, 2017). Відомі дані щодо здатності патогенних для рослин бактерій, грибів та ооміцетів спричинювати дволанцюгові розриви ДНК (double-strand breaks (DSBs) рослини-хазяїна. Пошкодження ДНК, які реєстрували методом виявлення кількості фосфорильованих гістонів -H2AX та методом комет, виникали за декілька годин до утворення некрозу індукованого *P. syringae* pv. *tomato*. Авірулентний варіант *P. syringae* pv. *tomato* за аналогічних умов не спричинював пошкоджень ДНК. Також не індукували

пошкоджень ДНК непатогенні *E. coli* і *Pseudomonas fluorescens* (Song, Bent, 2014). При вивченні впливу фітопатогенних штамів *Agrobacterium* на частоту різних соматичних мутацій у *Arabidopsis thaliana* не було виявлено мутагенного ефекту досліджених вірулентних і авірулентних штамів бактерій.

Вивчення геномодулювальної активності фітопатогенних бактерій є важливим як з огляду на можливість їхнього впливу на рослини та на збереження властивостей сортів рослин, так і враховуючи, що ці бактерії разом із рослинною їжею потрапляють до людини і можуть впливати на її здоров'я.

Окрім безпосереднього ризику збільшення мутацій спричиненого бактеріями та їхніми метаболітами, в літературі відмічена здатність бактерій активувати промутагени (Adris, Chung, 2006, Adris, Lopez-Estraño, Chung, 2007). Так, вільні від клітин екстракти умовно-патогенних бактерій *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Eubacterium aerofaciens* спричинюють активацію промутагенів (бензидин) (Adris, Chung, 2006, Adris, Lopez-Estraño, Chung, 2007). У *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium aerofaciens* виявлено цитохром P450 ізофермент, який присутній і у ссавців. У решти бактерій ці властивості пов'язані з іншими оксидативними ферментами (Pawlik, Piotrowska-Seget, 2015).

Визначення здатності активувати промутагени особливо важливо для фітопатогенних *Pseudomonas syringae*, що постійно перебувають у філосфері рослин і контактують там з пестицидами, які, як відомо, часто характеризуються мутагенною/промутагенною дією.

Метою дослідження було визначення геномодулювальної дії та здатності активувати промутагени широко поши-

рених в агрофітоценозах зернових культур бактерій *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atofaciens*.

Матеріали та методи досліджень. Для вивчення здатності утворювати сполуки із мутагенною активністю нами вивчено культуральну рідину штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 УКМ В-1027 та трьох штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978: УКМ В-1011, 9400, 9417. Штами зберігаються у колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Фітопатогенні бактерії культивували на середовищах м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ), картопляному бульйоні (КБ), середовищі Омелянського (ОМ) та середовищі Wolley (W) (Патика, Пасічник, Гвоздяк, Петриченко, Корнійчук, Калініченко, та ін., 2017). Клітини бактерій відділяли центрифугування 5000 об/хв 40 хв та аналізували мутагенну активність культуральної рідини.

Для визначення геномодулювальної (мутагенної та антимутагенної) активності нами використано прокаріотичну тест-систему – тест Еймса (Vijay, Gupta, Mathur, Suravajhala, Bhatnagar, 2018).

Як тест-культури використали аукотрофні за гістидином штами *Salmonella typhimurium* TA100 і *S. typhimurium* TA98 (Vijay, Gupta, Mathur, Suravajhala, Bhatnagar, 2018).

Культуральну рідину фітопатогенних бактерій вносили в кількості 0,1 мл одночасно з 0,25 мл суспензії клітин *S. typhimurium* до напіврідкого агару, який виливали на чашки Петрі діаметром 90 мм з агаризованим середовищем без гістидину. Після 48 год культивування при температурі 37°C підраховували кількість колоній His⁺ ревертантів, що вирости на середовищі без гістидину. Мутагенна активність речовини вважається встановленою, якщо кількість колоній ревертантів в досліді перевищує кількість ревер-

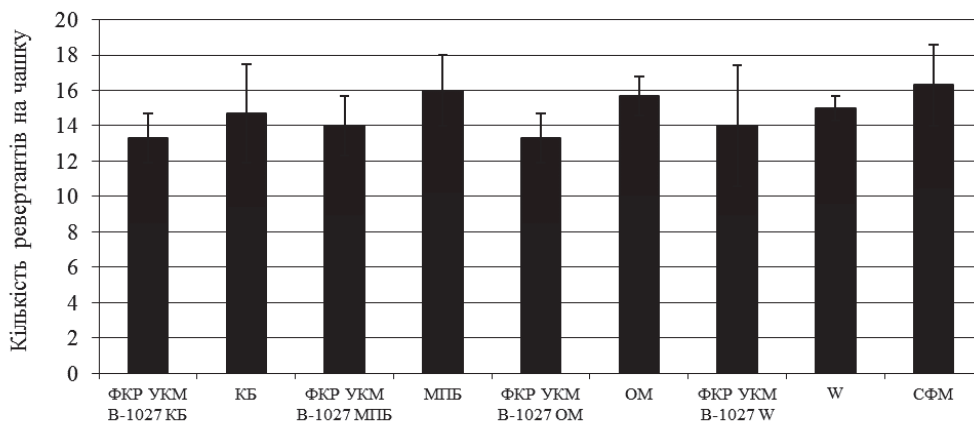


Рис. 1. Вплив фільтрату культуральної рідини *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на кількість мутацій у *S. typhimurium* TA98

тантів у контролі для штаму *S. typhimurium* TA98 у 2,0 рази, для штаму *S. typhimurium* TA100 - у 1,8 рази. Антимутагенну активність виражали у відсотках зменшення кількості колоній у дослідних варіантах у порівнянні зі спонтанним фоном мутацій використаного тест-штаму. Досліди проводили у чотирьохразовій повторності.

Визначення здатності активувати промутаген здійснювали за використання 3,3'-діамінобензидину (в якості промутагену) за методикою теста Еймса з метаболічною активацією (Vijay, Gupta, Mathur, Suravajhala, Bhatnagar, 2018). У цьому варіанті тесту замість S9 мікросомальної фракції печінки щурів використовували клітини бактерій *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atofaciens*.

Статистична обробка даних була виконана за допомогою програми RStudio (Version 1.1.463 – 2009-2018 RStudio, Inc.) та Statistica 6.0.

Для оцінки даних використали такі статистичні методи: критерій Шапіро-Уїлка для перевірки нормальності розподілу даних, дисперсійний аналіз за Краскелом-Уоллісом та t-критерій Стьюдента для виявлення статистично значущих відмінностей між групами даних.

Результати дослідження та їх обговорення. З літератури відомо, що геномодулювальною активністю може характеризуватися широкий спектр токсинів, які утворюють мікроорганізми (Martin, Frisan, Mihaljevic, 2018). Для вивчення здатності утворювати сполуки із мутагенною активністю нами вивчено культуральну рідину типового штаму виду *P. syringae* – *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027.

Оскільки склад поживного середовища має вирішальне значення для синтезу мікроорганізмом метаболітів досліджено культуральну рідину, яку отримано за культивування *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ), картопляному бульйоні (КБ), середовищі Омелянського (ОМ) та середовищі Wolley (W).

Нами встановлено, що всі середовища, використані в роботі для культивування *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, не мають геномодулювальної активності (рис. 1).

За внесення фільтрату культуральної рідини (ФКР) *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 утворювалася дещо менша кількість His⁺ ревертантів *S. typhimurium* TA98, ніж за внесення відповідного середовища (рис. 1). Однак, ця кількість достовірно не

відрізнялася від спонтанного фону мутацій тест-штаму *S. typhimurium* TA98.

Не було виявлено також достовірного зменшення кількості His⁺ ревертантів *S. typhimurium* TA98, індукованих біхроматом калію за внесення ФКР *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 і відповідного середовища (рис. 2).

Таким чином, нами встановлено, що *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 не утворює екзотаболітів із мутагенною активністю та здатністю впливати на індукований біхроматом калію мутагенез у тест-штаму *S. typhimurium*.

Не впливав на кількість спонтанних His⁺ мутацій обох тест-штамів *S. typhimurium* і фільтрат культуральної рідини штамів *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011, 9400 та 9417, який отримали за культивування вказаних штамів бактерій на КБ (рис. 3).

Отже, за культивування в лабораторних умовах *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atofaciens* не утворюють сполук із мутагенною активністю в тесті Еймса.

Для вивчення здатності фітопатогенних бактерій виду *P. syringae* активувати промутагени нами було використано 3,3ϕ-діамінобензидін, який є добре відомим промутагеном (Chung, Chen, Claxton, 2006), у концентрації 1мг/мл.

Оскільки здатність активувати промутагени бактеріями пов'язують із їхніми внутріклітинними оксидазами чи наявністю у них цитохрому 450, ми використали лізати клітин відповідного штаму бактерій, у якому розчиняли 3,3ϕ-діамінобензидін, для постановки тесту Еймса.

Нами встановлено, що внесення 3,3ϕ-діамінобензидіну не впливає на кількість His⁺ реверсій у обох тест-штамів *S. typhimurium* (рис. 4). Так, спонтанний фон мутацій *S. typhimurium* TA98 становив $36,7 \pm 3,2$ колонії на чашку, а за внесення 3,3ϕ-діамінобензидіну кількість His⁺ ревертантів становила $36,3 \pm 4,4$ на чашку. Кількість His⁺ реверсій у *S. typhimurium* TA98 за дії 3,3ϕ-діамінобензидіну у суміші з лізатом клітин *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 була $33,3 \pm 5,6$ на чашку. За додавання лізатів клітин *P. syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011, 9400 та 9417 із 3,3ϕ-діамінобензидіном до *S. typhimurium* TA98 спостерігали утворення відповідно $36,0 \pm 8,4$, $29,3 \pm 6,7$ та $30,7 \pm 5,3$ колоній ревертантів на чашку. Тобто, кількість реверсій у цих варіантах досліду не відрізнялася від

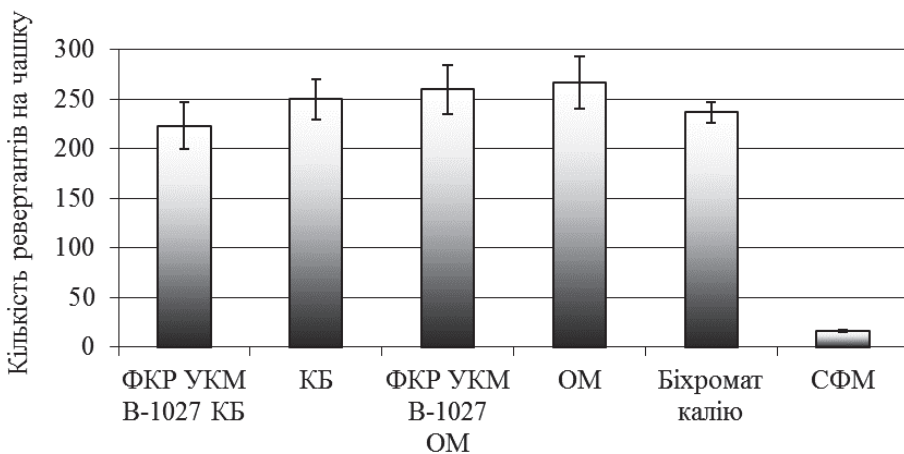


Рис. 2. Вплив фільтрату культуральної рідини *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 на індукований біхроматом калію мутагенез у *S. typhimurium* TA98

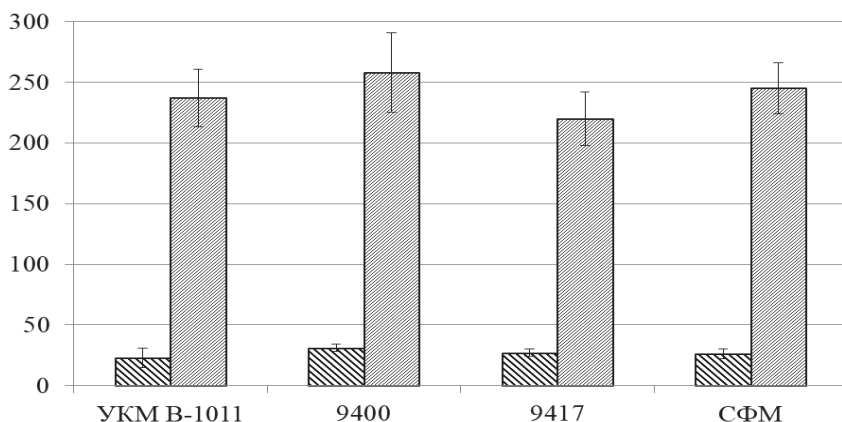


Рис. 3. Вплив на кількість спонтанних His⁺ реверсій тест-штамів *S. typhimurium* фільтрату культуральної рідини *P. syringae* pv. *atrofaciens*, отриманого за культивування на картопляному бульйоні

спонтанного фону мутацій тест-штаму *S. typhimurium* TA98 (рис. 4).

Такі самі результати нами отримано і за використання другого тест-штаму *S. typhimurium* TA100 (рис. 4). Кількість His⁺ ревертантів цього штаму, що утворювала-

ся за внесення 3,3ϕ-діамінобензидіну та 3,3ϕ-діамінобензидіну із лізатом клітин відповідного штаму *P. syringae*, не відрізнялася від спонтанного фону мутацій.

Отже, нами встановлено, що фітопатогенні бактерій *P. syringae* pv. *syringae* і

Кількість His⁺ ревертантів на чашку

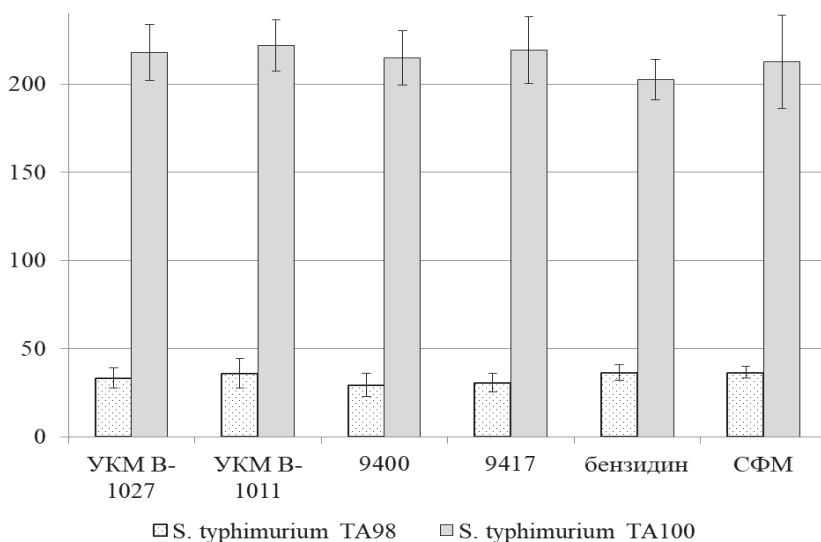


Рис. 4. Кількість His⁺ реверсій у *S. typhimurium* за дії 3,3ϕ-діамінобензидіну у суміші з лізатами клітин штамів *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, 9400 та 9417

P. syringae pv. *atofaciens* не утворюють метаболітів із мутагенною дією за культивування в лабораторних умовах та не спричинюють активацію промутагену 3,3 ϕ -діамінобензидіну. Не здатність активувати промутаген може бути наслідком відсутності ферменту оксидази у фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas*.

Висновки. Широко поширені в агрофітоценозах зернових культур бактерії патоварів *P. syringae* pv. *syringae* і *P. syringae* pv. *atofaciens* не утворюють екзометаболітів із мутагенною активністю та не здатні активувати промутагени. Не здатність активувати промутаген 3,3 ϕ -діамінобензидін може бути обумовлено відсутністю у фітопатогенних *P. syringae* оксидази.

References

1. Lukash, L. (2013). Regulation of mutagenesis by exogenous biological factors in the eukaryotic cell systems. *Biopolym Cell*, 29(4), 283–294.
2. Manova, V., Gruszka, D. (2015) DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Frontiers in Plant Science*, 6, 885. doi:10.3389/fpls.2015.00885.
3. Aybeke, M. (2017). Fusarium infection causes genotoxic disorders and antioxidant-based damages in *Orobanche* spp. *Microbiological Research*, 201,46–51. doi.org/10.1016/j.micres.2017.05.001.
4. Song, J., Bent, A. (2014). Microbial pathogens trigger host DNA double-strand breaks whose abundance is reduced by plant defense responses. *PLoS Pathog*, 10(4):e1004030. doi: 10.1371/journal.ppat.1004030. eCollection 2014 Apr.,2014.
5. Adris, P., Chung, K.-T. (2006). Metabolic activation of bladder procarcinogens, 2-aminofluorene, 4-aminobiphenyl, and benzidine by *Pseudomonas aeruginosa* and other human endogenous bacteria. *Toxicol in vitro*, 20, 367–374.
6. Adris, P., Lopez-Estraño, C., Chung, K. (2007). The metabolic activation of 2-aminofluorene, 4-aminobiphenyl, and benzidine by cytochrome P-450-107S1 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicol In Vitro*, 21(8), 1663-71.
7. Pawlik, M., Piotrowska-Seget, Z. (2015). Endophytic bacteria associated with hieracium piloselloides: otential for hydrocarbon-utilizing and plant growth-promotion. *J Toxicol Environ Health A*, 78(13-14), 860-70. doi: 10.1080/15287394.2015.1051200.
8. Patyka, V., Pasichnyk, L., Gvozdyak, R., Petrychenko, V., Korniychuk, O., Kalinichenko, A. et al. (2017). *Fitopatohenni bakterii. Metody doslidzhen. Monografiia. [Phytopathogenic bacteria. Research methods]* T. 2. Vinnytsia: TOV Vingruk, 567.
9. Vijay, U., Gupta, S., Mathur, P., Suravajhala, P. and Bhatnagar, P. (2018). Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Bio-protocol* 8(6): e2763. doi: 10.21769/BioProtoc.2763.
10. Martin, O., Frisan, T., Mihaljevic, B. (2018). Bacterial Genotoxins as the Interphase Between DNA Damage and Immune Response. In: Gopalakrishnakone P, Stiles B, Alape-Girón A, Dubreuil J, Mandal M. (eds) *Microbial Toxins. Toxinology*. Springer; 459.
11. Chung, K., Chen, S., Claxton, L. (2006). Review of the *Salmonella typhimurium* mutagenicity of benzidine, benzidine analogues, and benzidine-based dyes. *Mutat Res*, 612(1), 58-76.

Література

1. Lukash, L. (2013). Regulation of mutagenesis by exogenous biological factors in the eukaryotic cell systems. *Biopolym Cell*, 29(4), 283–294.
2. Manova, V., Gruszka, D. (2015) DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Frontiers in Plant Science*, 6, 885. doi:10.3389/fpls.2015.00885.
3. Aybeke, M. (2017). Fusarium infection causes genotoxic disorders and antioxidant-based damages in *Orobanche* spp. *Microbiological Research*, 201,46–51. doi.org/10.1016/j.micres.2017.05.001.
4. Song, J., Bent, A. (2014). Microbial pathogens trigger host DNA double-strand breaks whose abundance is reduced by plant defense responses. *PLoS Pathog*, 10(4):e1004030. doi: 10.1371/journal.ppat.1004030.

5. Adris, P., Chung, K.-T. (2006). Metabolic activation of bladder procarcinogens, 2-aminofluorene, 4-aminobiphenyl, and benzidine by *Pseudomonas aeruginosa* and other human endogenous bacteria. *Toxicol in vitro*, 20, 367–374.
6. Adris, P., Lopez-Estraño, C., Chung, K. (2007). The metabolic activation of 2-aminofluorene, 4-aminobiphenyl, and benzidine by cytochrome P-450-107S1 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicol In Vitro*, 21(8), 1663-71.
7. Pawlik, M., Piotrowska-Seget, Z. (2015). Endophytic bacteria associated with hieracium piloselloides: potential for hydrocarbon-utilizing and plant growth-promotion. *J Toxicol Environ Health A*, 78(13-14), 860-70. doi: 10.1080/15287394.2015.1051200.
8. Пати́ка, В., Пасі́чник, Л., Гвоздяк, Р., Петри́ченко, В., Корнійчук, О., Калі́ніченко, А. та ін. (2017). Фітопатогенні бактерії. Методи дослідження. Монографія. Т. 2. Вінниця: ТОВ Віндрук, 567.
9. Vijay, U., Gupta, S., Mathur, P., Suravajhala, P. and Bhatnagar, P. (2018). Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *Bio-protocol* 8(6): e2763. doi: 10.21769/BioProtoc.2763.
10. Martin, O., Frisan, T., Mihaljevic, B. (2018). Bacterial Genotoxins as the Interphase Between DNA Damage and Immune Response. In: Gopalakrishnakone P, Stiles B, Alape-Girón A, Dubreuil J, Mandal M. (eds) *Microbial Toxins*. *Toxinology*. Springer; 459.
11. Chung, K., Chen, S., Claxton, L. (2006). Review of the *Salmonella typhimurium* mutagenicity of benzidine, benzidine analogues, and benzidine-based dyes. *Mutat Res*, 612(1), 58-76.

SUMMARY

L. M. Butsenko. *Genomodulation activity of pseudomonas syringae pv. Syringae i p. Syringae pv. Atrofaciens. Biological Resources and Nature Management. 2019. II, № 3–4. P. 25–32. <https://doi.org/10.31548/bio2019.03.003>*

Certain types of bacteria can serve as a biological factor of mutagenesis and activate promutagens, which makes relevant studies of genomodulatory ability of phytopathogenic bacteria, which are widespread in agrophytocenoses. Determination of genomodulation activity and the ability to activate the known promutagen 3,3'-diaminobenzidine with phytopathogenic bacteria *P. syringae pv. syringae* and *P.*

syringae pv. atrofaciens was performed in the Ames test. It has been established that phytopathogenic bacteria *P. syringae pv. syringae* and *P. syringae pv. atrofaciens* do not form exometabolites with mutagenic effects when cultured in laboratory conditions and do not activate promutagen 3,3'-diaminobenzidine.

Keywords: phytopathogenic bacteria, promutagen, genomodulatory activity

АННОТАЦІЯ

Л. Н. Буценко. *Геномодулююча активність pseudomonas syringae pv. Syringae i p. Syringae pv. Atrofaciens. Биоресурсы и природопользование. 2019. II, № 3–4. P. 25–32. <https://doi.org/10.31548/bio2019.03.003>*

Некоторые виды бактерий могут служить биологическим фактором мутагенеза и активировать промутагены, что делает актуальными исследования геномодулирующей способности фитопатогенных бактерий, которые являются широко распространенными в агрофитоценозах. Определение геномодулирующей активности и способности активировать известный промутаген 3,3'-диаминобензидин фитопатогенными бактери-

ями *P. syringae pv. syringae* и *P. syringae pv. atrofaciens* было осуществлено в тесте Эймса. Установлено, что фитопатогенные бактерии *P. syringae pv. syringae* и *P. syringae pv. atrofaciens* не образуют экзо-метаболитов с мутагенным действием при культивировании в лабораторных условиях и не активируют промутаген 3,3'-диаминобензидин.

Ключевые слова: фитопатогенные бактерии, промутаген, геномодулирующая активность

Отримано 21.06.2019 р.