

## МОДИФІКАЦІЯ УФ-В ОПРОМІНЕННЯМ ВЛАСТИВОСТЕЙ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ PECTOBACTERIUM (ERWINIA) CAROTOVORA

УФ-В-опромінення справляє модифікуючий вплив на патогенні властивості бактерій *Pectobacterium (Erwinia) carotovora*. Одним з наслідків цього є зростання агресивності бактерій, опосередковане стрес-індукованою стимуляцією експресії їх фактору патогенності пектинліази. Характер зміни агресивності у широкоспеціалізованого штаму *P. carotovora* IMB 8418 свідчить про наявність у нього високого адаптивного потенціалу.

**Ключові слова:** УФ-В-опромінення, бактерії, патогенність, пектинліаза.

УФ-В-излучение осуществляет модифицирующее воздействие на патогенные свойства бактерий *Pectobacterium (Erwinia) carotovora*. Одним из последствий этого является возрастание агрессивности бактерий, опосредованное стресс-индуцированной стимуляцией экспрессии их фактора патогенности пектинлиазы. Характер изменения агрессивности широкоспециализированного штамма *P. carotovora* IMB 8418 свидетельствует о наличии у него высокого адаптивного потенциала.

**Ключевые слова:** УФ-В, облучение, бактерии, патогенность, пектинлиаза.

UV-B radiation carries out modifying influence on pathogenic properties of *Pectobacterium (Erwinia) carotovora* bacteria. One of consequences this there is growth of bacteria aggressiveness mediated by stress-induced stimulation of pathogenicity factor expression of pectinlyase. The nature of changes in aggressiveness *P. carotovora* IMB 8418 indicates that it has a high adaptive potential.

**Key words:** UV-B-radiation, bacteria, pathogenicity, pectinlyase.

**ВСТУП.** Антропогенного впливу на довкілля зазнають усі компоненти біоценозів. Наслідком цього можуть бути множинні модифікації властивостей мікробіоти – стимуляція розвитку патогенних мікроорганізмів, зміна їх персистентних характеристик, набуття патогенами здатності вражати неспецифічних господарів [5]. Одним із суттєвих стресових факторів є УФ-В-випромінення, інтенсивність впливу зростає внаслідок руйнування озонового шару атмосфери. *Pectobacterium (Erwinia) carotovora* – бактеріальний патоген рослин з широким колом господарів, який завдає значних економічних втрат [11]. Ервінії є збудниками м'якої гнилизни картоплі, капусти та інших культур. Вони можуть існувати як епіфіти і ендоефіти на рослинах, а також як сапрофіти у ґрунті і ґрунтовій воді [7]. Зважаючи на важливе значення цих бактерій у патогенезі рослин, актуальною задачею є дослідження впливу УФ-В на їх властивості та взаємодію з рослинами. Метою нашого дослідження було оцінити модифікуючу дію УФ-В-опромінення на властивості різних штамів фітопатогенних бактерій *P. carotovora*.

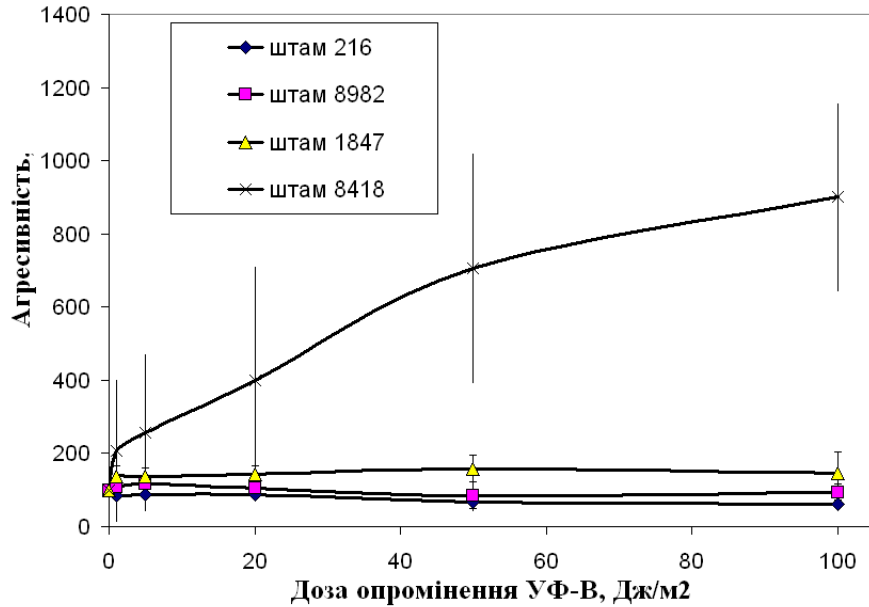
**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження були фітопатогенні бактерії *Pectobacterium carotovora*

*subsp. carotovora (Erwinia carotovora subsp. carotovora)* штамів IMB 216, IMB 8982, IMB 1847 та IMB 8418 (з колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України).

Для оцінки впливу УФ-В-випромінення суспензії 24- та 48-годинних культур бактерій ( $10^9$  клітин/мл) опромінювали УФ-В у дозах 1, 5, 10, 20 і 50 Дж/м<sup>2</sup>. У дослідах використовували сорт картоплі «Слов'янка» (чутливий до ураження мокрою гнилизною). Картопляні диски інокулювали суспензією бактерій ( $10^8$  клітин/мл). Оцінку агресивності бактеріальної культури проводили за зменшенням маси картопляних дисків через 48 год після зараження. Вплив УФ-В на експресію фермента пектинліази (КФ 4.2.2.10) оцінювали за здатністю опромінених бактерій розщеплювати пектин, культивуючи їх протягом 24 год у рідкому середовищі з пектином. Активність пектинліази оцінювали за накопиченням у культуральному середовищі продуктів розщеплення пектину з подвійним зв'язком у моногалактуроному залишку за оптичною густиною при 230-235 мкм [3]. Обробку результатів проводили з використанням програми Microsoft Office Excel 2003 та за [2].

**Результати та їх обговорення.** Вплив УФ-В на бактерії *P. carotovora* відрізняється для різних штамів (рис.1). У штаму IMB 216 опромінення викликало зниження агресивності зі збільшенням дози поромінення. У штаму IMB 8982 спостерігали незначну стимуляцію агресивності при малих дозах (1, 5 та 20 Дж/м<sup>2</sup>), але вона виявилася статистично недост. - вірною і змінювалася інгібуванням при вищих дозах (50 і 100 Дж/м<sup>2</sup>). У штаму IMB 1847 тенденцію до

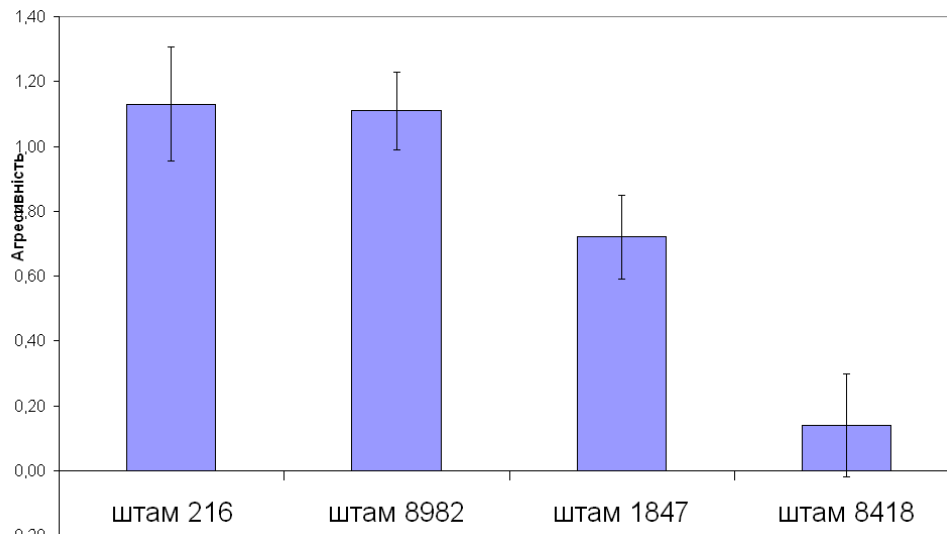
підвищення агресивності відзначали при всіх застосованих дозах УФ-В опромінення. У разі опромінення бактерій широкоспеціалізованого штаму *P. carotovora* IMB 8418 (полібіотроф, який раніше відносили до «*Erwinia toxica*») мало місце виражене підвищення агресивності при всіх дозах опромінення. Подібну залежність ми спостерігали раніше при гамма-опроміненні пектобактерій [6].



**Рис. 1.** Залежність агресивності різних штамів *Pectobacterium carotovora subsp. carotovora* від дози УФ-В-опромінення

Одержані результати вказують на те, що УФ-В опромінення може стимулювати патогенність бактерій. Не виключено, що широкоспеціалізований патогенний штам *P. carotovora* IMB 8418 вищий адаптивний потенціал, порівняно з іншими дослідженими штамми. Адаптаційний потенціал можна розглядати, з одного боку, як значення максимально можливого рівня стійкості до стресового фактору, а, з іншого боку, як ще не реалізовану

можливість до пристосування, величину якої можна виразити у вигляді різниці між максимально можливим значенням стійкості і її поточним значенням [4]. У патогенів, котрі потрапляють в організм господаря або у зовнішнє середовище, під впливом різних факторів, розвиваються адаптивні реакції. Зокрема, вірулентність мікроорганізмів розглядається як функція їх здатності адаптуватися до організму господаря [1]



**Рис. 2.** Зменшення маси картопляних дисків при зараженні різними штамми *Pectobacterium carotovora subsp. carotovora* без опромінення

Це підтверджується даними стосовно вихідної агресивності досліджуваних штамів *P. carotovora*, яку оцінювали за зменшенням маси заражених картопляних дисків (рис. 2). Найвищий рівень вихідної агресивності характерний для штамів ІМВ 216 та ІМВ 8982. Однак у них не було виявлено значимого зростання патогенності після УФ-В-опромінення. Штам ІМВ 8418 характеризувався найнижчим вихідним рівнем агресивності, величина якої значно коливалася, проте при УФ-В-опроміненні відбувалося її значне зростання. Таким чином, полібіотрофний штам ІМВ 8418 мав найвищий адаптаційний потенціал.

Зростання агресивності пектобактерій обумовлене стрес-індукованим підвищенням експресії факторів патогенності, зокрема, пектинліази. Пектинліаза є одним з основних факторів патогенності пектобактерій. Це єдиний фермент з пектиназ, здатний гідролізувати високоетерифіковані рослинні пектини без попереднього впливу інших ферментів. У бактерій *E. carotovora subsp. carotovora*, *E. carotovora subsp. atroseptica*, *E. chrysanthemi*, що викликають мокру гнилизну, пектинліаза індукується ДНК-пошкоджую-

чими агентами, такими як мітоміцин С, налідіксова кислота, блеоміцин, УФ-С (254 нм) і не залежить від субстрату (пектину, пектата), який індукує пектолітичні ферменти [12]. Ця стимуляція унікальна, оскільки інші пектинази індуюються продуктами катаболізму пектину або пектату, але не ДНК-пошкоджуючими агентами [8]. Така неспецифічна стимуляція пектинолітичних властивостей дозволяє цьому фітопатогену уражати широке коло господарів, оскільки інтенсивне утворення пектинолітичних ферментів викликає швидку загибель рослинних клітин і перешкоджає розвитку захисних реакцій у рослин.

Для дослідження зв'язку стимуляції агресивності бактерій зі стрес-індукованою експресією пектинліази було проведено порівняння рівня агресивності типового штаму *P. carotovora* ІМВ 1847 при УФ-В-опроміненні та активності пектинліази (рис. 3). Було показано, що дозова залежність для експресії пектинліази повторювала характер дозової залежності агресивності бактерій. Це підтверджує внесок активації пектинліази у стимуляцію агресивності бактерій при УФ-В-опроміненні.

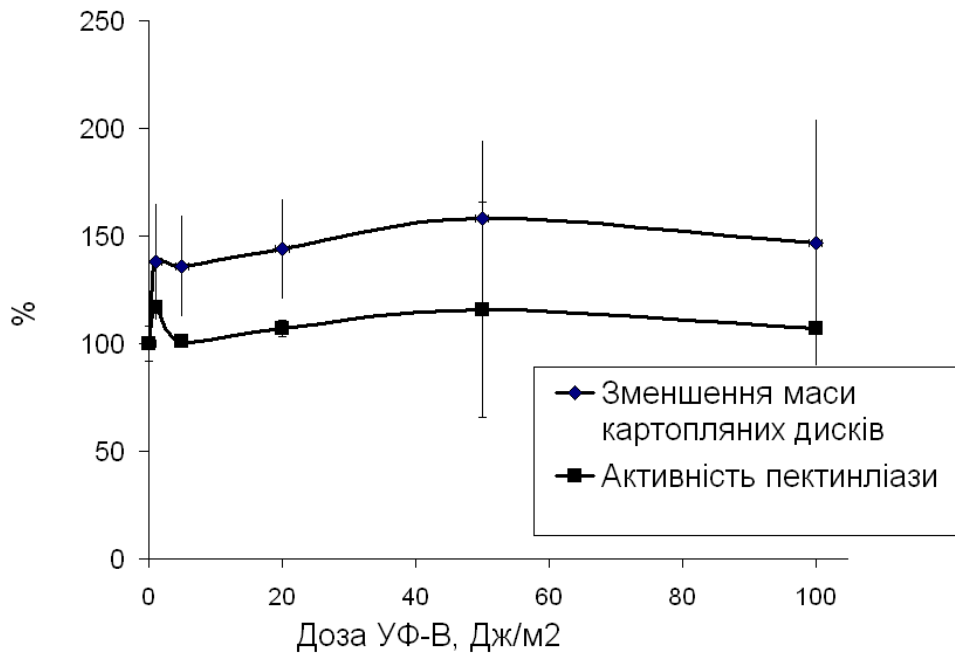


Рис. 3. Залежність агресивності та активності пектинліази *Pectobacterium carotovora subsp. carotovora* ІМВ 1847 від дози УФ-В

Стимуляція синтезу пектинліази і каротоворицину у *E. carotovora* залежить від функціонування гену *recA* і регулятора активності генів *Rdg*, який індукується при ушкодженні ДНК за участю білка *RecA* SOS-модулона [9]. SOS-система належить до глобальних регуляторних систем бактерій і однією з її функцій є репарація ДНК. Тобто, УФ-В-опромінення може не тільки стимулювати підвищення стійкості мікроорганізмів через активацію систем репарації ДНК, але й підсилювати патогенні властивості бактерій через збільшення експресії їх факторів патогенності. Це вказує на те, що у патогенів сформувалися різнорівневі системи SOS-опосередкованої регуляції експресії

генів вірулентності (зокрема, регуляція білком *RecA* транскрипції факторів патогенності).

**Висновки.** Показано, що малі дози УФ-В-опромінення можуть підсилювати патогенні властивості бактерій *P. carotovora*. Зростання агресивності бактерій *P. carotovora*, індукованої УФ-В, опосередковується стрес-індукованою стимуляцією експресії їх факторів патогенності, зокрема, пектинліази. Встановлено, що агресивність широкоспеціалізованого штаму *P. carotovora* ІМВ 8418 вища, порівняно з іншими дослідженими штамми. Це свідчить про наявність у нього більшого адаптивного потенціалу.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Домарадский И. В. Вирулентность бактерий как функция адаптации / И. В. Домарадский // Журн. микробиол. – 1997. – № 4. – С. 16-20.
2. Калоша В. К. Математическая обработка результатов эксперимента / В. К. Калоша, С. И. Лобко, Т. С. Чикова. – М. : Высшая школа, 1982. – 103 с.
3. Метлицкий Л. В. Пектолитические ферменты / Л. В. Метлицкий, К. В. Васильева // Биохимия иммунитета и покоя растений М. : Наука, 1969. – 358 с.
4. Міхєєв О. М. Ендогенні та екзогенні фактори реалізації фенотипічного адаптаційного потенціалу рослин (теоретичні та експериментальні аспекти) / О. М. Міхєєв, М. І. Гуца, Ю. В. Шиліна // Фізіологія рослин в Україні на межі тисячоліть. – Т. 2. – Київ, 2001. – С. 82-88.
5. Проблема патогенності мікроорганізмів в антропогенно змінених екосистемах / [Шиліна Ю. В., Гуца М. І., Дмитрієв О. П. та ін.] // Наукові праці Миколаївського державного гуманітарного університету імені Петра Могили. Серія Екологія. – 2006. – Т. 58, Вип. 45. – С. 27-36.
6. Радиационный метод оценки адаптивного потенциала фитопатогенных бактерий с разной специализацией / Шиліна Ю. В., Гуца Н. И., Дяченко А. И., Ромашко В. М. // Материалы Международной конференции «Радиопротекторы, эффективные при действии хронического облучения в малых дозах (16-20 июня 2008 г., г. Николаев, Украина). – Николаев, 2008. – С. 63-64.
7. Bell K. S., Sebaihia M., Pritchard L. et al. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors // PNAS. – 2004. – 101, 30. – P. 11105–11110.
8. Chatterjee A., McEvoy J. L., Chambost J. P., Blasco F., Chatterjee A.K. Nucleotide sequence and molecular characterization of *pnlA*, the structural gene for damage-inducible pectin lyase of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* 71 // J. Bacteriol. – 1991. – 173, 3. – P. 1765-1769.
9. Liu Y., Chatterjee A., Chatterjee A. K. Nucleotide sequence, organization and expression of *rdgA* and *rdgB* genes that regulate pectin lyase production in the plant pathogenic bacterium *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in response to DNA-damaging agents // Mol. Microbiol. – 1994. – Vol. 14, № 5. – P. 999-1010.
10. McEvoy J. L., Murata H., Chatterjee A. K. Genetic evidence for an activator required for induction of pectin lyase in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by DNA-damaging agents. // J. Bacteriol. – 1992. – 174, 16. – P. 5471-5474.
11. Yap M.-N., Barak J. D., Charkowski A.O. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence // Appl. Env. Microbiol. – 2004 – 70, 5. – P. 3013–3023.
12. Zink R. T., Engwall J.K., McEvoy J. L., Chatterjee A. K. RecA is required in the induction of pectin lyase and carotovoricin in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // J. Bacteriol. – 1985. – 164, 1. – P. 390-396.

Рецензенти: **Гродзинський Д.М.**, д.б.н., професор;  
**Кутлахмедов Ю. О.**, д.б.н., професор;

© Шиліна Ю. В., Гуца М. І.,  
Мороз Ю. І., Моложава О. С., 2012

Дата надходження статті до редколегії: 24.04.2012 р.

**ШИЛІНА Юлія Володимирівна** – к.б.н., старший науковий співробітник відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ.

**Коло наукових інтересів:** радіаційна біологія, радіаційна екологія, екологія мікроорганізмів, фітопатологія.

**ГУЦА Микола Іванович** – к.б.н., старший науковий співробітник відділу біофізики та радіобіології Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН України, Київ.

**Коло наукових інтересів:** радіаційна біологія, радіаційна екологія, проблеми адаптації організмів, фітопатологія.

**МОРОЗ Юлія Ігорівна** – магістр кафедри мікробіології та загальної імунології ННЦ «Інституту біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

**Коло наукових інтересів:** екологія мікроорганізмів, фітопатологія, молекулярна генетика.

**МОЛОЖАВА Ольга Станіславівна** – к.б.н., доцент кафедри мікробіології та загальної імунології ННЦ «Інституту біології» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

**Коло наукових інтересів:** імунопатологія, екологічна імунологія, біологічні основи інфекційних процесів.