

## ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО ГАММА- ОПРОМІНЕННЯ НА ФІТОТОКСИЧНІСТЬ ТА ЕКСПРЕСІЮ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ В БАКТЕРІЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

*Хронічне гамма-опромінення чинить модифікуючий вплив на фітотоксичність фітопатогенних та сапрофітних штамів бактерій *Pseudomonas aeruginosa*. Показано стимулюючий вплив опромінення на клітинну проліферацію та синтез піоціаніну у фітопатогенних штамів *P. aeruginosa*.*

**Ключові слова:** гамма-опромінення, бактерії, *Pseudomonas aeruginosa*, патогенність, фітотоксичність, проліферація, піоціанін.

*Хроническое гамма-облучение оказывает модифицирующее влияние на фитотоксичность фитопатогенных и сапрофитных штаммов бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Показано стимулирующее влияние облучения на клеточную пролиферацию и синтез пиоцианина у фитопатогенных штаммов *P. aeruginosa*.*

**Ключевые слова:** гамма-облучение, бактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, патогенность, фитотоксичность, пролиферация, пиоцианин.

*Chronic gamma irradiation exerts a modifying effect on the phytotoxicity of pathogenic and saprophytic strains *Pseudomonas aeruginosa*. It was shown the stimulating effect of irradiation on cell proliferation and synthesis of pyocyanin in phytopathogenic strains of *P. aeruginosa*.*

**Key words:** gamma-irradiation, bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, pathogenicity, phytotoxicity, proliferation, pyocyanine.

Питання про вплив хронічного опромінення на взаємодію рослин із фітопатогенними мікроорганізмами в екосистемах забруднених радіонуклідами територій залишається недостатньо вивченим. Отримані раніше дані свідчать, що рослини, вирощені на ділянках з високими рівнями радіонуклідного забруднення, більше ушкоджувалися фітопатогенами порівняно з рослинами на незабруднених ділянках [1; 2], а хронічне опромінення може викликати прискорений ріст патогенних грибів [3].

Метою дослідження було вивчення впливу хронічного гамма-опромінення з малою потужністю дози на взаємодію бактерій *Pseudomonas aeruginosa* з рослинами.

**Матеріали та методи.** Бактерії *Pseudomonas aeruginosa* різних штамів (фітопатогенні штами – *IMB-9024* і *IMB-9096* та сапрофітні штами *IMB-8614*, *IMB-8615*, *IMB-8616*) висівали в пробірки на агаризоване картопляне середовище, розміщували в дозовому полі навколо пробірки з розчином  $^{137}\text{Cs}$  і культивували протягом 3-4 діб при потужності дози гамма-випромінення  $1,2 \cdot 10^{-8}$  Гр/с. Контрольну культуру утримували за тих же умов без опромінення. Після опромінення суспензію опромінених і неопромінених бактерій (у кінцевій концентрації –  $1 \cdot 10^7$  клітин/мл) вносили у

водну культуру проростків кукурудзи сорту Титан. В різних серіях дослідів використовували 3-, 4- та 5-денні проростки кукурудзи. Після 1 або 4 діб інкубації з бактеріями проростки переносили на чисту воду і через різний час після зараження визначали їх ростові параметри (довжину кореня). Фітотоксичну активність оцінювали за формулою [4]:

$$A\phi = 100 - (Dx - Dn / Dk - Dn) \cdot 100\%$$

де  $A\phi$  – фітотоксична активність у процентах гальмування росту корінців;  $Dx$  – середня довжина корінців у дослідному варіанті;  $Dk$  – середня довжина коренів у контролі;  $Dn$  – початкова довжина коренів.

Проліферативну активність бактерій (концентрацію бактеріальних клітин) та вміст піоціаніну оцінювали у відносних одиницях за оптичною густиною бактеріальних суспензій, вирощених на рідкому картопляному середовищі (спектрофотометр СФ-46,  $\lambda$  600 нм і 330 нм відповідно).

Обробку результатів проводили з використанням програми Microsoft Office Excel 2003 та за [5].

**Результати та їх обговорення.** Показано, що низькоінтенсивне опромінення протягом трьох-чотирьох діб справляло суттєвий вплив на фітотоксичну активність бактерій (рис. 1). Ріст коренів кукурудзи значно уповільнювався після обробки суспензією опромінених

бактерій фітопатогенного штаму 9024 порівняно з неопроміненою культурою цього штаму (варіант 9024+ $\gamma$ /9024) та незараженими рослинами (варіанти

9024+ $\gamma$ /9024 та 9024+ $\gamma$ /контроль). Обробка неопроміненими бактеріями (варіант 9024/контроль) не впливала на ріст коренів.

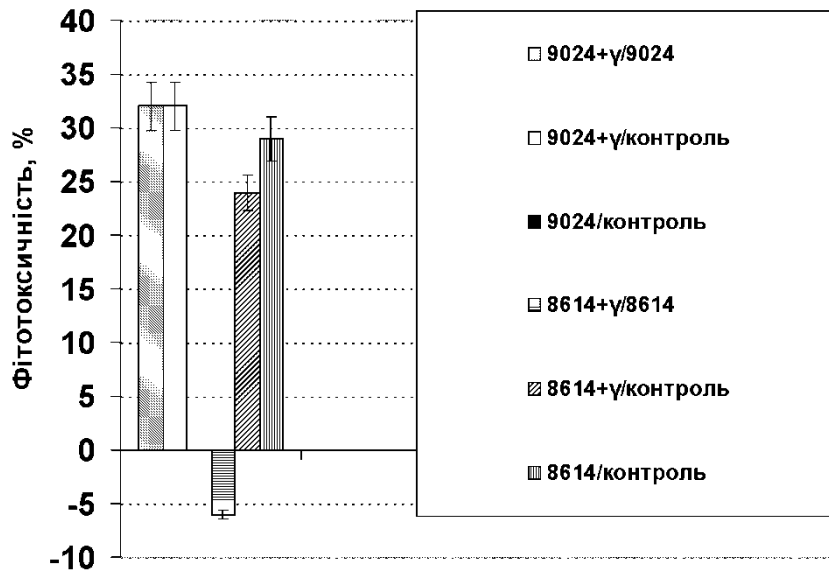


Рис. 1. Вплив хронічного гамма-опромінення на фітотоксичну активність бактерій *P. aeruginosa* фітопатогенного штаму 9024 та сапрофітного штаму 8614 (9 діб після зараження) по відношенню до проростків кукурудзи

Обробка коренів суспензією опромінених сапрофітних бактерій (штам 8614) приводила до стимуляції росту коренів (рис. 1, варіант 8614+ $\gamma$ /8614), у той час як неопромінені бактерії характеризувалися певною фітотоксичною активністю (варіант 8614/контроль).

Фітотоксична активність опроміненого фітопатогенного штаму (9096) зросла на 35 % порівняно з неопроміненою культурою цього ж штаму (рис. 2, варіант 9096+ $\gamma$ /9096). При цьому спостерігали візуальні прояви ураження (відмирання меристеми головного

кореня, розвиток бічних коренів, утворення некротичних зон на різних ділянках коренів, ослизнення коренів). Усі ці ефекти були відсутні в рослин контрольного варіанту та у варіантів, заражених неопроміненою культурою та культурами сапрофітних штамів.

Обробка коренів опроміненою суспензією бактерій іншого фітопатогенного штаму (9095), приводила до стимуляції їх росту, у той час як неопромінена культура даного штаму виявляла фітотоксичну активність (рис. 2, варіант 9095 /контроль).

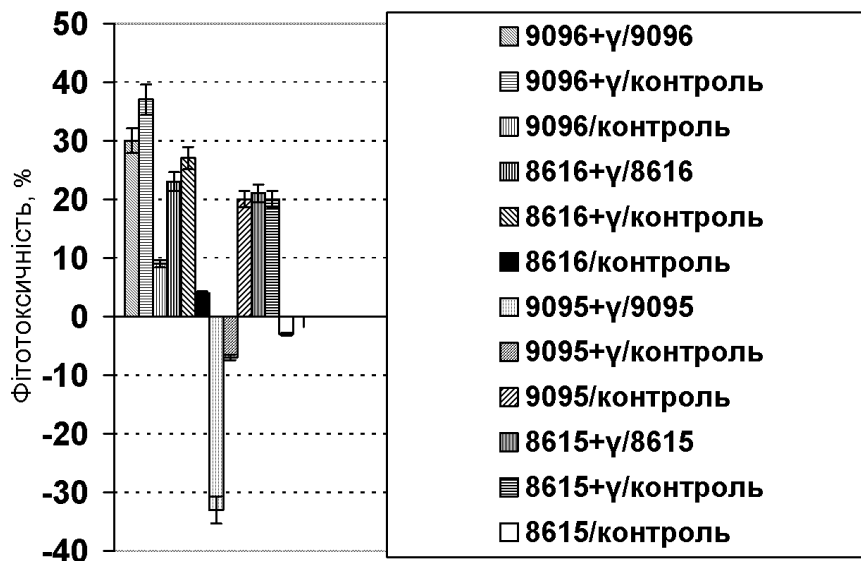


Рис. 2. Вплив хронічного гамма-опромінення бактерій *P. aeruginosa* фітопатогенних штамів 9096 і 9095 та сапрофітних штамів 8616 і 8615 на їх фітотоксичну активність по відношенню до проростків кукурудзи (7 діб після зараження)

Опромінення бактерій сапрофітних штамів (8615 та 8616) приводило до зростання їх фітотоксичності

(рис. 2, варіанти 8616+ $\gamma$ /8616 і 8615+ $\gamma$ /8615). Неопромінені бактерії мали слабку фітотоксичну активність

(варіант 8616/контроль), або певний ростостимулюючий вплив (варіант 8615/контроль).

Отже, низькоінтенсивне хронічне опромінення бактерій *P. aeruginosa* може посилювати або послаблювати їх патогенність, приводячи до модифікації їх взаємодії з рослинами. Стимулюючий вплив неопромінених бактерій на ріст рослин може змінюватися на фітотоксичний вплив і навпаки. Тобто, відбувається зміна знака взаємодії – зі стимуляції (-) на інгібування (+) і з інгібування (+) на стимуляцію (-).

Виявлена стимуляція фітотоксичності бактерій дозволяє припустити, що в бактерій *P. aeruginosa*, які можуть уражати різні види рослин, у ході еволюції сформувалися механізми підвищення агресивності у відповідь на неспецифічні стресові впливи.

Як відомо, при зараженні рослин бактерії можуть зазнавати впливу різних токсичних сполук, зокрема, активних форм кисню. Такі ж сполуки утворюються і при опроміненні. Для подолання наслідків пошкоджуючих впливів у бактерій активуються адаптивні системи захисту і відновлення (репарації, репопуляції) та супражені з ними системи експресії факторів патогенності. Відомо, що опромінення може стимулювати клітинну проліферацію, у т. ч. у бактерій.

Зростання швидкості розмноження бактерій (репопуляційні механізми), яке може відбуватися під впливом активних форм кисню, розглядають як фактор захисту і як фактор патогенності. Крім того, однією з причин зростання вірулентності патогенних бактерій під впливом стресових факторів є існування, принаймні у деяких із них, взаємозв'язку експресії систем захисту і факторів патогенності, що здійснюється, зокрема, завдяки особливостям функціонування в цих бактерій SOS-системи репарації [6]. Про участь SOS-системи в регуляції експресії такого фактору патогенності, як піоціанін свідчать, дані про можливість індукції його синтезу налідіксовою кислотою, яка є одним з індукторів SOS-системи репарації [7].

У зв'язку з цим було проведено порівняльне дослідження впливу хронічного гамма-опромінення бактерій на швидкість поділу клітин бактерій та синтез ними піоціаніну.

Установлено, що хронічне опромінення викликало значне зростання (приблизно в 2 рази) проліферативної активності патогенного штаму 9024 (рис. 3). Зростання швидкості розмноження (до 30 %) спостерігали і в інших фітопатогенних штамів (9095 та 9096).

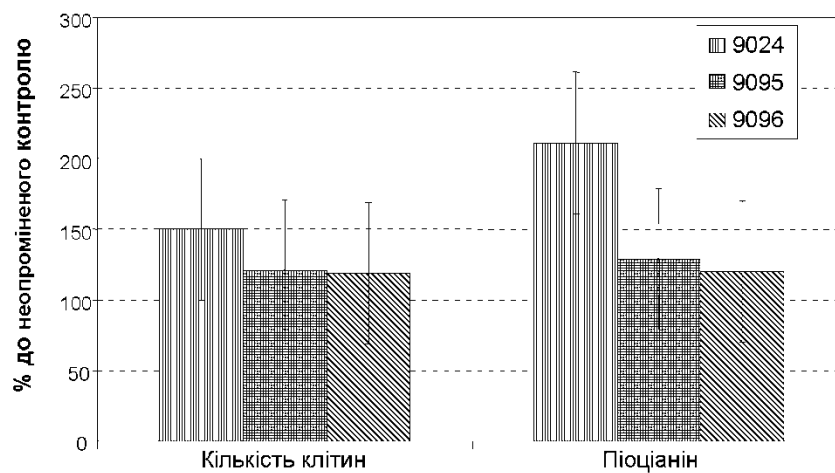


Рис. 3. Вплив хронічного гамма-опромінення на проліферацію клітин та синтез піоціаніну у штамів фітопатогенних бактерій *P. aeruginosa* 9024, 9095, 9096

На користь того, що швидкість розмноження бактерій є одним із факторів їх патогенності свідчать дані про рівень проліферації штамів *P. aeruginosa* *PCBPP-PA14* (виділений із клінічного матеріалу) і *P. aeruginosa* *UCBPP-PA29* (виділений з рослин), що корелював зі ступенем розвитку симптомів захворювання [8]. Відомо, що кількість збудника багато в чому визначає результат інфікування. Масивне інфікування може долати не тільки стійкість рослини-господаря, але й інших видів, що звичайно не уражаються даним видом збудника. Отже, зростання швидкості розмноження бактерій (репопуляційні механізми) можна розглядати і як фактор захисту бактеріальних популяцій від стресових впливів і як фактор патогенності.

Крім швидкості проліферації, важливим фактором патогенності в бактерій *P. aeruginosa* є пігмент піоціанін. Нами була охарактеризована здатність до синтезу піоціаніну в різних фітопатогенних штамів *P. aeruginosa* та вплив на неї опромінення. Показано, що

при хронічному опроміненні всі досліджені фітопатогенні штами (9024, 9095, 9096) утворювали значно більшу кількість цього пігменту, порівняно з їх неопроміненими варіантами (рис. 3).

Піоціанін (1-гідрокси-5-метилфеназин) – є пігментом із групи феназінів, що синтезується бактеріями *P. aeruginosa* та іншими флуоресціюючими видами *Pseudomonas*. Його відносять до факторів вірулентності *P. aeruginosa*. Піоціанін викликає різні патологічні ефекти, пов'язані з вірулентністю бактерій по відношенню до людини, тварин і рослин. Здатність піоціаніну здійснювати токсичний вплив і викликати загибель клітин різних організмів (бактерій, грибів, ссавців, рослин) вказує на існування еволюційно консервативних фізіологічних мішеней для його дії [9]. Піоціанін порушує процеси електронного транспорту і кальцієвий баланс у клітинах, інгібує процеси цитоплазматичного і мітохондріального дихання в клітинах, може прямо викликати порушення функціонування

мембран, інактивувати вакуолярну АТФазу [9; 10]. Цитотоксична дія піоціаніну пов'язана з утворенням активних форм кисню (супероксиданіону  $O_2^{\cdot-}$ , пероксиду водню  $H_2O_2$ ). Відомо, що синтез піоціаніну *P. aeruginosa* необхідний для розвитку симптомів захворювання в рослин [11], зокрема, некрозоутворення. Крім того, для піоціаніну характерна антибіотична активність по відношенню до різних мікроорганізмів (бактерії, гриби) [11].

Прояви підвищеної фітотоксичної активності бактерій протягом тривалого часу після зараження, коли відбувається зміна багатьох генерацій бактеріальних клітин, вказують на існування епігенетичних механізмів, які забезпечують підтримання експресії факторів патогенності бактерій у ряді їх поколінь.

**Висновки.** Хронічне гамма-опромінення бактерій *P. aeruginosa* з низькою потужністю дози протягом ряду генерацій приводить до зміни їх фітотоксичності. Опромінення фітопатогенних штамів *P. aeruginosa* (9024 і 9096) та сапрофітних штамів (8615 і 8616) викликало підвищення їх фітотоксичної активності. Опромінення фітопатогенного штаму 9095 і сапрофітного штаму 8614 змінювало їх фітотоксичний вплив на ростостимулюючий. Можна припустити, що зростання патогенності бактерій при дії хронічного опромінення може бути пов'язане як зі збільшенням швидкості розмноження бактерій, так і з синтезом бактеріями *P. aeruginosa* важливого фактору їх патогенності – пігменту піоціаніну, для якого характерний широкий спектр дії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Гродзинський Д. М. Радиобіологічні ефекти хронічного опромінення рослин у зоні впливу Чорнобильської катастрофи / Д. М. Гродзинський, М. І. Гуща, О. П. Дмитрієв [та ін.] – К. : Наук. думка, 2008. – 376 с.
2. Dmitriev A. Effects of low dose chronic radiation on plant disease resistance and fungal pathogen virulence / A. Dmitriev, M. Krizanovska, N. Guscha, D. Grodzinsky // Current Problems of Radiation Research. – Kiev : Fitosociocentre, 2007. – P. 109–117.
3. Гуща М. Вплив хронічного опромінення з малими потужностями доз на ріст та агресивність фітопатогенних грибів / М. Гуща, А. Дяченко, Ю. Шиліна, О. Дмитрієв // Наук. вісн. УжНУ. Серія : Біологія. – 2001. – Випуск № 10. – С. 133–135.
4. Берестецький О. О. Простий метод виявлення фітотоксичних речовин утворених мікроорганізмами / О. О. Берестецький. // Мікробіологічний журнал. – 1972. – Т 34. – С. 139–142.
5. Калоша В. К., Лобко С. И., Чикова Т. С. Математическая обработка результатов эксперимента / В. К. Калоша, С. И. Лобко, Т. С. Чикова. – М. : Высшая школа, 1982. – 103 с.
6. Шиліна Ю. В. Экспрессия факторов патогенности фитопатогенных бактерий как неспецифическая адаптивная реакция / Ю. В. Шиліна, Н. И. Гуща, А. И. Дяченко, О. С. Моложавая, Ю. И. Мороз // Фактори експериментальної еволюції організмів. – К., 2010. – Т. 9. – С. 107–113. (<http://utgis.org.ua/mode-static/page-history.html>).
7. <http://fr.wikipedia.org>.
8. Rahme L. G. Common virulence factor for bacterial pathogenicity in plants and animals // L. G. Rahme, E. Stevens, S. F. Wolfort [et al.] / Science. – 1995. – Vol. 268. – P. 1899–1902.
9. Ran H. Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin / H. Ran, D. J. Hassett, G. W. Lau // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100, № 24. – P. 14315–14320.
10. Sorensen R. U. In vitro inhibition of lymphocyte proliferation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigment. / R. U. Sorensen, J. D. Klinger, H. A. Cash, P. A. Chase, D. G. Dearborn // Infect. Immun. – 1983. – 41. – P. 321–330.
11. Mavrodi D. V. Functional analysis of gene for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 / Mavrodi D. V., Bonsall R. F., Delaney S. M. // J. Bacteriol. – 2001. – 183. – P. 6454–6465.

Рецензенти: **Кутлахмедов Ю. О.**, д.б.н., професор Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України (м. Київ);

**Петрук В. Г.**, д.х.н., професор Вінницького національного технічного університету (м. Вінниця).

© Шиліна Ю. В., Гуща М. І.,  
Мороз Ю. І., Моложава О. С., 2013

Дата надходження статті до редколегії 08.04.2013 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. Має 82 наукових праці.

**ГУЩА 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. Має 90 наукових праць.

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

**Коло наукових інтересів:** екологія мікроорганізмів, фітопатологія, молекулярна генетика. Має 9 наукових праць.

**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. Має 46 наукових праць.