

Вплив ліпополісахариду *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на спонтанні та індуковані біхроматом калію мутації у *Salmonella typhimurium*

Л. М. Ващенко, Л. А. Пасічник, Р. І. Гвоздяк

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

Виявлено, що ліпополісахарид (ЛПС) *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 у дозі 1000 мкг на чашку зменшує частоту спонтанних мутацій *S. typhimurium* TA98 на 31 %, *S. typhimurium* TA100 — на 16 %. Досліджуваний ЛПС виявив антимутагенні властивості і стосовно індукованих біхроматом калію мутацій. Частота таких мутацій зменшувалася залежно від дози ЛПС на 57–78 % для тест-штаму *S. typhimurium* TA98, та на 14–49 % — для *S. typhimurium* TA100.

Вступ. У зв'язку з накопиченням у навколишньому середовищі великої кількості речовин, що мають мутагенні властивості, і неможливістю виведення цих сполук зі сфери життєдіяльності людини, надзвичайної актуальності набуває питання пошуку речовин з антимутагенними ознаками [1]. На сьогодні відомо досить велику кількість антимутагенів. Переважна їхня більшість — це речовини природного походження: екстракти та соки рослин, продукти бджільництва, вітаміни, амінокислоти, ферментні препарати [2].

Дослідженню антимутагенних властивостей мікроорганізмів почали приділяти увагу лише з 90-х років минулого століття [3]. Встановлено, що антимутагенну активність мають культуральна рідина та клітини молочнокислих, пропіоновокислих, біфідобактерій і фекальних ентерококів [3–5]. Культуральна рідина пекарських дріжджів зменшує рівень спонтанного мутагенезу в клітинах кореневих меристем гороху [6]. Тобто мікроорганізми можуть бути джерелом речовин з антимутагенними властивостями. У той же час слід зазначити, що окремі групи мікроорганізмів можуть виявляти мутагенну активність. Культуральна рідина ґрунтових мікроорганізмів *Bacillus polymyxa* 57, *Pseudomonas putida* 27, *P. fluorescens* 111 містить вторинні метаболіти, які мають виражену мутаген-

ну активність стосовно геномів сої, дріжджів і дрозофіл [7]. На сьогодні геномодельючі властивості мікроорганізмів досліджено недостатньо. Не вивченими в цьому напрямку є фітопатогенні бактерії, які можуть потрапляти до людини разом з продуктами харчування рослинного походження та справляти негативний вплив на людей.

Першим бар'єром на шляху проникнення мутагенів до бактеріальної клітини є клітинна оболонка, яка складається із зовнішньої та внутрішньої мембран, розділених тонким шаром пептидоглікану. Можна припустити, що вона містить речовини, які перешкоджають надходженню мутагенів. Одним з основних компонентів зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій є ліпополісахарид (ЛПС). ЛПС фітопатогенних бактерій — це біологічно активні речовини. Вони відіграють провідну роль у патогенезі [8] та впливають на імунну систему макроорганізмів [9]. ЛПС важливі не лише у взаємодії фітопатогенних бактерій з іншими організмами. Як компонент зовнішньої мембрани вони є фактором життєзабезпечення бактерій. Зовнішня мембрана бактерій слугує фізичним і функціональним бар'єром, що зумовлює стійкість мікробної клітини до факторів довкілля [10].

Мета цієї роботи полягала у вивченні впливу ліпополісахариду *P. syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young et al. 1978 на спонтанний та індукований мутагенез у *S. typhimurium*.

Таблиця 1

Хімічний склад ліпополісахариду (ЛПС) *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281

Препарат ЛПС	Відсоток від сухої маси ЛПС			
	Вуглеводи	Білок	Нуклеїнові кислоти	2-Кето-3-дезоксіоктонова кислота
До ультрацентрифування	30,0	37,0	8,7	Не визначали
Після ультрацентрифування	32,6	22,0	6,6	0,5

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281, виділений з ураженого бактеріозом жита сорту Харківське 60 у фазі колосіння (Житомирська обл., Малинська дослідна ділянка).

ЛПС отримували з сирих клітин бактерій, які вирощували на картопляному агарі при температурі 28 °С протягом 24 год, екстракцією 0,85 %-м розчином NaCl [11]. Екстракти діалізували проти дистильованої води упродовж 48 год і ліофільно висушували. ЛПС очищували осадженням з 3 %-х водних розчинів препаратів на ультрацентрифузі (30000 об/хв, 3 год, 4 °С) [12]. Осад, який містив ЛПС, розчиняли в дистильованій воді і ліофільно висушували. В отриманих препаратах визначали вміст білка методом Лоурі із співавт. [13], вуглеводів — за реакцією з фенолом та сірчаною кислотою, вміст 2-кето-3-дезоксіоктонової кислоти (КДО) — за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [12], нуклеїнових кислот — спектрофотометричним методом [14].

Геномодельюючу активність ЛПС досліджували в тесті Еймса з двома тест-штамами *S. typhimurium* [15]. Тест-штами містять мутації в гістидиновому опероні: *S. typhimurium* TA100 — *hisG46* (мутація типу заміни пар нуклеотидів); *S. typhimurium* TA98 — *hisD3052* (мутація типу зсуву рамки зчитування). Крім цих мутацій, обидва штами несуть мутації, які підвищують їхню чутливість до мутагенів: *ΔuvrB* — дефект репараційної системи, *rfa* — дефект синтезу ліпополісахариду, а також плазмідну стійкості до ампіциліну *pKM101* [15, 16].

Для вивчення впливу на частоту спонтанних мутацій водний розчин ЛПС відповідної концентрації вносили в кількості 0,1 мл до розплавленого напіврідкого агару верхнього шару одночасно із суспензією клітин *S. typhimurium*. Для аналізу впливу ЛПС на індуквані мутації 0,1 мл розчину біхромату калію та 0,1 мл розчину ЛПС відповідної концентрації додавали до розплавленого агару верхнього шару одночасно із суспензією культури *S. typhimurium*. Напіврідкий агар виливали на шар нижнього мінімального агару. Після 48 год культивування при температурі 37 °С враховували кількість колоній ревертантів, які виникали внаслідок зворотних мутацій від ауксотрофності за гістидином до прототрофності. Антимутагенну активність ЛПС визначали за відсотком зменшення кількості ревертантів, індукованих біхроматом калію у присутності ЛПС порівняно з кількістю ревертантів, індукованих самим біхроматом.

Щоб виявити вплив ЛПС на *S. typhimurium* його вносили в концентрації від 0,5 до 500 мкг/мл до м'ясопептонного агару (МПА). На МПА (контроль) і МПА з ЛПС висівали по 0,1 мл суспензії клітин *S. typhimurium* (титр 10³ кл/мл). Після 24 год культивування враховували кількість колоній *S. typhimurium*. Однакова кількість колоній у досліді і контролі свідчила про відсутність у ЛПС токсичних властивостей.

Результати і обговорення. Фітопатогенна бактерія *P. syringae* pv. *atrofaciens* — основний збудник захворювання жита в Україні [17]. Обраний для дослідження штам цієї бактерії 8281 є патогенним, на житі він спричинює утворення бурих маслянистих плям з коричневою облямівкою, на деяких рослинах утворюється недорозвинений колос.

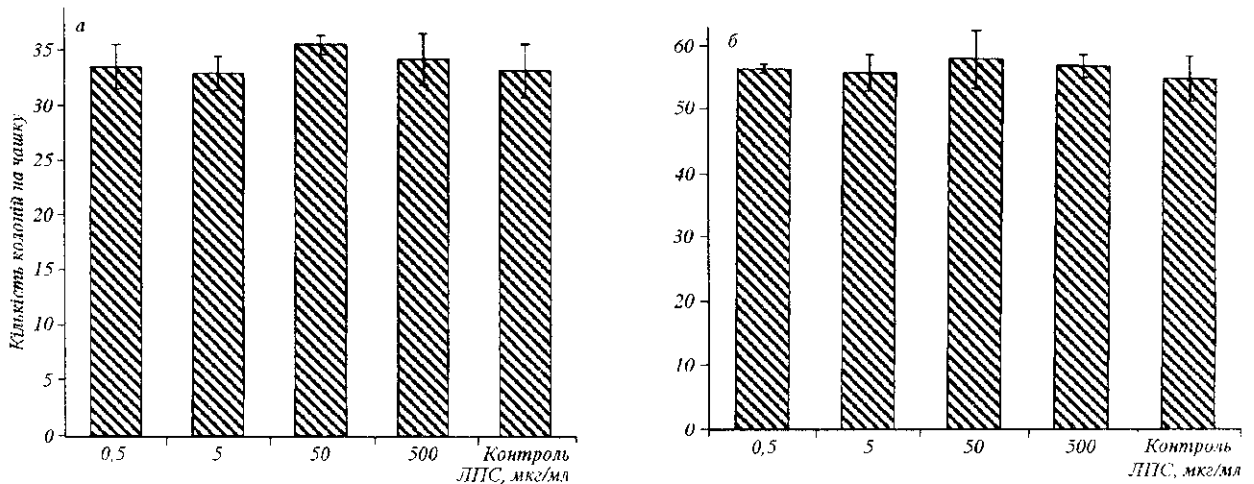
Відомо, що біологічна активність ЛПС визначається структурною організацією цих молекул. Тому для вивчення біологічної активності нам необхідно було отримати нативний ЛПС. ЛПС фітопатогенних бактерій *P. syringae* слабо утримується в зовнішній мембрані [11]. Це обумовило вибір нами методу екстракції ЛПС. Вихід ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 при екстракції 0,85 %-м розчином NaCl становив 5,44 % від сухої маси бактеріальних клітин. Отриманий препарат ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 містив 32,6 % вуглеводів (табл. 1). Слід зазначити, що ЛПС більшості видів роду *Pseudomonas* характеризуються низьким вмістом вуглеводів [18]. Одержаний ЛПС містив значну кількість білка (до ультрацентрифування 37,0 %, після нього 22,0 %). Тобто осадження ЛПС ультрацентрифуванням не дозволило відокремити білок від вуглеводної частини ЛПС. Це свідчить на користь того, що ЛПС і білок у

Таблиця 2

Вплив ліпополісахариду (ЛПС) *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 на частоту спонтанних мутацій у *S. typhimurium*

Доза ЛПС, мкг на чашку	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
	Кількість ревертантів на чашку	Пригнічення, %	Кількість ревертантів на чашку	Пригнічення, %
0,1	33,7±3,7	—	48,0±2,5	—
1,0	39,6±7,4	—	48,6±1,5	—
10,0	36,3±3,2	—	45,5±3,4	—
100,0	38,0±4,4	—	45,7±1,4	—
1000,0	22,3±2,9	31	37,6±1,1	16
Спонтанний фон	36,7±4,8	—	45,8±2,1	—

Примітка. Тут і в табл. 3 відсоток пригнічення не наводиться у разі, коли достовірної різниці між кількістю ревертантів у дослідних і контрольному (спонтанний фон) варіантах не встановлено.



Вплив ліпополісахариду *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 на ріст *S. typhimurium* TA98 (а) і *S. typhimurium* TA100 (б)

зовнішній мембрані складають комплекс. Вміст нуклеїнових кислот в ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 до ультрацентрифугування становив 8,67 %, після — 6,64 %. В ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 містилося 0,56 % КДО.

Геномодельючу активність ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 вивчали, використовуючи бактеріальну тест-систему з ауксотрофними за гістидином штамми *S. typhimurium*. Показником, який засвідчує методичну точність проведення дослідів та якість використаної культури *S. typhimurium*, є спонтанний рівень мутацій. За даними літератури, нормальні межі коливань спонтанного фону мутацій становлять для *S. typhimurium* TA98 від 23 до 85 колоній ревертантів на чашку, для *S. typhimurium* TA100 — від 44 до 94 колоній ревертантів на чашку [20]. Жодного разу при проведенні дослідів

спонтанний фон мутацій не виходив за межі коливань, наведених у літературі.

ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* в дозах від 0,1 до 100 мкг на чашку не впливає на спонтанний фон мутацій обох тест-штамів *S. typhimurium*. У дозі 1000 мкг на чашку він знижував спонтанний фон мутації штаму *S. typhimurium* TA98 на 31 %, а *S. typhimurium* TA100 — на 16 % (табл. 2).

ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 не діяв на ріст *S. typhimurium* при внесенні його до МПА, на якому культивували тест-штами. Кількість колоній обох штамів *S. typhimurium*, що виростили на МПА з різною концентрацією ЛПС та МПА без ЛПС (контроль), була однаковою (рисунок). Тобто антимутагенна активність ЛПС не пов'язана з його токсичним впливом на *S. typhimurium*.

Таким чином, ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens*

Таблиця 3

Вплив ліпополісахариду (ЛПС) *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 на індукований біхроматом калію мутагенез у *S. typhimurium*

Доза ЛПС, мкг на чашку	Доза біхромату, мкг на чашку	<i>S. typhimurium</i> TA98		<i>S. typhimurium</i> TA100	
		Кількість ревертантів на чашку	Пригнічення, %	Кількість ревертантів на чашку	Пригнічення, %
0,1	200	33,7±3,7	—	48,0±2,5	—
1,0	200	39,6±7,4	—	48,6±1,5	—
10,0	200	36,3±3,2	—	45,5±3,4	—
100,0	200	38,0±4,4	—	45,7±1,4	—
1000,0	200	22,3±2,9	31	37,6±1,1	16
200	200				
Спонтанний фон	Спонтанний фон	36,7±4,8	—	45,8±2,1	—

8281 не має мутагенної активності, а у високих концентраціях він зменшує спонтанний фон мутацій обох тест-штамів *S. typhimurium*. Виявлення таких властивостей і стало підставою для подальшого дослідження впливу ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 на індукований мутагенез.

Для проведення дослідів необхідно було підібрати мутаген та його найефективнішу дозу. Як мутаген ми використали біхромат калію, мутагенні властивості якого досить відомі [20]. Для виявлення найефективнішої дози аналізували його мутагенну дію на *S. typhimurium* TA98. Біхромат калію у концентрації 200 мкг на чашку викликав появу найбільшої кількості колоній ревертантів *S. typhimurium* TA98 — 155,6±5,8 колоній на чашку. При збільшенні дози кількість колоній ревертантів зменшувалася, що пов'язано з його токсичним впливом на *S. typhimurium* TA98. Тому в усіх дослідях доза біхромату калію становила 200 мкг на чашку.

В усіх випробуваних концентраціях ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 зменшував частоту мутацій, викликаних у *S. typhimurium* TA98 та *S. typhimurium* TA100 біхроматом калію (табл. 3). Більш активним ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 виявився у досліді з тест-штамом *S. typhimurium* TA98, у якого частота індукованих біхроматом калію мутацій зменшувалася на 57—78 % залежно від концентрації ЛПС. У тест-штаму *S. typhimurium* TA100 спостерігали зменшення частоти виникнення індукованих мутацій на 14—49 %.

З літератури відомо, що полісахаридам інших бактерій також притаманна антимуутагенна активність. При дослідженні такої активності штамів *Bifidobacterium longum* встановлено, що вона пов'язана із здатністю продукувати полісахарид [5].

ЛПС іншого фітопатогенного штаму *P. syringae*

pv. *coronafaciens* 9030 також зменшував мутагенний вплив біхромату калію в тесті Еймса. ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 виявив вищу антимуутагенну активність у порівнянні з ЛПС *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9030.

Антимуутагенні властивості притаманні не лише бактеріальним полісахаридам. Рослинні вуглеводи, а саме — ксилоглюкан, пектини та пектиноподібні полісахариди теж мають подібні ознаки. Вони пригнічують мутагенез, викликаний нітропіреном на 20—50 % в залежності від дози полісахариду. Антимуутагенна активність рослинних полісахаридів пов'язана з їхньою здатністю адсорбувати мутагени [21].

Висновки. Нами встановлено, що ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 проявляє антимуутагенні властивості в бактеріальній тест-системі. Він зменшує частоту спонтанних та індукованих біхроматом калію мутацій у тест-штамів *S. typhimurium*. Антимуутагенна активність досліджуваного ЛПС, можливо, пов'язана з його здатністю перешкоджати проникненню мутагенів до клітин. Питання про механізм антимуутагенної активності ЛПС *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 потребує подальшого вивчення.

L. M. Vashchenko, L. A. Pasichnyk, R. I. Gvozdyak

Influence of *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* lipopolysaccharide on spontaneous and induced by bichromate potassium mutagenesis in *Salmonella typhimurium*

Summary

It has been established that lipopolysaccharides (LPS) are not mutagens. LPS in concentration of 1000 g per plate reduced spontaneous mutations of *S. typhimurium* TA100 by 16 % and *S. typhimurium* TA98 by 31 %. *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 LPS is the antimutagen against bichromate potassium too. LPS can reduce the frequency of induced by bichromate potassium mutations *S. typhimurium* TA98 by 57—78 %, *S. typhimurium* TA100 by 14—

49 %. *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 LPS has neither stimulation nor toxic effect on *S. typhimurium*.

Л. Н. Ващенко, Л. А. Пасичник, Р. И. Гвоздяк

Влияние липополисахарида *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* на спонтанные и индуцированные бихроматом калия мутации у *Salmonella typhimurium*

Резюме

Установлено, что липополисахарид (ЛПС) *P. syringae* pv. *atrofaciens* 8281 в дозе 1000 мкг на чашку уменьшает частоту спонтанных мутаций *S. typhimurium* TA98 на 31 %, *S. typhimurium* TA100 — на 16 %. Исследуемый ЛПС проявил антимутагенные свойства и по отношению к индуцированным бихроматом калия мутациям. Частота таких мутаций уменьшалась в зависимости от дозы ЛПС на 57–78 % у тест-штамма *S. typhimurium* TA98 и на 14–49 % — у *S. typhimurium* TA100.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Лукаш Л. Л. Мутагенез і антимутагенез — протилежно спрямовані процеси, що визначають рівень генетичної мінливості та стабільності // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 6.—С. 500—511.
- Мусіяка В. К. Антимутагенні властивості препаратів природного походження // Физиология и биохимия культур растений.—2001.—33, № 3.—С. 216—225.
- Воробьева Л. И., Абилов С. К. Антимутагенные свойства бактерий // Прикл. биохимия и микробиология.—2002.—38, № 2.—С. 115—127.
- Воробьева Л. И., Чердынцова Т. А., Абилов С. К. Антимутагенное действие культуральной жидкости бактерий на мутагенез у штаммов *S. typhimurium*, индуцированный 2-нитрофлуореном // Генетика.—1995.—31, № 7.—С. 901—907.
- 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.—44, N 11.—P. 1029—1036.
- Мусіяка В. К., Гладун Г. О., Сарнацька В. В., Гвоздяк Р. І. Антимутагенна активність штамів *Saccharomyces cerevisiae* // Биополимеры и клетка.—2000.—16, № 4.—С. 284—288.
- Линдер А. В., Кабулова Ф. Д., Чернин Л. С., Исмаилов З. Ф. Биоэкологические аспекты взаимодействия почвенных микроорганизмов с эукариотами // Докл. Междунар. экол. конгр. «Новое в экологии и безопасности жизнедеятельности» (Санкт-Петербург, 14—16 июня 2000 г.).—Санкт-Петербург, 2000.—Т. 2.—С. 395—397.
- Яковлева Л. М. Роль гликополимеров бактерий в патогенезе бактериозов растений // Микробиол. журн.—1992.—54, № 3.—С. 87—98.
- Варбанец Л. Д., Шмалько Ю. П., Придатко О. Е., Жукова Е. В., Москаленко Н. В. Биологическая активность липополисахарида *Pseudomonas solanasearum* // Микробиол. журн.—1995.—57, № 2.—С. 80—85.
- Vaara M. Lipopolysaccharide and the permeability of the bacterial outer membrane // Endotoxin in health and disease / Eds H. Brade et al.—New York; Basel: Marcel Dekker, Inc., 1999.—P. 31—38.
- 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.—44, № 4.—С. 65—70.
- Захарова И. Я., Косенко Л. В. Методы изучения микробных полисахаридов.—Киев: Наук. думка, 1982.—189 с.
- Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem.—1951.—133, N 1.—P. 265—275.
- Спирин А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия.—1958.—23, № 5.—С. 330—339.
- Ames B. N., McCann J., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella/mammalian* — microsome mutagenicity test // Mutat. Res.—1975.—31.—P. 347—364.
- McCann J., Spingarn N. E., Kobori J., Ames B. N. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1975.—72, N 3.—P. 979—983.
- Пасичник Л. А., Королева И. Б. *P. syringae* pv. *atrofaciens* — возбудитель бактериальной пятнистости ржи на Украине // Микробиол. журн.—1991.—53, № 2.—С. 49—55.
- Захарова И. Я., Танатар Н. В. Липополисахариды бактерий рода *Pseudomonas* // Микробиол. журн.—1984.—46, № 6.—С. 78—92.
- Журков В. С., Дуган А. М. Анализ спонтанного фона мутирования у *Salmonella typhimurium* // Гигиена и санитария.—1991.—№ 1.—С. 70—71.
- Калинина Л. М., Минсеитова С. Р. Мутагенное и ДНК-повреждающее действие бихромата калия в клетках *Escherichia coli* // Генетика.—1983.—19, № 12.—С. 1941—1947.
- Hensel A., Meier K. Pectins and xyloglucans exhibit antimutagenic activities against nitroaromatic compounds // Planta Med.—1999.—65, N 5.—P. 395—399.

УДК 577.114:575.224
Надійшла до редакції 29.05.03