

Ispitivanje uticaja žuči na patogenost bakterije *Pseudomonas syringae* na pasulju

Pseudomonas syringae je fitopatogena bakterija koja na mnogim biljkama izaziva pegavost i nekrozu listova, grana i plodova. U ovom istraživanju ispiti- van je uticaj žuči na patogenost ove bakterije na pasulju. Bakterija je izolovana iz bašte sa pasuljem i tretirana je 4% i 8% rastvorima žuči. Za ispitiva- nja patogenosti bakterija korišćeno je seme pasulja sorte tetovac. Naklijala semena su bila podeljena u 4 grupe. Prva grupa je inokulisana bakterijskim suspenzijama koncentracije 105 ćelija/mL u kojoj je koncentracija žuči bila 4%, dok je u drugoj grupi koncentracija žuči u suspenziji iznosila 8%. Poziti- vnu kontrolu su činila semena inokulisana čistom ba- kterijskom suspenzijom koncentracije 105 ćelija/mL, dok je negativna kontrola bila neinokulirana. Biljke su se čuvale na 24°C, u teglicama preko kojih su navučene plastične kese naprskane vodom u cilju povećanja vlažnosti. Patogenost je ocenjivana 3, 5. i 8. dana posle inokulacije (pre nego što su kotile- doni propali), pregledom ravne unutrašnje strane kotiledona, radi utvrđivanja prisustva masnih pega na mestu inokulacije. Konstatovano je postojanje bakteriostatskog efekta žuči na bakteriju *P. syri- ngae*, ali nije bilo moguće zaključiti da li je žuč izazvala promenu patogenih svojstava bakterije ili aktivirala pojedine odbrambene mehanizame biljke u borbi protiv patogena.

Uvod

Pseudomonas syringae je široko rasprostranjena i ekonomski štetna bakterija, parazit brojnih drve- nastih i zeljastih biljaka. U godinama sa prohladnim i kišovitim prolećem, u Vojvodini su beleženi sluča-

jevi potpunog propadanja useva boranije i pasulja (Balaž 1989). Ova bakterija može izazivati oboljenja kod biljaka, ali se može naći na površini zdravih listova kao epifita (Hirano i Upper 2000). Patogeni sojevi *Pseudomonas syringae* prouzrokuju pegavost i nekrozu listova, grana i plodova, plamenjaču i rak- rane biljaka (Arsenijević 1988).

Niže temperature povećavaju osetljivost biljke što omogućava bakterijama da dospeju unutar biljnih ćelija. Wharton (1967) navodi da je jedno zaraženo seme u 1000 dovoljno da izazove epifitociju u polju. Iz obolele biljke, bakterija dospeva u seme kroz zid mahune. Kada ova fitopatogena kultura dospe u bilj- ku, ona se razmnožava u intercelularnim prostorima gde produkuje fitotoksin siringomicin, koji uništava ćelijske membrane biljnih ćelija. Prenosi se kroz biljku kroz elemente ksilema do mladih listova. Na mestu infekcije, na mladom, zelenom lišću nastaju sitne pege vlažnog izgleda. One se povećavaju, spa- jaju i postaju mrke, a oko njih formira žućkasta zona. Na mahunama su u početku sitne masne pege. One se povećavaju i tkivo u okviru njih izumire i pos- taje mrko. U uslovima vlažnog vremena na ovakvim pegama uočava se beličasta kap bakterijskog ekskudata (Arsenijević 1988). Zaraženo lišće pasulja je osnovni izvor inokuluma za ovu fitopatogenu kul- turu.

Pseudomonas syringae je filozofna bakterija, i istraživanja vezana za ovakve bakterije imaju kome- rcijalni značaj za agroindustriju iz dva razloga. Prvo, razumevanje opstanka fitopatogenih gljiva i bakterija je osnovno za razvijanje novih metoda kontrolisanja njihovog širenja. Drugi razlog je porast trovanja sve- žim, nekuvanim voćem i povrćem kontaminiranih bakterijom *Salmonella* i *E. Coli* O157:H7. Razvi- janje efektivnijih metoda dekontaminacije bi pomo- glo zdravlju ljudi.

Živojin Jevtić (1991), Lazarevac, Dositeja Obradovića 13, učenik 4. razreda Gimnazije Lazarevac

MENTOR: Jelena Savić, dipl. biolog

Žuč, produkt jetre mnogih vertebrata, učestvuje u procesu varenja lipida u tankom crevu. Akumulira se u žučnoj kesi odakle se luči u dvanaestopalačno crevo. Soli žučnih kiselina su površinski aktivna jedinjenja koja deluju kao emulgatori masti u vodenoj sredini, omogućavajući bolji kontakt lipaze sa emulgovanim masnim česticama, olakšavajući varenje. Smatralo se da je letalni uticaj žuči na mikroorganizme u čoveku mali, čak zanemarujući, zbog in vitro podataka koji pokazuju da je većina konjugovanih soli manje baktericidna od nekonjugovanih žučnih kiselina. Međutim, Floch i saradnici (1972) pokazuju da žuč ima bitan negativan uticaj na preživljavanje bakterijskih sojeva *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens* i *Lactobacillus*. Preživljavanje bakterija zavisi od koncentracije nekonjugovanih žučnih kiselina (Floch *et al.* 1972). Deoksiholna i henodeoksiholna kiselina su inhibirale rast kolonija pri koncentracijama 1 i 2 mM, a holna kiselina na koncentraciji 5 mM. Stres koji žuč izaziva kod mikroorganizama zavisi od koncentracije žuči koja varira u svakom odeljku gastrointestinalnog trakta tokom vremena. Posle obroka, koncentracija soli žučnih kiselina u dvanaestopalačnom crevu raste do 15 mmol/L, u tankom crevu ova koncentracija iznosi 10 mmol/L, dok u debelom crevu koncentracija opada do 4 mmol/L. Soli žučnih kiselina su u in vivo uslovima povezane sa fosfolipidima što umanjuje njihovo antibakterijsko dejstvo (Marteau *et al.* 1997).

Inagaki i saradnici (2006) navode drugačiji, indirektni bakteriostatski mehanizam, gde aktivacija membranskog farnezoidskog X receptora (FXR, receptor za žučne kiseline) onemogućava proliferaciju bakterija u mukozi crevu. FXR je član grupe steroidno-tiroidnih hormona koji su transkripcioni faktori i aktiviraju se od strane holne i deoksiholne kiseline. Produkti nekoliko humanih gena koje reguliše FXR, uključujući iNoS i IL18, su osnova antimikrobne aktivnosti žuči u crevnom traktu (Inagaki *et al.* 2006). Azot-monoksid, produkt indukovane NO sintetaze (iNoS), ima direktan antibakterijski uticaj, dok proinflamatorni citokin IL18 omogućava ljudima rezistentnost na čitav niz patogena uključujući i intracelularne i ekstracelularne bakterije (Inagaki *et al.* 2006). Pomenuti receptor, kao i odgovarajući geni čiju ekspresiju reguliše, ne postoje kod biljaka, ali je pretraga bioloških baza podataka ukazala da postoje biljni proteini slične strukture (kao slični FXR: CBI21966 i CAN60804; odnosno NP_001061346

kao predstavnik proteina sličnih iNOS) koji možda imaju efekat na pojačanje odbrambenih mehanizama biljaka.

Dva navedena efekta žuči na patogenost bakterija, inhibitorni efekat žučnih kiselina na rast kolonija i FXR-zavisna odbrana ćelija od bakterija, osnov su za ispitivanje uticaja žuči na patogenost bakterije *Pseudomonas syringae*.

Materijal i metode

Ispitivanje uticaja žuči na patogenost bakterije *Pseudomonas syringae* podrazumevalo je izolovanje čiste bakterijske kulture, njeno tretiranje sterilnom žuči i proveru patogenosti tretiranih bakterija na pasulju.

Izolovanje čiste kulture *Pseudomonas syringae*

Standardnom metodom brisa sakupljeni su uzorci sa pet listova pasulja iz bašte u okolini Istraživačke Stanice Petnica. Pri tome su izabrane biljke sa simptomima koji ukazuju na zaraženost kulturom *Pseudomonas syringae*, a to su pegavost i nekroza listova. Uzorci su ostavljeni na inkubaciju u LB (Knežević i Simić 2006) preko noći. Kada su se razvile prekonocne kulture, bakterije sa svih 5 uzoraka presejavane su na 5 Petri-kutija sa poluselektivnom hranljivom podlogom *Pseudomonas Isolation Agar*, (Becton, Dickinson and Company), radi izolacije bakterija roda *Pseudomonas*. Zasejane bakterije su ostavljene na inkubaciju 4 dana na 29°C. Nakon inkubacije, u jednoj Petri-kutiji je došlo da razvijanja kolonije *Pseudomonas*, koja je pod UV lampom bila fluorescentna. Dobijena kolonija je presejana na MSP podlogu (Modified Sucrose Peptone Agar) u 5 petri kutija. MSP podloga je napravljena prema recepturi: 20 g saharoze, 5 g Peptona 4, 0,5 g K₂HPO₄, 0,25 g MgSO₄×7H₂O i 20 g agara se rastvori u 1000 mL destilovane vode, rastvor se sterilise u autoklavu 20 min na 121°C i nakon hlađenja podloge do 50°C u nju se dodaje 10 mg vankomicina i 1 mL bromitol-plavog (15mg/mL u 95% etanolu). Zasejane Petri-kutije su stavljene 3 dana na inkubaciju u termostatu na 29°C.

Bakterijske kulture na MSP podlozi su se razvile posle 3 dana, pri čemu se pokazalo da izolati stvaraju levane. Katalaza testom je utvrđeno da je izolovana kultura na MSP podlozi katalaza-pozitivna. Zasejane

su prekonocne kulture sa MSP podloge, koje su pre-sejavane na želatin-agar (Knežević i Simić 2006), da bi se nakon 24 h pokazalo da ova bakterijska kultura hidrolizuje želatin, kao i na Kingov B kosi agar u 5 epruveta (Lelliot i Stead 1987). Izolati su nakon razvijanja kolonija pokazali fluorescentnost pod UV svetlošću. Na osnovu fluorescentnosti, formiranja levana, katalaza-pozitivne reakcije i hidrolize želatina utvrđeno je da se radi o kulturi *Pseudomonas syringae* (Arsenijević 1988). Za dalja proučavanja korišćen je izolat sa Kingovog B kosog agra.

Tretiranje kulture *Pseudomonas syringae* sterilnom žuči

U toku oglada je korišćena svinjska žuč dobavljena iz lokalne klanice u Divcima. Žučna tečnost je u sterilnim uslovima iz žučne kese izvučena špricom. Prekonocna kultura presađena sa Kingovog B kosog agra je tretirana sterilnom žuči, tako što je žuč bila pipetirana u LB podloge. Koncentracija žuči u LB podlozi sa bakterijama u prve dve epruvete je iznosila 4% i 8% (Marteau *et al.* 1997). U trećoj epruveti je bila prekonocna kultura bez prisustva žuči. Nakon inkubacije prekonocnih kultura, urađena su decimalna razblaženja (Knežević i Simić 2006) do koncentracije 105 ćelija/ml. Dobijene su 3 nove epruvete sa 4% i 8% žuči, i treća bez žuči, u kojoj je koncentracija bakterijske suspenzije bila reda 105 ćelija/mL.

Provera patogenosti bakterija na pasulju

Za ispitivanja patogenosti korišćeno je seme pasulja sorte tetovac. Semena su ostavljena u vodi preko noći. Nabubrela semena su zasađena u humusnu zemlju u teglicama i održavana su 4 dana do klijanja. Inokulacija klijanaca vršena je ubodom u kotiledon, u koji je pomoću sterilne igle mikro-

pipetom inokulisano po 5 µL bakterijske suspenzije 105 ćelija/mL (Arsenijević 1988). Inokulacija je vršena u 3 grupe od po 6 semena. U prvoj grupi naklijalih semena inokulacija je vršena bakterijskom suspenzijom sa 4% žuči, dok je u drugoj grupi bakterijskom suspenzijom sa 8% žuči. Za pozitivnu kontrolu je korišćena bakterijska suspenzija bez prisustva žuči, a negativna kontrola je rađena ubodom bez bakterijske kulture (Balaž *et al.* 2008). Kod provere patogenosti bakterija prouzrokovala pegavosti lišća i stabljike obično se koristi klasična vlažna komora ili polivinilsko platno, a mogu i plastične kese korisno poslužiti. (Arsenijević, 1988). Inokulisane biljke su se čuvale na 24°C, u teglicama preko kojih su navučene plastične kese naprskane vodom u cilju povećanja vlažnosti. Patogenost je ocenjena 3, 5 i 8 dana posle inokulacije (pre nego što su kotiledoni propali), pregledom ravne unutrašnje strane kotiledona, radi utvrđivanja prisustva masnih pega na mestu inokulacije. Biljke su fotografisane tokom pregledanja kotiledonih listića.

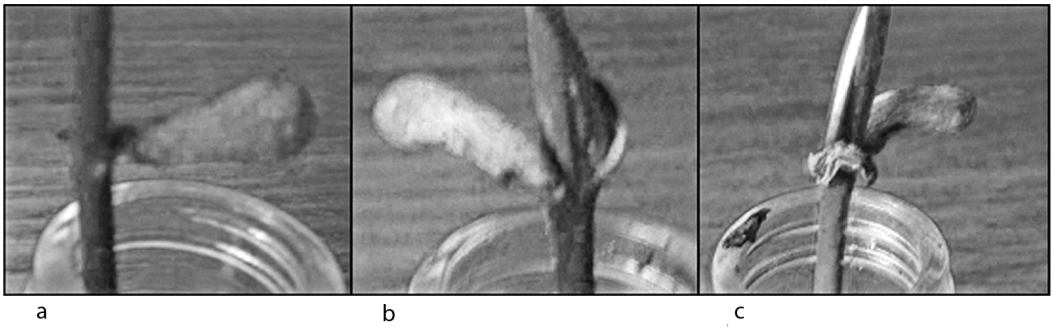
Rezultati i diskusija

Pojava masne pegavosti u grupama biljaka koje su tretirane bakterijama (slika 1) ukazala je na uspešno inokulisanje bakterijskih suspenzija u kotiledone, tj. do proliferacije bakterijskih kolonija u biljnom tkivu. Do pojave pega na kotiledonima nakon 3 dana od inokulisanja došlo je samo u biljkama tzv. pozitivne kontrole (tabela 1).

Pegavost je zapažena posle 5 dana i kod biljaka inokuliranih bakterijskim suspenzijama sa 4% i 8% žuči (tabela 1). Pojava masne pegavosti je bila evidentna, što se može objasniti relativno niskim koncentracijama žuči (iako fiziološkim; prema Marteau *et al.* 1997) u bakterijskim suspenzijama. Izabrane koncentracije žuči jesu usporile zaražavanje biljaka i proliferaciju bakterija u biljnim tkivima, ali

Tabela 1. Pojava pegavosti na kotiledonima. Plus (+) označava pojavu pega, dok minus (-) označava odsustvo pega

	3. dan	5. dan	8. dan
Biljke inokulirane bakterijskom suspenzijom bez žuči	+	+	+
Biljke inokulirane bakterijskom suspenzijom sa 4% žuči	-	+ / -	+ / +
Biljke inokulirane bakterijskom suspenzijom sa 8% žuči	-	+ / -	+ / +
Neinokulirane biljke	-	-	-



Slika 1. Izgled kotiledona nakon osam dana od inokulacije: a. neinokulisana biljka; b. biljka inokulisana bakterijskom suspenzijom sa 4% žuči; c. biljka inokulisana bakterijskom kulturom bez žuči

Figure 1. Appearance of cotyledons after eight days from inoculation: a. uninoculated plant; b. plant inoculated with the 4% bile bacterial suspension; c. plant inoculated with the bacterial culture without bile

je nisu sprečile. Efekat žuči na *Pseudomonas syringae* mogao bi se stoga opisati kao bakteriostatski, a ne baktericidan. U grupama tretiranim suspenzijama sa žuči bilo je i biljaka koje nisu imale simptome zaraženosti bakterijom *Pseudomonas syringae* posle petog dana (tabela 1) – procenat „nezaraženih” biljaka u obe grupe iznosio je 33%. Ovim eksperimentom nije bilo moguće ustanoviti da li je žuč ubila bakterije ili je indirektno smanjila njihovu patogenost povećavajući sposobnost odbrane biljaka.

Nakon 8 dana kotiledoni neinokulisanih biljaka ostali su vezani za biljku i tek su malo sasušeni (slika 1 a). Sa druge strane, kotiledoni biljaka drugih grupa su se sasušili (slike 1 b i 1 c). Kotiledoni kod pozitivne kontrole su u većini slučajeva otpali.

Zaključak

Rezultati dobijeni ovim istraživanjem ukazuju na postojanje bakteriostatskog efekta žuči na fitopatogenu bakteriju *Pseudomonas syringae*. Na osnovu sprovedenog istraživanja ne može se zaključiti da li korišćene koncentracije žuči izazivaju negativne promene u patogenim sposobnostima bakterije ili pozitivne promene u sposobnosti biljaka da se odbrane od patogena. Neophodno je ponoviti istraživanje sa višim koncentracijama žuči u bakterijskim podlogama radi preciznijeg opisa uticaja žuči na patogenost bakterija, kao i uticaja na samu biljku.

Literatura

- Arsenijević M. 1988. *Fitopatogene bakterije*. Beograd: *Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu*
- Balaž J. 1989. Bakteriološke karakteristike i fiziološke rase *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola (Burkholder) Young, Dye et Wilkie u Jugoslaviji. *Zaštita bilja*, **40** (2): 187.
- Balaž J., Popović T., Vasić M., Nikolić Z. 2008. Razrada metoda za dokazivanje *Pseudomonas savastanoi* pv. Phaseolicola na semenu pasulja; *Pestic. fitomed*, (Beograd), **23** (1): 81.
- Floch M. H., Binder H. J., Filburn B. S., William Gershengoren W. 1972. The effect of bile acids on intestinal microflora. *American Journal of Clinical Nutrition*, **25**: 1418.
- Hirano S. S., Upperr C. D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* pathogen nucleu, andepiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. Sep.*, **64** (3): 624.
- Hwang M. S. H., Morgan R. L., Sarkar S. F., Wang P. W., Guttman D. S. 2005. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71** (9): 5182.
- Inagaki T., Moschetta A., Lee Y. K., Peng L., Zhao G., Downes M., Ruth T. Y., Shelton J. M., Richardson J. A., Repa J. J., Mangelsdorf D. J., Kliewer S. A. 2006. Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *PNAS*, **103** (10): 3920.

Knežević J., Simić D. 2006. *Metode u mikrobiologiji*. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Lelliott R. A., Stead D. E. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. U *Methods in Plant Pathology* (vol. 2). Oxford: Blackwell, str. 216.

Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. 2005. *Biology of Microorganisms* (11th Edition). New York: Prentice-Hall

Marteau P., Minekus M., Havenaar R., Huis In't Veld J. H. J. 1997. Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the Effects of Bile. *Journal of Dairy Science*, **80** (6): 1031.

Wharton A. C. 1967. Detection of infection by *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson in white seeded dwarf bean seed stocks. *Ann. Appl. Biol.*, **60** (2): 305.

Živojin Jevtić

The Effect of Bile on Pathogenic Abilities of Bacterium *Pseudomonas syringae* in White Bean

Pseudomonas syringae is a phytopathogenic bacterium that causes maculation and necrosis of leaves, branches and fruits on many plant species. The influence of bile on the pathogenicity of these bacteria was investigated in bean. The bacteria were isolated from a garden with beans in the vicinity of Petnica Science Center and treated with 4% and 8% solutions of bile. White bean seeds were used for the test of pathogenic abilities of bacteria. Swollen seeds were divided into 4 groups. The first group of seeds was inoculated with 105 cell/ml bacterial suspension in which the concentration of bile was 4%, while in the second group the concentration of bile in the suspension was 8%. The positive control consisted of seeds inoculated with pure bacterial suspensions (105 cell/ml concentration), while the negative control was not inoculated. Plants were kept at 24°C in jars which were surrounded by plastic bags sprinkled with water on the internal surface, to increase humidity. Pathogenicity was evaluated 3, 5 and 8 days after inoculation (before the cotyledons failed), reviewing the flat inner side of cotyledons, in order to determine the presence of fatty flecks at the site of inoculation. The existence of bacteriostatic effect of bile on the bacterium *Pseudomonas syringae* was noted, but it was not possible to conclude whether the bile had changed the pathogenic properties of bacteria, or had activated some plant defense mechanisms against pathogens.

