

ORIGINAL ARTICLE

**INTERACTION OF *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* WITH POTATO
PLANTS IN VITRO**

Markova Yu.A.,^{1*}, Romanenko A.S.,¹ Klimov V.T.,², Thesnocova M.V.²

¹ *Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk,*

² *Antiplague Research Institute, Irkutsk*

tel.: (395-2)42-50-09, fax: (395-2)51-07-54, e-mail: jul@sifibr.irk.ru

* Correspondance and reprints

Received September 5, 2005

Abstract - The inoculation of the radical part of potatoes plants in tubes with bacteria *Yersinia pseudotuberculosis* pathogenic for human led to stem and leaf tissue colonization. At the same time visible symptoms were negligible. After isolation from plants bacteria maintained their pathogenic characteristics. The results obtained confirm the view that plants can be tanks of microorganisms pathogenic for human.

Key words: Yersinia pseudotuberculosis/ plants of a potato in vitro/ Factors of pathogenicity

ORIGINAL ARTICLE

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* С ПРОБИРОЧНЫМИ РАСТЕНИЯМИ КАРТОФЕЛЯ

Маркова Ю.А.¹, Романенко А.С.¹, Климов В.Т.², Чеснокова М.В.²

¹ Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН. 664033 Иркутск, а/я 1243, ул. Лермонтова, 132

² Научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047 Иркутск, ул. Трилиссера, 78

tel.: (395-2)42-50-09, fax: (395-2)51-07-54, e-mail: jul@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 5 сентября 2005 г.

Инокуляция прикорневой части пробибочных растений картофеля патогенной для человека бактерией *Yersinia pseudotuberculosis* приводила к колонизации ею стеблевых и листовых тканей. В то же время, внешние симптомы были незначительными. После выделения из растений бактерии сохраняли свои патогенные свойства. Полученные результаты подтверждают мнение о том, что растения могут быть резервуарами микроорганизмов, патогенных для человека..

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis* / пробибочные растения картофеля / факторы патогенности

В последнее время изучение взаимодействия патогенов с нетрадиционными хозяевами привлекает все больше сторонников (Тимченко и др., 2000, Тап, 2002). В частности, у нас в стране и за рубежом значительно увеличился интерес к такой необычной теме, как попадание в растения патогенных для человека микроорганизмов и возможная последующая их передача человеку.

Современное исследование этой проблемы можно разделить на следующие направления.

1. Сравнительное изучение процессов патогенеза. Было показано, что некоторые факторы вирулентности патогенных бактерий (Cao et al., 2001, Josenhans, Suerbaum, 2002, Kempf et al., 2002, Plotnikova et al., 2000, Rahme et al., 2000, Van Gijsegem et al., 1993) и способы защиты от них растений и животных имеют общие черты (Keen et al., 2000, Menezes, Jared 2002, Staskawicz et al., 2001, Taylor, 1998).

2. Исследования, направленные на изучение циркуляции патогенных микроорганизмов во внешней среде. Зарегистрирована возможность проникновения патогенных для человека микроорганизмов в ткани различных органов растений через корневую систему, устьица или повреждения из зараженной почвы (воды) и накопления их в высоких концентрациях (Литвин и др., 1996, Литвин и др., 1998, Solomon et al., 2002, Takeuchi et al., 2001, Wachtel et al., 2002,

Warriner et al., 2003), не подвергаясь воздействию дезинфектантов (Burnett, Beuchat, 2002, Burnett et al., 2000), причем семена таких растений были также частично заражены (Cooley et al., 2003).

3. Выявление связи между бактериальным загрязнением фруктов и овощей и заболеваемостью кишечными инфекциями (Tschäpe et al., 1995). Предложен термин «фитонозы» для болезней, передающихся от растений к человеку (Van der Riet, 2000); автор в эту группу включил микоплазмоподобные организмы, вирусы, вириды и прионы.

Все это дает основания говорить о важности представленной проблемы, так как изучение механизмов патогенеза с учетом разных организмов - хозяев, выяснение связи патогенных и условно-патогенных бактерий с растениями во внешней среде, изменения их свойств при взаимодействии с растительным организмом и возможной опасности для человека позволят найти новые подходы к контролю заболеваний (Bernie et al., 2003, Rahme et al., 1997).

Исследованиями, проведенными в СИФИБР СО РАН направленными на выявление условно-патогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* показано их наличие в тканях ряда дикорастущих и культурных растений. Нами было выделено 52 штамма микроорганизмов, относящихся к 11 видам исследуемого семейства

(Маркова и др, 2002, Маркова и др, 2004). Цель данной работы состояла в экспериментальном подтверждении проникновения в ткани растения патогенной для человека бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* в сопоставлении с сохранением факторов патогенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментального доказательства попадания не фитопатогенных микроорганизмов в растительный организм были проведены опыты по заражению выращиваемых в асептических условиях на твердой агаризованной МС-среде с добавлением гормонов и витаминов (Бутенко и др, 1984) 7-дневных пробирочных растений картофеля следующих сортов - устойчивого к фитопатогенам (Луговской) и восприимчивого (Домодедовский). Для заражения использовали типичный по культурально-биохимическим свойствам штамм *Yersinia pseudotuberculosis*, 0:1b серовара, содержащий две плазмиды – криптическую рVM 82 MDa и вирулентности рYV 47 MDa, а также несущий хромосомный ген токсина суперантигена urm_a .

Влияние бактерий на растительный организм определяли с помощью морфометрического анализа, измеряя прирост пробирочных растений, количество листьев. Кроме того, проводили визуальную оценку возникающих симптомов заболевания. Длительность эксперимента составляла 18 дней.

Пробирочные растения длиной $7 \pm 0,38$ см заражали суспензией *Y. pseudotuberculosis* в концентрации 10^2 и 10^4 м.к./мл. Микробную суспензию наносили непосредственно на стебель, у его основания, предварительно повредив эпидермис. Контролем служили растения, инокулированные аналогичным способом только средой для выращивания иерсиний. В каждом варианте использовали по 10 растений, результаты обрабатывали статистически.

Y. pseudotuberculosis определяли бактериологическим методом и ПЦР-анализом. Для бактериологического исследования листья у прикорневой зоны и верхушечную часть стебля с двумя листочками предварительно промывали трижды стерильным физиологическим раствором с последующей обработкой 70° спиртом, заливали забуференным физиологическим раствором и помещали в холодильник при $+4-6^\circ\text{C}$. Высевы осуществляли на 7 и 21 сутки на пластинчатый казеиново-дрожжевой агар и среду с бромтимоловым синим. Посевы инкубировали в термостате при 28°C в течение 48 часов. Подсчет и идентификацию выросших колоний

проводили общепринятыми методами (Инструкция..., 1990).

Пробы растений в физиологическом растворе исследовали в ПЦР. ДНК выделяли гуанидинизотиоцианатным методом набором фирмы «Медиген» (Новосибирск). Использовали две пары праймеров: Yers 1 и Yers 2 к плазмидному гену, детерминирующему пили адгезии (Skurnik, Wolf-Watz, 1989) и Inv 1 и Inv 2, гибридуемые с фрагментом гена инвазивности (*inv*), локализованного в хромосоме (Nakajima et al., 1992). Размер амплифицируемых фрагментов составлял соответственно 518 н.п. и 295 н.п. Состав реакционной смеси, программы амплификации и учет результатов описаны нами ранее (Шурыгина и др., 2003).

Патогенные свойства, выделенного из растений *Y. pseudotuberculosis* определяли путем выявления аутоагглютинабельности на бульоне Хоттингера при 22°C и 37°C и потребности в Ca^{2+} , который необходим для роста вирулентных штаммов (Portnoy, 1985).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние заражения *Y. pseudotuberculosis* на уровень прироста растений картофеля представлено на рис 1 и 2. Видно, что заражение как устойчивого, так и восприимчивого к фитопатогенам сортов, независимо от концентрации *Y. pseudotuberculosis*, приводило к незначительному снижению прироста в длину стеблей картофеля.

Внешние симптомы как у устойчивого, так и у восприимчивого сортов практически отсутствовали. Можно указать только на скручивание листьев в опытных вариантах относительно контроля.

Микробиологический анализ растительных тканей показал проникновение бактерий внутрь и миграцию их в апикальную часть стебля и листьев (табл.). Причем этот процесс был более интенсивным у восприимчивого сорта.

Выделенные из растений штаммы *Y. pseudotuberculosis* по своим фено- и генотипическим характеристикам не отличались от исходных штаммов. У них обнаруживали плазмидный ген адгезии *yad A* и хромосомный ген инвазии *inv* (рис. 3). Колонии бактерий, выделенных из обоих сортов картофеля, проявляли выраженную аутоагглютинабельность при 37°C и отсутствие таковой при 22°C и Ca^{2+} -зависимость, что характерно для патогенных штаммов.

Таблица Инфицирование in vitro растений картофеля *Y.pseudotuberculosis*

Части растения	Количество растений, инфицированных в дозе (м.к./мл):		Количество колоний бактерий после высева через:			
	10 ²	10 ⁴	7 сут		21 сут	
			10 ²	10 ⁴	10 ²	10 ⁴
Сорт Домодедовский (восприимчивый к фитопатогенам)						
Листья у прикорневой части	2	2	#*	#	#	#
	2	2	#	#	#	#
	2	2	#	#	#	#
	2	2	#	#	#	#
Верхушка стебля с листьями	3	3	2	6	#	#
	3	3	-**	2	#	#
	3	3	#	#	#	#
Сорт Луговской (устойчивый)						
Листья у прикорневой части	2	2	#	#	#	#
	2	2	7	10	#	#
	2	2	13	#	#	#
Верхушка стебля с листьями	3	3	-	2	#	#
	3	3	2	4	#	#
	2	3	-	1	-	7
	2	2	-	3	-	15

* - сплошной рост; ** - нет колоний.

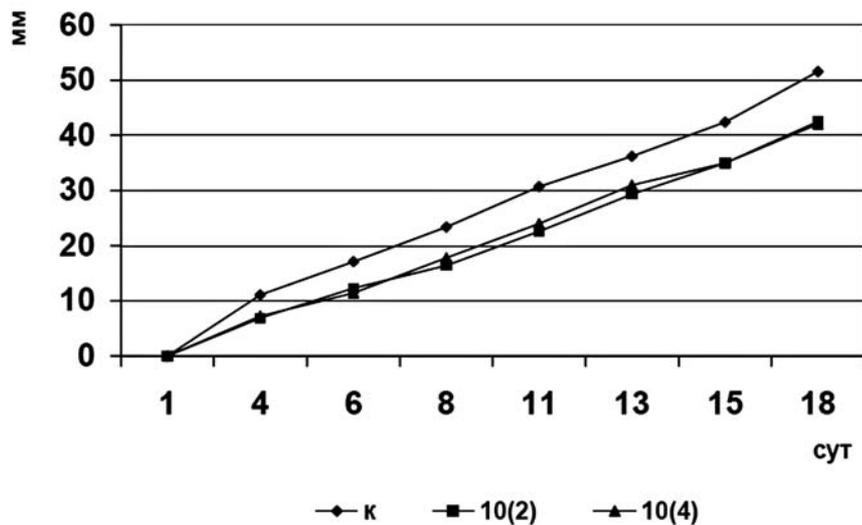


Рис. 1. Влияние разных концентраций *Yersinia pseudotuberculosis* на прирост пробирочных растений картофеля устойчивого к фитопатогенам сорта (Луговской).

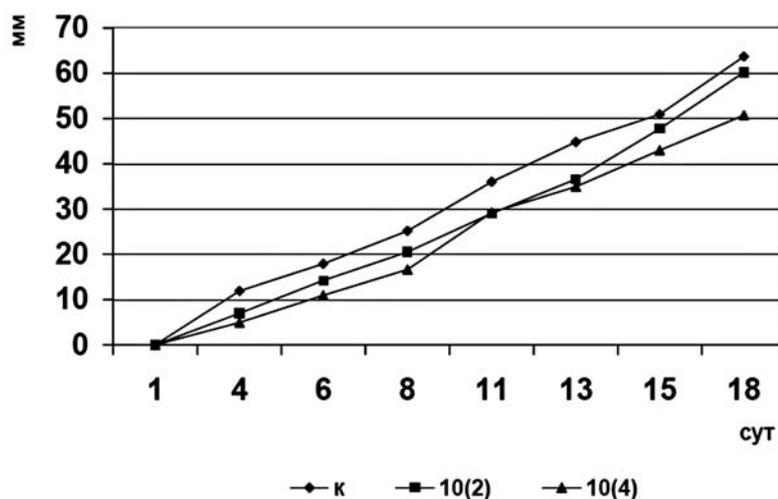


Рис. 2. Влияние разных концентраций *Yersinia pseudotuberculosis* на прирост пробирочных растений картофеля восприимчивого к фитопатогенам сорта (Домодедовский).

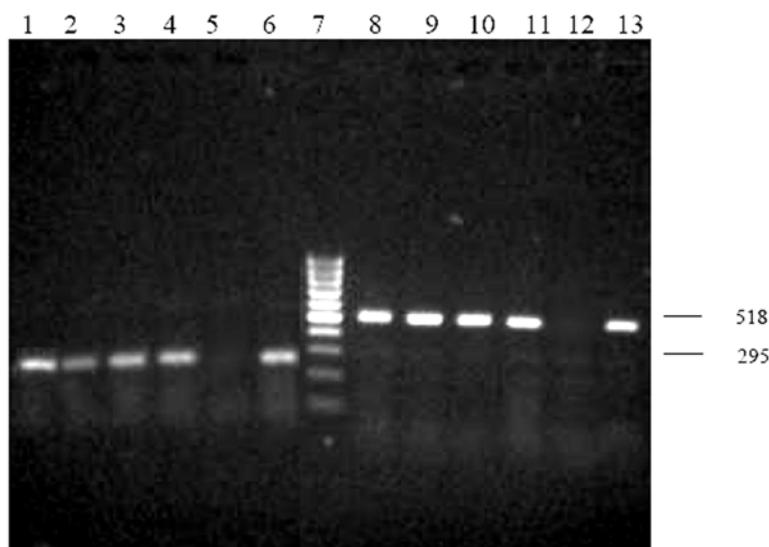


Рис. 3. Результаты ПЦР-анализа контаминированных *Y. pseudotuberculosis* растений: 1,2,3,4 - праймеры Inv 1, Inv 2; 8,9,10,11 – праймеры Yers 1, Yers 2; 5, 12 – отрицательный контроль; 6, 13 – положительный контроль; 7- маркер молекулярного веса ДНК 100-1000 п.н.

ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперименты L. Rahme (Rahme et al., 2000), проведенные на *Pseudomonas aeruginosa*, свидетельствуют о том, что эта бактерия способна поражать не только теплокровных животных и человека, но также и растения. Это демонстрирует универсальность ее механизмов вирулентности.

В нашей работе, мы также ожидали увидеть внешние проявления заражения, тем более что был использован вирулентный штамм *Yersinia pseudotuberculosis*. Однако четких отличий между контрольными и опытными растениями не было выявлено. Некоторое снижение прироста, скорее всего, свидетельствует о наличии конкуренции за источник питания. Тем не менее, согласно

другим нашим экспериментам по заражению пробирочных растений картофеля суспензией *Morganella morganii* были выявлены некрозы и задержка прироста, а *Escherichia coli*, наоборот, вызвала увеличение междоузлий и, тем самым, стимуляцию прироста (Маркова и др., 2004). Следует отметить, что симптомы были значительно слабее симптомов, вызванных фитопатогенной бактерией *Erwinia carotovora sbsp. atroseptica*.

В то же время, нашими исследованиями было показано, что патогенные бактерии (*Yersinia pseudotuberculosis*) не локализируются в точке заражения, а способны распространяться по всему растению. Это свидетельствует о возможности попадания их в плоды и семена и последующей передаче по пищевой цепи.

Обнаружение факторов вирулентности иерсиний после их пассирования через растительный организм подтверждает сохранение инфекционного потенциала этого микроорганизма.

Таким образом, патогенные для человека бактерии способны проникать в ткани растительного организма и колонизировать их, не вызывая при этом четко выраженных симптомов заражения, но сохраняя свою вирулентность. Это указывает на возможный риск заболевания при употреблении зараженных овощей и фруктов.

ЛИТЕРАТУРА

- Инструкция "Эпидемиология, лабораторная диагностика иерсиниозов, организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий": №15-6/42; Утв. Зам. Нач. Гл. эпидемиол. управления Минздрава СССР Г.Г. Онищенко 30.10.1990. Москва, 49.
- Литвин В. Ю., Гинцбург А. Л., Пушкарева В. И., Романова Ю. М., Боев Б. В. (1998) Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. Москва, Фармус-принт, 255.
- Литвин В. Ю., Емельяненко Е. Н., Пушкарева В. И. (1996) Патогенные бактерии общие для человека и растений: проблема и факты. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунол., № 2, 101 – 104.
- Маркова Ю. А., Романенко А. С., Донская А.Е., Криволапова Н.В., Духанина А. В. (2004) Влияние бактерий, патогенных для человека, на жизнедеятельность растений. Стрессовые белки растений (Материалы Всероссийской научной конференции), 73-76.
- Маркова Ю.А., Романенко А.С., Игумнова Е.К., Салаяев Р.К. (2002) Растения как возможные резервуары бактерий, патогенных для человека и животных. Докл. АН. Т. 386, № 2, 277-279.
- И.А. Шурыгина, М.В. Чеснокова, В.Т. Климов (2003) Псевдотуберкулез. Новосибирск, Наука, 320.
- Тимченко Н. Ф., Булгаков В. П., Булах Е. В., Яснецкая Е. Г., Журавлев Ю. Н. (2000) Взаимодействие *Yersinia*, *Listeria* и *Salmonella* с растительными клетками, Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунол., №1, 6 – 10.
- Bernier SP, Silo-Suh L, Woods DE, Ohman DE, Sokol PA.(2003) Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. Infect Immun, Sep;71(9):5306-13.
- Burnett SL, Beuchat LR. (2002) Differentiation of viable and dead *Escherichia coli* O157:H7 cells on and in apple structures and tissues following chlorine treatment. J Food Prot. Feb;65(2):251-9.
- Burnett SL, Chen J, Beuchat LR. (2000) Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. Appl Environ Microbiol. Nov;66(11):4679-87.
- Cao H, Baldini RL, Rahme LG. (2001) Common mechanisms for pathogens of plants and animals. Annu Rev Phytopathol. 39:259-84.
- Cooley M. B., Miller W. G., Mandrell R. E. (2003) Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 69, № 8. - p. 4915-4926.
- Josenshans C, Suerbaum S. (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. Int J Med Microbiol. Mar;291(8):605-14.
- Keen N, Staskawicz B, Mekalanos J, Ausubel F, Cook R J. (2000) Pathogens and hosts: the dance is the same, the couples are different. Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 1;97(16):8752-3.
- Kempf VA, Hitziger N, Riess T, Autenrieth IB. (2002) Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? Trends Microbiol. Jun;10(6):269-75.
- Menezes H, Jared C. (2002) Immunity in plants and animals: common ends through different means using similar tools. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. May;132(1):1-7.
- Nakajima H., Juone M., Mori T. (1992) Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. J. Clin. Microbiol. Vol. 30. 2484 – 2486.
- Plotnikova JM, Rahme LG, Ausubel FM. (2000) Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. Plant Physiol. Dec;124(4):1766-74.
- Portnoy D.A. (1985) Role of plasmid in the pathogenicity of *Yersinia* species. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 1985. Vol. 118. P. 29-51.
- Rahme LG, Ausubel FM, Cao H, Drenkard E, Goumnerov BC, Lau GW, Mahajan-Miklos S, Plotnikova J, Tan MW, Tsongalis J, Walendziewicz CL, Tompkins RG. (2000) Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 1;97(16):8815-21.
- Rahme LG, Tan MW, Le L, Wong SM, Tompkins RG, Calderwood SB, Ausubel FM. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 25;94(24):13245-50.
- Skurnik M., Wolf-Watz H. (1989) Analysis of the Yop A gene encoding the Yop 1 virulence determinants of *Yersinia* spp. Mol. Microbiol. Vol. 3, № 4. 517 – 531.
- Solomon E B, Yaron S, Matthews K R. (2002) Transmission of *Escherichia coli* O157:H7

- from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 68, № 1. 397-400.
- Staskawicz BJ, Mudgett MB, Dangl JL, Galan JE. (2001) Common and contrasting themes of plant and animal diseases. *Science*. Jun 22;292(5525):2285-9.
- Takeuchi K, Hassan AN, Frank JF. (2001) Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce as influenced by modified atmosphere and temperature. *J Food Prot.* Nov;64(11):1820-3.
- Tan M.W. (2002) Cross-species infections and their analysis. *Annu Rev Microbiol.* 56:539-65. Epub 2002 Jan 30.
- Taylor CB. (1998) Defense responses in plants and animals--more of the same. *Plant Cell.* Jun;10(6):873-6.
- Tschäpe H., Prager R., Streckel W., Fruth A., Tietze E., Böhme G. (1995) Verotoxigenic *Citrobacter freundii* associated with severe gastroenteritis and cases of haemolytic uraemic syndrome in a nursery school: Green butter as the infection source. *Epidemiol. and Infec.* 114, № 3, 441 - 450.
- Van der Riet FS. (2000) Diseases of plants transmissible between plants and man (Phytonoses) exist--follow-up paper. *Med Hypotheses.* Feb;54(2):310-1.
- Van Gijsegem F, Genin S, Boucher C. (1993) Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol.* Aug;1(5):175-80.
- Wachtel MR, Whitehand LC, Mandrell RE. (2002) Association of *Escherichia coli* O157:H7 with preharvest leaf lettuce upon exposure to contaminated irrigation water. *J Food Prot.* Jan;65(1):18-25.
- Warriner K., Ibrahim F., Dickinson M., Wright C., Waites W. M. (2003) Interaction of *Escherichia coli* with growing salad spinach plants. *J. Food Prot.* Oct. 66 (10), 1790-1797.