

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТУ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ

На правах рукопису

ПЕТАК Ганна Михайлівна

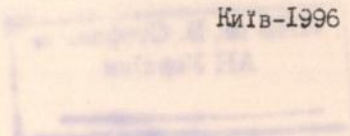
ВЗАЄМОДІЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *Klebsiella* З ПРЕДСТАВНИКАМИ  
ВИЩИХ РОСЛИН.

03.00.12-фізіологія рослин

03.00.07-мікробіологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ-1996





AB 35.078

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Ужгородському державному університеті

Науковий керівник: кандидат медичних наук, доцент  
Алла Іванівна ТУРЯНИЦЯ

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор  
Ераст Анатолійович ГОЛОВКО

кандидат біологічних наук  
Олена Дмитрівна КРУГОВА

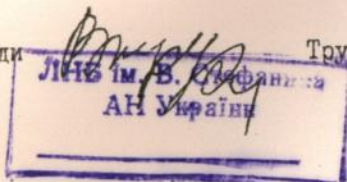
Провідна організація: Інститут молекулярної біології і  
генетики НАН України

Захист дисертації відбудеться 21 червня 1996 року  
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 50.09.01 по  
захисту дисертацій на здобуття наукового ступеня доктора  
наук при Інституті фізіології рослин і генетики НАН України  
за адресою: 252022, Київ-22, вул.Васильківська 31/17.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотечі  
Інституту фізіології рослин і генетики НАН України.

Автореферат розісланий 17 травня 1996 року.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради



Труханов В.А.

Актуальність і ступінь дослідженості тематики дисертації.

Комплексне вивчення взаємовідносин мікроорганізмів з вищими рослинами постійно притягує увагу багатьох дослідників. На даний момент відомо чимало доказів, що свідчать про можливість використання мікроорганізмів та їх метаболітів для стимуляції проростання насіння та подальшого росту і розвитку рослин. Більшість діазотрофів не тільки постачають рослини азотом, але й забезпечують їх біологічно активними речовинами-фітогормонами, амінокислотами, антибіотиками та іншими сполуками. Особливо важлива роль у постачанні рослин доступними формами азоту, збереженні та підвищенні родючості ґрунтів належить азотфіксуючим мікроорганізмам, у тому числі й асоціативним.

Чисельна група вільноживучих бактерій роду *Klebsiella* широко розповсюджена у навколишньому середовищі. Дані мікроорганізми зустрічаються у ризосфері і філосфері рослин, у ґрунті, водоймах донних відкладах, відходах промислового виробництва, в організмі комах, риби, тварин та людини, що дає підставу припустити їх дуже важливу роль у природі / Ladha J.K. et al., 1983, Savoldinen S. et al. 1986, Sparel L. et al., 1986, Gras-Lendim G., 1988, Prabu S.K. et al., 1991, Нооe et al., 1992 / . Проте якщо у зв'язку із захворюваннями людини і тварин клебсієли постійно знаходилися у полі зору дослідників, то дані щодо вивчення впливу бактерій на вищі рослини характеризуються значною періодичністю. У доступній для нас вітчизняній та зарубіжній літературі можна знайти нечисельні дані щодо стимулюючого і фітопатогенного впливу клебсієл, у тому числі і умовно-патогенних на ростові процеси вищих рослин. Існує ряд потенційних механізмів за допомогою яких може реалізуватися вплив клебсієл на рослини. Про здатність до азотфіксації

окремих представників бактерій роду *Klebsiella*, що відносяться до таких видів як: *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. pneumoniae* повідомляється у роботах /Састаксі et al., 1981; Ladha et al., 1983; Kapustka, Lawrence, 1987 /. Поодинокі роботи авторів містять дані щодо здатності клебсієл синтезувати ІОК та інші індольні сполуки / Козыровская и др., 1991; Raabtelä, 1990 /. Окремі дослідники повідомляють про те, що вплив клебсієл на вищі рослини відбувається за рахунок колонізації ними корених волосків рослин та проникнення всередину рослинних тканин / Пуген и др., 1989; Korhonen et al., 1990 /. Проте всі ці питання вивчені далеко не достатньо. Проведення подібних досліджень розширить нашу уяву про особливості взаємодії досліджуваних бактерій з вищими рослинами, що може служити теоретичною основою для підтвердження існування полібіотрофії у бактерій роду *Klebsiella*. А тому вивчення взаємодії клебсієл із вищими рослинами і їх вплив на ростові та регенераційні процеси рослин є однією із актуальних проблем.

Мета та основні завдання наукових досліджень. Метою даної роботи було вивчення характеру впливу представників різних видів бактерій роду *Klebsiella* виділених як із клінічного матеріалу, так і навколишнього середовища на ростові та регенераційні процеси вищих рослин. Відповідно до цього були поставлені наступні завдання:

-дослідити характер впливу метаболітів клебсієл на розвиток проростків пшениці та огірків, і регенераційні процеси культури тканин тютюну та пшениці;

-показати стабільність штучної асоціації тютюн-*K. oxytoca* при субкультивуванні і збереженні асоціативних взаємодій при переході листок-пагін, листок-пагін;

-вивчити деякі із механізмів дії бактерій роду *Klebsiella* на вищі рослини/ дослідження нітрогеназної активності бактерій та здатності до продукування ними комплексу фітогормонів/ ;

-вивчити особливості впливу рослини-господаря помідор на кількісний склад поверхнево локалізованих антигенних структур бактерій;

-методами біолюмінесценсії та електронної мікроскопії дослідити здатність клебсієл до локалізації на поверхні та всередині рослинних тканин.

Наукова новизна досліджень. На основі впливу клебсієл на вищі рослини нами вперше виявлено ефект стимулюючої дії окремих представників умовно-патогенних видів/ *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* / на проростання насіння та формування проростків пшениці і огірків. Доведено, що після бактерізації насіння даних культур окремими бактеріальними штамами клебсієл збільшувалася енергія проростання насіння, довжина проростків та вага абсолютно сухих проростків. Нами також встановлено позитивний вплив клебсієл на регенераційні процеси культури тканин тютюну та пшениці. Інокуляція клебсієлами листових експлантатів тютюну та зрілих пшеничних зародків приводила до прискорення початку регенерації та підвищення інтенсивності органогенезу у дослідних варіантів порівняно з контрольними. Показано, що стимулюючий вплив значною мірою обумовлений здатністю клебсієл до азотфіксації та продукування біологічно активних речовин/ ауксинів, гіберелінів, цитокінінів/. Методами біолюмінесценсії та електронної мікроскопії доведено, що взаємодія мікроорганізмів з рослиною-господарем відбувається шляхом проникнення їх у міжклітинний простір та у рослинні тканини.

Тривале вирощування клебсієл у рослинних тканинах вело до зменшення кількості спільних із еритроцитами людини антигенів. Отже, отримані дані є доказом взаємного впливу бактерій і рослин-господаря.

Теоретична та практична цінність досліджень. У результаті проведених досліджень отримано нові дані, важливі для з'ясування взаємовідносин клебсієл із вищими рослинами, що може слугувати теоретичною основою для вивчення питання полібіотрофії бактерій роду *Klebsiella*. Показано, що як сапрофітні, так і умовно-патогенні представники клебсієл, виділені із різних джерел, здатні не тільки інгібувати ростові процеси у вищих рослин, але й позитивно на них впливати. Виявлено ряд штамів продуцентів біологічно активних речовин, котрі можуть бути використані для передпосівного обробітку насіння. Отримано дані про те, що клебсієли ефективно колонізують внутрішні тканини тютюну і, пройшовши 2 цикли листок-пагін, зберігають бактерії *K. oxytoca* на поверхні і в тканинах. Останнє може бути використане у практиці мікроклонування рослин для отримання посадкового матеріалу, інфікованого господарсько-цінними бактеріями.

Апробація роботи. Матеріали дисертації були представлені та обговорені на першому установчому з'їзді Українського мікробіологічного товариства /Київ, 1993/, на II-му з'їзді Українського товариства фізіологів рослин /Київ, 1993/, на 10-му міжнародному конгресі по азотфіксації /Санкт-Петербург, 1995/, на міжнародному конгресі з асоціативних зв'язків азотфіксуючих бактерій з рослинами /Саратов, 1995/, на міжнародній конференції з поточних проблем мікробіології /Ужгород, 1996/, а також на інших конференціях Ужгородського державного університету.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису об'єктів та методів дослідження та їх обговорення, заключення, висновків та списку використаної літератури/259 найменувань із них 149 на іноземній мові/. Робота викладена на 157 сторінках друкованого тексту і містить 16 таблиць, 25 малюнків.

Цілошення, які виносяться на захист.

1. Вплив клебсіел на вищі рослини супроводжується стимуляцією та інгібуванням ростових і регенераційних процесів вищих рослин в залежності від досліджуваних штамів.

2. Однією із ланок механізму стимулюючої дії клебсіел на вищі рослини, є їх здатність до фіксації молекулярного азоту та продукування регуляторів росту рослин/ ауксинів, гіберелінів, цитокінінів/.

3. Існує феномен зворотньої дії рослинного організму на бактерію, що проявляється у кількісній зміні поверхневих антигенних структур бактерій, спільних із еритроцитами людини.

4. Клебсіели, здатні колонізувати поверхню коренів та листків вищих рослин, проникати у рослинні тканини і існувати там без нанесення шкоди, що є підтвердженням їх можливості до епіфітного та ендоефітного існування.

Особистий внесок дисертанта у розробку наукових результатів. Дисертант проробила відповідну літературу та оволоділа необхідними методами дослідження, брала участь у плануванні дослідів. Використовуючи матеріально-технічну базу науково-дослідних інститутів м. Києва та Ужгородського державного університету, вона самостійно одержала всі експериментальні дані.

## ЗМІСТ РОБОТИ.

Об'єкти і методи досліджень. Об'єктами досліджень були представники бактерій роду *Klebsiella*, які відносяться до 6 видів / *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* /, джерелом виділення для яких послужило як навколишнє середовище, так і клінічний матеріал. У роботі використано культури з музею Ужгородського державного університету, Мінського медінституту, інституту інфекційних захворювань імені Громашевського, а також штами надані нам у інституті молекулярної біології і генетики НАН України.

Вплив продуктів обміну речовин бактерій роду *Klebsiella* вивчали на насінні пшениці сорту Одеська-66 та огірків сорту Ніжинські-12.3 цієї метю насіння даних культур замочували на 24 год у культуральній рідині досліджуваних бактерій, яку попередньо розводили 1:10. Для контролю використовували насіння, оброблене водою та поживним середовищем без бактерій у розведенні 1:10.

Регенераційні властивості культури тканин тютюну, після інюкуляції клебсієлами, вивчали використовуючи метод листових дисків/ Юркова та ін., 1989, Horsch et al., 1986/. Для спостереження за впливом клебсієл на регенераційні властивості пшениці, зародки обробляли бактеріальною суспензією у концентрації  $5 \cdot 10^9$  кл./мл.

Вивчення нітрогеназної активності у досліджуваних штамів клебсієл проводили ацетиленовим методом/ Nagy et al., 1968 /. Визначення вмісту білка у бактеріальній суспензії проводили за методикою/ Филипович и др., 1975/.

Продукцію ауксинів визначали за здатністю бактеріальної суспензії клебсієл викликати коренеутворення у 10-12-денних

листових черешків *Phaseolus vulgaris* L. /Турецька, Кефелі, 1977/  
Для визначення здатності клебсієл продукувати гібереліни вико-  
ристовували гіпокотилі *Lactuca sativa* /Кефелі та ін., 1977/.  
Здатність клебсієл до синтезу цитокінінів фіксували по збіль-  
шенню ваги етиольованих сім'ядолей *Cucumis* L. /Процько, Варшав-  
ська, 1977/.

В основі визначення антигенів, споріднених із еритроцитами  
людини А/II/ і В/III/ груп, лежало спостереження за зменшенням  
титру ізогемаглютинінів моноспецифічних сироваток анти-А і анти-  
-В після виснаження їх біомасою досліджуваних мікроорганізмів.

Метод біолюмінісценсії використовували для виявлення клеб-  
сієл у рослинних тканинах. З цієї метою листові експлантати ты-  
тону та зрілі зародки пшениці інокулювали бактеріальними куль-  
турами міченими  $Lux$ -генами.

Підготовку зразків коренів та листків двотижневих пророст-  
ків пшениці для проведення електронно-мікроскопічного аналізу  
проводили згідно із методикою/ Белявская и др., 1995/. Попередньо  
відібрані для електронно-мікроскопічного дослідження бактерії  
трансформували плазмідом  $pKAS 18Lux$  за методикою/Алексеев, Гунь-  
ковская, 1992/.

Статистичну обробку даних проводили по /Б.А.Доспехову, 1985/.

## ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ

### Вплив клебсієл на ріст і розвиток проростків пшениці та огірків.

Проведені дослідження показали, що окремі представники бак-  
терій роду *Klebsiella* як сапрофітні/ $K. planticola$ ,  $K. terrigena$  /,  
так і умовно-патогенні/ $K. ozaenae$ ,  $K. oxytoca$ ,  $K. rhinoscleromatis$ ,  
 $pneumoniae$  / здатні позитивно впливати на ріст і розвиток

проростків пшениці та огірків. Після бактеріальної обробки насіння даних культур це проявлялося у збільшенні проростання насіння, збільшенні загальної довжини коренів та стебел, а також приросту ваги абсолютно сухих проростків. Так, після обробки насіння пшениці енергія проростання насіння становила 93-96% у контролі-93%, довжина стебел проростків була рівною 7-10 см/у контролі-7 см/, загальна довжина коренів становила 8-13 см/ у контролі-8 см/ приріст ваги абсолютно сухих проростків складав по відношенню до контролю 103-123%. Подібні результати були нами отримані і після бактеризації насіння огірків. Крім бактерій-стимуляторів пшениці та огірків, було виявлено ряд штамів, які інгібували або незначною мірою впливали на ростові процеси тест культур.

Як позитивну, так і негативну дію на насіння та проростки пшениці та огірків проявляли культури, виділені із різних джерел /клінічного матеріалу та навколишнього середовища// табл. I/. Експерименти показали, що серед 51 досліджуваного штаму було виявлено 26/51% стимуляторів стебел, із них 16 штамів мали клінічне походження і 11-були ізольовані із навколишнього середовища. Ще 25 штамів/12 клінічного походження і 13 виділених із зовнішнього середовища/стимулювали ріст коренів пшениці. На приріст ваги абсолютно сухих проростків пшениці позитивно впливали 17 бактеріальних культур/ 10 клінічних штамів і 7 штамів джерелом виділення для яких послужило навколишнє середовище/. Інгібіторів росту стебел, коренів і приросту ваги абсолютно сухих проростків виявлено дещо меншу кількість/13, 22, 20/ і ще менша кількість незначною мірою впливала на ростові процеси пшениці/7, 4, 14/. Подібні результати нами були отримані при дослідженні впливу клібсіел на ріст і розвиток насіння огірків/табл. I/. У даному випадку було виявлено меншу

Вплив бактерій роду *Klebsiella*, виділених із різних джерел, на ріст проростків огірків та пшениці

Вплив на	Характер впливу клебсієл <sup>+</sup>		
	Стимулювали	Інгібували	Не впливали

## П Ш Е Н И Ц Я

Стебла	$\frac{26}{15/11}$	$\frac{18}{12/6}$	$\frac{7}{4/3}$
Корені	$\frac{25}{12/13}$	$\frac{22}{16/6}$	$\frac{4}{3/1}$
Вагу	$\frac{17}{10/7}$	$\frac{20}{15/5}$	$\frac{14}{8/6}$

## О Г І Р К И

Стебла	$\frac{19}{9/10}$	$\frac{18}{13/5}$	$\frac{14}{10/4}$
Корені	$\frac{19}{9/10}$	$\frac{18}{14/6}$	$\frac{14}{10/4}$
Вагу	$\frac{17}{9/8}$	$\frac{20}{14/6}$	$\frac{14}{9/5}$

Примітка: У числівнику загальна кількість штамів

У знаменнику: кількість штамів клінічного походження

/кількість штамів, ізольованих із

навколишнього середовища

+ У досліді використано 51 штамп клебсієл

кількість бактеріальних культур, що стимулює діяти на проростки огірка.

Таким чином, слід відзначити, що здатність до стимуляції та інгібування насіння і проростків пшениці та огірків була виявлена як у сапрофітних, так і умовно-патогенних представників, виділених із різних джерел.

#### Вплив клебсієл на регенераційні процеси культури тканин тютюну і пшениці.

Дані про характер впливу клебсієл, виділених із різних джерел, на регенераційні властивості культури тканин тютюну та пшениці подано у /табл.2/. Із даних таблиці видно, що після обробки листових експлантатів тютюну із 12-ти досліджуваних штамів по 9 прискорювали початок регенерації та інтенсивність органогенезу. Із них по 3 культури були виділені із клінічного матеріалу та по 6-із навколишнього середовища. Ще 4 штами клінічного походження пригнічували ростові процеси листових експлантатів тютюну та 2 штами, для яких джерелом виділення послужив також клінічний матеріал не володіли здатністю позитивно впливати на тютюн.

Проведення лабораторних експериментів показало, що після обробки зрілих пшеничних зародків було виявлено ряд культур /7,6,10,9/, які прискорювали початок регенерації, інтенсивність органогенезу, ріст стебел та коренів. Друга група штамів /2,5,1,2/-інгібувала регенераційні властивості пшениці. Ще одна кількість бактеріальних культур /3,1,1,1/ не проявляла істотного впливу на пшеничні зародки.

Отже, можна зробити висновок, що продукти життєдіяльності досліджуваних штамів не тільки вибірково впливають на ріст різних

Таблиця 2.

Вплив бактерій роду *Klebsiella*, виділених із різних джерел, на регенераційні процеси культури тканин тютюну та пшениці

Вплив на	Характер впливу клебсіел <sup>+</sup>		
	Стимулювали	Інгібували	Не впливали
Т Ю Т Ю Н			
Початок регенерації	$\frac{9}{3/6}$	$\frac{2}{2/-}$	$\frac{1}{1/-}$
Інтенсивність органогенезу	$\frac{9}{3/6}$	$\frac{2}{2/-}$	$\frac{1}{1/-}$
П Ш Е Н И Ц Я			
Початок регенерації	$\frac{7}{4/3}$	$\frac{2}{2/-}$	$\frac{3}{1/2}$
Інтенсивність органогенезу	$\frac{6}{3/3}$	$\frac{5}{3/2}$	$\frac{1}{1/-}$
Ріст стебел	$\frac{10}{5/5}$	$\frac{1}{-1}$	$\frac{1}{-1}$
Ріст коренів	$\frac{9}{5/4}$	$\frac{2}{-2}$	$\frac{1}{1/-}$

Примітка: У числівнику загальна кількість штамів

У знаменнику: кількість штамів клінічного походження /кількість штамів, ізольованих із навколишнього середовища

+ У досліді було використано 12 штамів клебсіел

рослин, але і підтвержують неодинакову зворотню реакцію регенерантів на однотипну дію.

#### Нітрогеназна активність клебсієд.

У зв'язку із стимулюючим ефектом окремих представників бактерій роду *Klebsiella* на ростові та регенераційні властивості вищих рослин ми поставили перед собою завдання розкрити деякі із механізмів такої дії. Дослідження показали, що представники сапрофітних бактерій роду *Klebsiella* - / *K. planticola*, *K. terrigena* / володіли достатньо високим рівнем нітрогеназної активності / табл. 3 /, значення якої для 9-ти бактеріальних культур коливалося в межах від 626 до 1327  $\text{нМС}_2\text{Н}_4/\text{мг}/\text{год}$ . ще один бактеріальний штам *K. planticola* проявляв нітрогеназну активність на рівні 565  $\text{нМС}_2\text{Н}_4/\text{мг}/\text{год}$ . Як видно із даних таблиці 3 серед представників умовно-патогенних видів *K. pneumoniae* та *K. oxytoca* по 3 штамі проявляли нітрогеназну активність у межах від 627 до 1327  $\text{нМС}_2\text{Н}_4/\text{мг}/\text{год}$  і 3 штамі проявляли середній рівень ацетиленредуктазної активності у межах 141-606  $\text{нМС}_2\text{Н}_4/\text{мг}/\text{год}$ .

Відсутність у літературі даних про можливість фіксації атмосферного азоту представниками таких видів бактерій роду *Klebsiella*, провести відповідні дослідження. При аналізі результатів вивчення нітрогеназної активності представників вищезгаданих видів, звертає на себе увагу той факт, що деяка кількість досліджуваних культур озени та склеромної палочки здатна до фіксації атмосферного азоту. Серед 30 досліджуваних культур, виділених із різних джерел, 16 штамі проявляли нітрогеназну активність у межах від 141 до 606  $\text{нМС}_2\text{Н}_4/\text{мг}/\text{год}$  і ще 14 штамі показали низький рівень фіксації атмосферного азоту в межах від 21 до 116  $\text{нМС}_2\text{Н}_4/\text{мг}/\text{год}$ .

Таблиця 3.

Нітрогеназна активність представників різних видів бактерій роду *Klebsiella*

Вид бактерій	Кількість досліджуваних штамів	Кількість штамів з різною нітрогеназною активністю		
		нМС <sub>2</sub> Н <sub>4</sub> /мг/год		
		626-1327	141-606	21-116
<i>K.planticola</i>	5	4	1	-
<i>K.terrigena</i>	5	5	-	-
<i>K.pneumoniae</i>	6	4	2	-
<i>K.oxytoca</i>	5	4	1	-
<i>K.rhinoscleromatis</i>	15	-	8	7
<i>K.ozaenae</i>	15	-	8	7

Таким чином, окремі представники як сапрофітних, так і умовно-патогенних бактерій роду *Klebsiella* виявилися здатними фіксувати молекулярний азот атмосфери.

#### Продуктування клебсієлами фітогормонів.

Відомо, що одним із важливих факторів впливу мікроорганізмів на життєдіяльність рослин є система фітогормонів—ауксинів, гіберелінів, цитокінінів. Вивчення здатності сапрофітних представників клебсієл продукувати ауксини показало, що найвища інтенсивність ризогенезу у 10–12 денних листових черешків квасолі спостерігалася під дією 8 штамів із 10 досліджених/табл.4/. Кількість коренів, що закладалися на листовий черешок становила 33–42/ 110–140%/ по відношенню до контролю з використанням гетероауксину у концентрації 10 мг/л. Особливий інтерес представляють результати якісної реакції на продукцію ауксинів у культур умовно-патогенних клебсієл/*K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* /. Після обробки листових черешків квасолі бактеріальною суспензією вищезгаданих бактерій кількість корінців, яка закладалася становила 32–40/103–133%/.

Дослідження здатності клебсієл до продуктування гіберелінів велось на насінні *Lactuca sativa*. Інокуляція насіння салату показала, що здатністю впливати на довжину гіпокотилів володіли не тільки сапрофітні, але й умовно-патогенні представники бактерій роду *Klebsiella* /табл.4/. Так, після нанесення на гіпокотилі салату бактеріальної суспензії культур *K. planticola* /1 штам/, *K. pneumoniae* /2 штами/, *K. oxytoca* /1штам/, *K. rhinoscleromatis* /2 штами/, *K. ozaenae* /1 штам/ довжина гіпокотилів салату порівняно до контролю з використанням гібереліну у концентрації 10 мг/л була

Таблица 4.

Здатність бактерій роду *Klebsiella* до продукування фітогормонів

Варіанти дослідів	Кількість досліджуваних штамів	Синтез					
		ауксинів		гібберелінів		цитокінінів	
		Кількість продуцентів	% до контролю	Кількість продуцентів	% до контролю	Кількість продуцентів	% до контролю
<i>K. planticola</i>	5	4	110-140	1	160	2	150-175
<i>K. terrigena</i>	5	4	113-126	-	-	2	120-150
<i>K. pneumoniae</i>	6	3	116-133	2	137-142	2	105-125
<i>K. oxytoca</i>	5	3	106-126	1	151	1	135
<i>K. rhinoscleromatis</i>	15	6	106-123	2	125-145	2	115
<i>K. ozaenae</i>	15	6	103-123	1	134	5	105-150

більша і складала 120-160%. У всіх інших бактеріальних культур здатність до синтезу гіберелінів не була зафіксована.

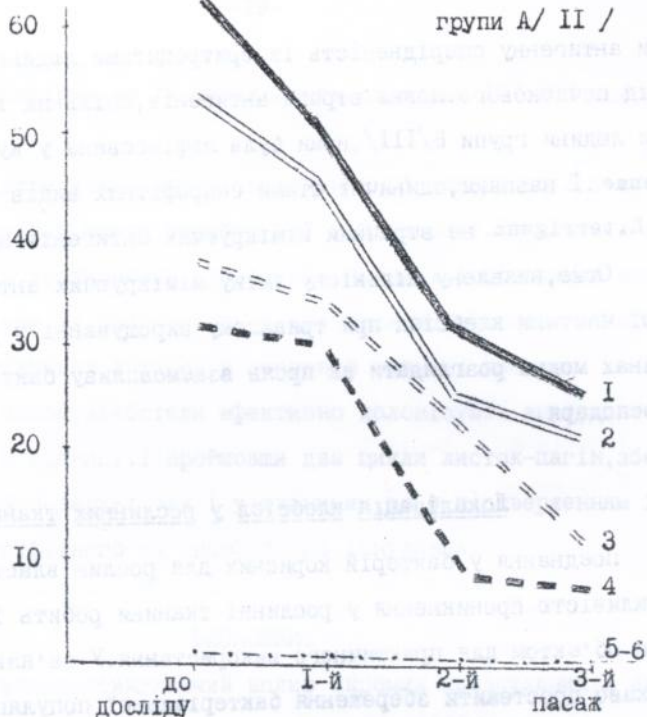
Синтез цитокінінів нами був зафіксований з допомогою біотесту на етиольованих сім'ядолях огірків у 4 сапрофітних представників. У залежності від досліджуваного штаму приріст ваги сім'ядолей по відношенню до контролю з використанням кінетину у концентрації 1 мг/л становив 120-175%. Здатність до продукування цитокінінів нами також була виявлена в умовно-патогенних представників клебсієл: *K. pneumoniae* /2 штами/ *K. oxytoca* /1 штама/, *K. rhinoscleromatis* /1 штама/, *K. ozaenae* /5 штамів/. Приріст ваги сім'ядолей огірка після обробки бактеріальною суспензією вищезгаданих бактерій складав 105-150% порівняно із контрольним варіантом. Очевидно, здатність клебсієл фіксувати атмосферний азот і продукувати гормони росту рослин, допомагає їм вижити у несприятливих умовах середовища.

#### Зміна антигенного складу клебсієл під дією вищих рослин.

Виявлено зворотню дію рослинного організму на досліджувані мікроорганізми, що проявлялася у кількісній зміні спільних із еритроцитами людини антигенних структур бактерій. На малюнку 1 подано кількісне відображення змін антигенів мімікрії у клебсієл після 3-х кратного їх пасирування у плодах зелених помідор. Після першого пасажу клебсієл у рослинній тканині кількість штамів для умовно-патогенних видів, що містили антигени, перехресно реагуючі із еритроцитами людини A/II/ і B/III/ груп зменшилася відповідно у *K. rhinoscleromatis* з 62 до 51, у *K. pneumoniae* - із 54 до 46, у *K. ozaenae* - із 38 до 34, у *K. oxytoca* - із 32 до 30. Протягом наступних двох пасажів мікроорганізмів у рослинній тканині відбувалося помітне зниження кількості культур умовно-патогенних видів, що ма-

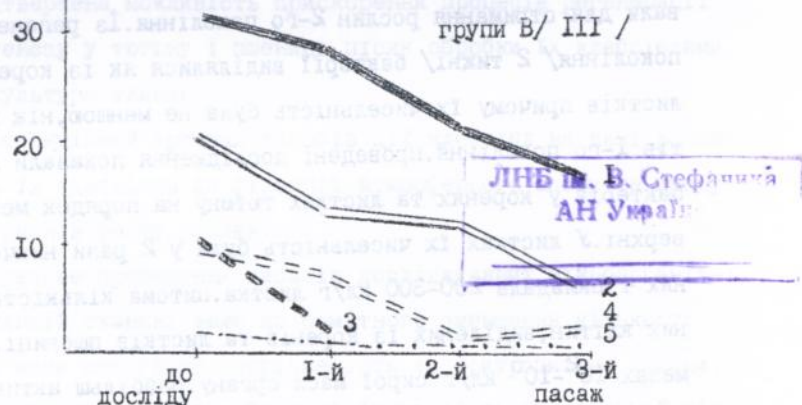
Кількість культур

групи А/ II /



Кількість культур

групи В/ III /



ЛНБ ім. В. Стефанива  
АН УкрАІ

Мал.І.Зміна чисельності клебсієл, що містять спільні антигени із еритроцитами людини після їх перебування у помідорах.

Примітка: 1-К. rhinoscleromatis  
2-К. pneumoniae  
3-К. ozaenae

4-К. oxytoca  
5-К. terrigena  
6-К. planticola

ли антигенну спорідненість із еритроцитами людини на /40-71%/ від початкового. Шовна втрата антигенів, спільних із еритроцитами людини групи В/III/, нами була зафіксована у культур *K. ozae* *enae*. І навпаки, одиничні штами сапрофітних видів *K. planticola* і *K. terrigena* не втрачали мімікуючих антигенів при пасируванні.

Отже, виявлену кількісну зміну мімікуючих антигенів у значної частини клебсієл при тривалому вирощуванні у рослинних тканинах можна розглядати як прояв взаємовпливу бактерій і рослини-господаря.

#### Локалізація клебсієл у рослинних тканинах.

Дослідження у бактерій корисних для рослин властивостей із можливістю проникнення у рослинні тканини робить їх перспективним об'єктом для практичного використання. У зв'язку з цим було цікаво простежити збереження бактеріальної популяції клебсієл у рослині при субкультивуванні. Для цього листки регенерантів тютюну, інфіковані представниками різних видів клебсієл, використовували для отримання рослин 2-го покоління. Із регенерантів нового покоління / 2 тижні / бактерії виділялися як із коренів, так і листків причому їх чисельність була не меншою, ніж у регенерантів 1-го покоління. Проведені дослідження показали присутність бактерій у коренях та листках тютюну на порядок менше, ніж на поверхні. У листках їх чисельність була у 2 рази нижчою, ніж у коренях і складала 200-300 кл/г листка. Штима кількість бактеріальних клітин, виділених із коренів та листків пшениці, коливалася в межах  $10^2-10^5$  кл/г сирої маси органу. Найбільш активно проникали у корені та листки пшениці бактерії *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. Oхутоса*. Шоверхня коренів та листків пшениці була також густо

вкрита бактеріями, де їх чисельність складала  $10^4$ - $10^5$  кл/г сирої маси.

Для підтверження внутрішньотканинної локалізації бактерій використовували метод електронної мікроскопії. Результати зразків коренів двотижневих проростків пшениці, інфікованих клебсієлами, показали їх присутність у клітинах периферичного шару кореня, міжклітинниках, а також у листовій тканині пшениці.

Таким чином, клебсієли ефективно колонізують внутрішні тканини тютюну й пшениці, і пройшовши два цикли листок-пагіт, зберігаються як на поверхні, так і у тканинах, що є підтверженням їх здатності до епіфітного та ендоефітного існування.

#### ВИСНОВКИ.

1. Виявлено стимулюючий вплив окремих представників як сапроефітних, так і умовно-патогенних видів клебсієл, виділених із різних джерел на ростові процеси проростків пшениці та огірків.

2. Підтвержена можливість прискорення процесів регенерації та органогенезу у тютюну і пшениці після обробки їх клебсієлами на рівні культури тканин.

3. У потенційний арсенал засобів дії клебсієл на вищі рослини входить їх здатність до фіксації атмосферного азоту та продукування гормонів росту рослин.

4. Триразове проведення пасажів досліджуваних мікроорганізмів у рослинній тканині вело до помітного зменшення кількості культур, що мали антигенну спорідненість із еритроцитами людини.

5. За допомогою методів біолюмінесценсії та електронної мікроскопії доведена локалізація клебсієл на поверхні та всередині рослинних тканин.

6. Здатність клебсієл до фіксації молекулярного азоту, проду-

кування гормонів росту рослин та локалізації у рослинних тканинах робить сапрофітні штами перспективним об'єктом для передпосівного обробітку насіння вищих рослин.

Список наукових праць, що відображають основні положення дисертації.

1. Петак Г.М., Коваль Г.М. Роль рослинного організму у зміні антигенних характеристик клебсієл // Тези доповідей 47-ї наукової конференції / серія біологічна / Ужгород, 1993. - С.27.
2. Туряниця А.І., Петак Г.М., Коваль Г.М. Роль рослинного організму у зміні біологічних характеристик бактерій-симбіонтів // Тези доповідей II з'їзду Українського товариства фізіологів рослин. - Київ, 1993. - Том 2. - С.106.
3. Петак Г.М. Вплив культури бактерій *Klebsiella oxytoca* різного віку на кореневу систему огірків та пшениці // науковий вісник Ужгородського університету. Серія біологія, вип. I. - Ужгород, 1994. - С.50-53.
4. Петак Г.М., Нічик М.М., Туряниця А.І. Вплив бактерій роду *Klebsiella*, здатних до фіксації атмосферного азоту, на ріст проростків пшениці // Физиология и биохимия культ. растений. - 1994. - Т. 26, №3. - С.294-298.
5. Туряниця А.И., Петак А.М., Коваль Г.п., Шарга Б.М. Содержание антигенов мимикрии у бактерий рода *Klebsiella* при культивировании их в растительной ткани // Микробиол. журн. - 1994. - Т. 56, №4. - С.20-25.
6. Петак А.М., Белчгази В.И., Шомазова В.Б. Влияние бактерий рода *Klebsiella* на развитие некоторых высших растений // Матеріали I установчого з'їзду Українського мікробіологічного товариства

ва ІЗ-Іо вересня Одеса, 1993 р./.-Одеса, 1993.Мікробіол.журн., 1994.-Т.36, №2.-С.95.

7.Петак Г.М., Туряниця А.І.Механізми стимулюючої дії клеб-  
сел на вищі рослини//Тези доповідей 49-ї наукової конференції,  
присвяченої 50-річчю біологічного факультету УжДУ /серія біо-  
логічна /.-Ужгород, 1995.-С.69.

8.Туряниця А.И., Петак А.М., Мичик М.М., Петросова В.И.Изуче-  
ние способности бактерий рода Klebsiella фиксировать атмосфер-  
ный азот и продуцировать гормоны роста растений//Мікробіол.журн.  
-1995.-Т.37, №4.-С.28-34.

9.Петак А.М., Ковтунович Г.Л., Козыровская Н.А., Туряниця А.И.,  
Кордюм В.А.Взаимоотношения бактерий рода Klebsiella с растением.

2.Локализация бактерий *K.oxytoca*, *K.terrigena* в тканях табака  
и пшеницы//Биополимеры и клетка.-1995.-Т.ІІ, №.-С.75-80.

10.Kozyrovska N., Petak A., Kovtunovich G., Turyanitsa A., Kor-  
dyum V.Interaction of Klebsiella species with the model plants  
Book of Abstracts.International workshop on associative interac-  
tions of nitrogen-fixing bacteria with plants.Saratov,Russia,  
June 5-8, 1995.-P.53.

11.Kozyrovska N.O., Petak G.M., Belyavska N.O., Kovtunovich  
G.L., Kordyum V.A., Kordyum E.L.Interrationships of Klebsiella  
with the plant:early events.IN:Abstracts of the 10 th Interna-  
tional congress on Nitrogen Fixation .-Saint-Peterburg.May 28-  
June 3.-1995.-P.134.

Petak G.M.Interaction of bacteria Klebsiella genus with  
representatives of higher plants.

Ph.D. thesis (Biology) on the Speciality 03.00.12-plant phi-

siology and 03.00.07-microbiologia.Inst.of Plant Physiology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine,Kiev, 1996.

The influence of bacteria of genus *Klebsiella* on growth and regeneration process in higher plants has been studied.It is shown that the different representatives of *Klebsiella*,both saprophytic and conventionally pathogenic cause stimulating and inhibiting effect on growth and regeneration processes of higher plants.The positive influence of *Klebsiella* on higher plants is realized owing to the microorganisms' Properties of active fixing molecular nitrogen and producing plant growth hormones (auxins-indolilacetic acid,gibberelins,cytokinins).*Klebsiella* possivation in plant tissues led to reduction of the number of cultures having antigenic affinity with human erythrocytes.Electron microscopy and bioluminescence methods were used to show the localization of *Klebsiella* inside the plant tissues and on the surfase of host plants.

Изучено влияние бактерий рода *Klebsiella* на ростовые и регенерационные процессы высших растений.Показано,что представители разных видов бактерий рода *Klebsiella* ,как сапрофитные, так и условно-патогенные оказывают стимулирующее и ингибирующее действие на ростовые и регенерационные процессы высших растений.Позитивное влияние клебсиел на высшие растения осуществляется благодаря их способности активно фиксировать атмосферный азот и продуцировать гормоны роста растений/ауксины-индолил уксусную кислоту,гибберелины,цитокнины/.Массирование клебсиел в растительной ткани вело к уменьшению количества культур,которые имели антигенное сродство с эритроцитами





---

Подписано к печати 16.05.96г. Формат 60x84/16.  
Объем: 2,0 усл.-печ.л., 2,0 уч.-изд.л.  
Тираж 70. Заказ 33.

---

Отдел оперативной полиграфии "Международного финансового агентства"  
тел. 416-20-65, 416-43-21, вечером 419-38-44

436811

AB 35.018

**AB 35.018**