

УДК 632.3.01/.08+579.8+57.083.1

О. С. Стончюс, Н. В. Черевач, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

ОСОБЛИВОСТІ ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ТА ПОШУК ЇХ ПРИРОДНИХ АНТАГОНІСТІВ

Виділено та досліджено мікрофлору овочів, уражених бактериозами. На основі вивчення морфологічних, культуральних і фізіолого-біохімічних ознак ідентифіковано штами, визначено їх патогенність для рослин. Досліджено антагоністичний вплив штаму *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* IMB B-7186 на виділені культури мікроорганізмів.

Е. С. Стончюс, Н. В. Черевач, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара

ОСОБЕННОСТИ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ПОИСК ИХ ЕСТЕСТВЕННЫХ АНТАГОНИСТОВ

Выделена и исследована микрофлора овощей, пораженных бактериозами. На основе изучения морфологических, культуральных и физиолого-биохимических признаков проведена идентификация штаммов, определена их патогенность для растений. Исследовано антагонистическое влияние штамма *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* IMB B-7186 на выделенные культуры микроорганизмов.

O. S. Stonchyus, N. V. Cherevach, A. I. Vinnikov

Oles' Honchar Dnipropetrovsk National University

FEATURES OF ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA AND SEARCH OF THEIR NATURAL ANTAGONISTS

Microflora of vegetables affected by bacteriosis was isolated and investigated. On the basis of morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics of selected strains they were identified, and their plants pathogenicity was shown. The antagonistic influence of strain *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* IMV B-7186 on isolated bacterial culture was studied.

Вступ

Бактеріози рослин – одна з головних причин значного зниження врожаїв сільськогосподарських культур. Світові збитки від них становлять 12 % потенційного врожаю, не враховуючи втрат при зберіганні [1–3; 8]. Втрати виражаються не тільки в загибелі або зменшенні врожаю, а й у зниженні його якості, тому що частково ушкоджена сільськогосподарська продукція втрачає свої технічні, харчові, товарні та інші властивості [7]. У природних біоценозах присутність фітопаразитів – необхідне явище. Вони обмежують розростання домінуючих видів рослин, сприяють зменшенню кон-

куренції хазяїв між собою, підтримуючи видове різноманіття фітоценозів [4; 5]. Нині відомо понад 300 видів фітопатогенних бактерій. Це представники родів *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Shigella*, *Aplanobacterium*, *Chromobacterium*, *Rhizobium* [6]. Зовнішніми ознаками бактеріозів рослин можуть бути гнилизни, зів'янення, некрози, опіки, нарости, хлорози, деформації [4; 7–10].

Перехід сільського господарства на нові технології сприяв значній зміні фітосанітарного стану полів, зокрема, посиленню розвитку ряду захворювань, що раніше не мали негативного значення. Екологічна обстановка, що сформувалась, вказує на актуальність дослідження збудників бактеріозів і розробки ефективних способів захисту рослин. У зв'язку з цим мета даної роботи – оцінити особливості виділення та ідентифікації фітопатогенних бактерій, визначити природні штами-антагоністи для боротьби з ними.

Матеріал і методи досліджень

Для виділення фітопатогенних бактерій використано овочі з ознаками бактеріозів, придбані в супермаркетах і відібрані в овочесховищі в зимово-весняний період зберігання. Бактерії виділяли класичними методами [11]. Ідентифікацію штамів проводили за дев'ятим виданням Визначника бактерій Берджі [12]. Патогенність виділених штамів визначали за реакцією надчутливості (метод А. Клемента та М. С. Матишевської) [11]. Для інокуляції як індикатор брали герань кімнатну (*Pelargonium zonale*). У міжклітинний простір листя вводили 0,1 мл бактеріальної суспензії. Контроль – відповідний об'єм стерильної води. За рослиною спостерігали протягом 14 діб.

Антагоністичну активність штаму *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* IMB B-7186 відносно виділених культур вивчали на чашках Петрі з картопляним агаром методами перпендикулярних штрихів та агарових блочків [13].

Результати та їх обговорення

Для формування робочої колекції фітопатогенних бактерій проаналізовано 8 зразків овочів, уражених бактеріозами, та виділено 15 штамів мікроорганізмів. Із метою ідентифікації всі виділені штами досліджено за 43 ознаками. За одним винятком усі штами були грамнегативними паличками, аеробними або факультативно анаеробними, рухливими, каталазопозитивними, відновлювали нітрати, не утворювали фенілаланіндезамінази, індолу та сірководню.

На підставі отриманих даних 6 штамів віднесено до групи 5 – факультативно анаеробні грамнегативні палички (табл. 1). Серед них чотири (№ 4, 11, 1 та 6) – до родини Enterobacteriaceae, оскільки вони були рухливими, утилізували глюкозу та інші вуглеводи з утворенням кислоти, а деякі – і газу, відновлювали нітрати, не утворювали оксидазу, були присутні на овочах. Штами № 3 та 12 відповідали перерахованим властивостям, але були оксидазопозитивними і не утворювали колонії фіолетового кольору, що дозволило віднести їх до родини Vibrionaceae.

Із чотирьох штамів родини Enterobacteriaceae два ідентифіковано до виду. Штам № 4 мав позитивну реакцію Фогес–Проскауера, гідролізував желатину, сечовину, твін, утворював рожевий і коричневий пігменти залежно від середовища. Враховуючи ці властивості та дані щодо використання різноманітних субстратів як джерела вуглецю, штам визначено як *Serratia marcescens*.

Штам № 11 має негативну реакцію Фогес–Проскауера, не гідролізує желатину, сечовину, твін, утворює пектолітичні ферменти, не продукує амілолітичних ферментів,

синтезує світло-коричневий не дифундує у середовище пігмент. Враховуючи ці властивості та дані щодо використання різноманітних субстратів як джерела вуглецю, штам віднесено до *Enterobacter agglomerans*.

Таблиця 1

Ознаки штамів, віднесених до групи 5 – факультативно анаеробні грамнегативні палички

Ознака	Родина Enterobacteriaceae				Родина Vibrionaceae	
	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i>	–		–	
	4	11	1	6	3	12
Анаеробний ріст	+	+	+	+	+	+
Рухливість	+	+	+	+	+	+
Утворення кислоти з глюкози	+	+	+	+	+	+
Утворення газу з глюкози	–	–	+	–	–	–
Оксидаза	–	–	–	–	+	+
Каталаза	+	+	+	+	+	+
Відновлення нітратів	+	+	+	+	+	+
Реакція Фогес–Проскауера	+	–	+	+	–	+
Гідроліз желатини	+	–	+	+	–	+
Гідроліз сечовини	+	–	+	+	+	+
Гідроліз твіну-80	+	–	+	–	–	–
Пектолітичні ферменти	+	+	+	–	+	–
Амілолітичні ферменти	+	–	–	+	–	+
Пігмент	рожевий, коричневий	коричневий	бежевий	бежевий	коричневий	–

Примітки: «+» – позитивна реакція, «–» – негативна реакція.

Інші вісім штамів віднесено до групи 4 – грамнегативні, аеробні та мікроаерофільні палички та коки, роду *Pseudomonas*, оскільки вони були аеробними, рухливими, не потребували органічних факторів росту, утворювали пігменти бежевий та коричневий (табл. 2). Серед цих штамів шість – оксидазонегативні, гідролізують желатину (крім штаму № 10), деякі утворюють амілолітичні ферменти, переважно використовують нітроген мінеральних солей і утворюють лецитиназу. Враховуючи ці ознаки та дані щодо використання різноманітних субстратів як джерела вуглецю, 4 штами віднесено до *P. viridiflava* або *P. syringae*, що є дуже близькими, а штам № 10 – до *P. syringae*. Штами № 14 та 15 слабо оксидазопозитивні, продукують темно-коричневий дифундує у середовище пігмент. За цими ознаками та здатністю утилізувати різноманітні джерела вуглецю їх ідентифіковано як *P. gladioli*.

Єдиний із виділених грампозитивний штам представлений аеробними спорулюючими паличками, на підставі чого його віднесли до роду *Bacillus*.

Для встановлення здатності виділених штамів викликати патологічні зміни на рослинах за реакцією надчутливості як індикатора використано кімнатну рослину герань (*Pelargonium zonale*). На третю добу у місці введення суспензії штаму № 9 (рід *Pseudomonas*) спостерігалась невелика зона некрозу. На 14-ту добу спостерігались зміни листків, інюкульованих суспензіями штамів, у вигляді некрозів, зів'янення та пожовтіння. Один штам інтенсивно викликав місцевий некроз, дев'ять – повільно спричинювали зів'янення та пожовтіння, чотири – не викликали ніяких симптомів.

Із метою пошуку природних мікробів-антагоністів виділених штамів визначено їх взаємовідносини з колекційним штамом *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* IMB B-7186. Із літературних даних відомо, що бактерії цього виду, крім інсектицидного δ -ендотоксину, також продукують бактеріоцини з різноманітним спектром дії [14; 15].

**Ознаки штамів, віднесених до групи 4 – грамнегативні,
аеробні/мікроаерофільні палички та коки**

Ознака	Рід <i>Pseudomonas</i>							
	<i>P. syringae</i> або <i>P. viridiflava</i>					<i>P. syringae</i>	<i>P. gladioli</i>	
	2	5	7	8	9	10	14	15
Ріст в атмосфері повітря	+	+	+	+	+	+	+	+
Рухливість	+	+	+	+	+	+	+	+
Оксидаза	-	-	-	-	-	-	±	±
Каталаза	+	+	-	+	+	+	+	+
Гідроліз желатини	+	+	+	+	+	-	+	+
Гідроліз крохмалю	-	-	+	-	-	-	-	-
Використання азоту мінеральних солей	+	-	-	+	+	+	+	+
Лецитиназа	+	+	-	+	-	-	+	+
Пігмент	бежевий	бежевий	-	-	коричневий	бежевий	коричневий, дифундуючий	коричневий, дифундуючий

Примітки: «+» – позитивна, «±» – слабопозитивна, «-» – негативна реакція.

Для аналізу використовували одно- та семидобові культури *B. thuringiensis*. Однодобова культура проявила антагонізм лише до штаму № 7, семидобова – із різною силою уповільнювала ріст 11 з досліджених штамів (табл. 3).

Семидобовий штаму *B. thuringiensis* проявив антагоністичну активність приблизно до 79 % досліджених штамів, що свідчить про можливість використання спорулюючих штамів *B. thuringiensis* як засобів біологічного захисту рослин від бактеріозів.

Таблиця 3

Взаємовідносини *Bacillus thuringiensis* та виділених штамів

№ штаму	Таксономічне положення	Пригнічення росту досліджуваних штамів <i>B. thuringiensis</i>	
		1-добова культура	7-добова культура
1	<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	-	++
2	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	+
3	<i>Vibrionaceae sp.</i>	-	+
4	<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	-	++
5	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	++
6	<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	-	-
7	<i>Pseudomonas sp.</i>	++	+++
8	<i>P. sp.</i>	-	-
9	<i>P. sp.</i>	-	++
10	<i>P. sp.</i>	-	+
11	<i>Enterobacteriaceae sp.</i>	-	+++
12	<i>Vibrionaceae sp.</i>	-	-
14	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	++
15	<i>P. sp.</i>	-	++

Примітки: «+» – слабка позитивна реакція, «++» – помірна позитивна реакція, «+++» – сильна позитивна реакція, «-» – негативна реакція.

Висновки

Із 8 зразків, уражених бактеріозами овочевих культур, виділено 15 штамів бактерій, проведено їх ідентифікацію. 4 штами віднесено до родини Enterobacteriaceae, 2 – до родини Vibrionaceae, 8 – до роду *Pseudomonas* та 1 – до роду *Bacillus*. Встановлено фітопатогенність 10 виділених штамів відносно *Pelargonium zonale*: 2 представників

родина Enterobacteriaceae, 2 – родина Vibrionaceae та 6 штамів – роду *Pseudomonas*. Штам *B. thuringiensis* проявляє антагоністичну активність відносно 3 штамів родини Enterobacteriaceae, 3 – родини Vibrionaceae та 7 штамів фітопатогенних видів роду *Pseudomonas*.

Бібліографічні посилання

1. **Желдакова Р. А.** Фитопатогенные микроорганизмы / Р. А. Желдакова, В. Е. Мямин. – Мн. : БГУ, 2006. – 116 с.
2. **Воронкевич И. В.** Выживаемость фитопатогенных бактерий в природе. – М. : Наука, 1984. – 270 с.
3. **Новый** справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Ч. 2 / Под ред. В. А. Столярова. – М. : Професионал, 2005. – 1142 с.
4. **Чикин Ю. А.** Общая фитопатология. – Томск : Томск. гос. ун-т, 2001. – 168 с.
5. **Рабинович Г. Ю.** Санитарно-микробиологический контроль объектов окружающей среды и пищевых продуктов с основами общей микробиологии / Г. Ю. Рабинович, Э. М. Сульман. – Тверь : ТГТУ, 2005. – 220 с.
6. **Введение.** Бактерии и актиномицеты // Жизнь растений. – Т. 1. / Под ред. Н. А. Красильникова, А. А. Уранова. – М. : Просвещение, 1974. – 487 с.
7. **Черемисин Н. А.** Общая патология растений. – М. : Высшая школа, 1973. – 352 с.
8. **Захарченко Н.** Трансгенные растения с цекропином не болеют и не вянут // Наука и жизнь. – 2004. – № 1.
9. **Пересыпкин В. Ф.** Сельскохозяйственная фитопатология. – М. : Агропромиздат, 1989. – 480 с.
10. **Горленко М. М.** Фитопатология / Под ред. М. М. Горленко. – Л. : Колос, 1980. – 319 с.
11. **Методы** исследования возбудителей бактериальных болезней растений / К. И. Бельтюкова, М. С. Матышевская, М. Д. Куликовская, С. С. Сидоренко. – К. : Наукова думка, 1968. – 316 с.
12. **Определитель** бактерий Берджи. В 2 т. – Т. 1 / Под ред. Д. Хоулга, Н. Крига, П. Снита, Д. Стейли, С. Уилльямса. – М. : Мир, 1997. – 432 с.
13. **Лабораторний** практикум із курсу «Антибіотики» / А. І. Вінніков, Л. П. Голодок, Т. В. Скляр, Н. П. Черногор. – Д. : ДНУ, 2007. – 24 с.
14. **Bacteriocin-like** inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* / J. E. Barboza-Corona, H. Vázquez-Acosta, D. K. Bideshi, R. Salcedo-Hernández // Archives of Microbiology. – 2007. – Vol. 187, N 2. – P. 117–126.
15. **Enhanced** synthesis and antimicrobial activities of bacteriocins produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* / N. de la Fuente-Salcido, M. G. Alanís-Guzmán, D. K. Bideshi et al. // Archives of Microbiology. – 2008. – Vol. 190, N 6. – P. 633–640.

Надійшла до редколегії 14.08.2010