

БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ *PSEUDOMONAS VIRIDIFLAVA*, ІЗОЛЬОВАНИХ ІЗ НАСІННЯ ЦУКРОВИХ БУРЯКІВ

**Л.А. ПАСІЧНИК, доктор біологічних наук,
Л.М. БУЦЕНКО, кандидат біологічних наук
Інститут мікробіології і вірусології НАН України
К.П. ДВОРАК, аспірант*
Інститут біоенергетичних культур і цукрових
буряків НААН України**

*Із насіння цукрових буряків виділено та ідентифіковано бактерії *Pseudomonas viridiflava*, визначено їх біологічні особливості та порівняно отримані результати з даними інших дослідників, що також ізолювали та досліджували цей вид.*

Ізоляти, властивості, ідентифікація, *Pseudomonas viridiflava*.

Вільний від інфекції насіннєвий матеріал є однією з основних вимог, що забезпечує одержання високих і стабільних урожаїв сільськогосподарських культур. Водночас через насіння можуть розповсюджуватися збудники хвороб, які призводять до зниження якості самого насіння, так і до зниження продуктивності культур [3].

На поверхні та у внутрішніх тканинах насіння мікробіота є дуже різноманітною і здатною інтенсивно розвиватися [4]. Посівний матеріал цукрових буряків також є сприятливим субстратом для широкого кола мікро організмів. Зокрема результати виділення бактерій з поверхні насіння цукрових буряків, протруєного хімічними препаратами, свідчать про їх значну видову різноманітність. В складі мікробіоти оброблених протруйниками насінних - клубочків виявлені бактерії з родів *Aureobacterium*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Microbacterium*, *Micrococcus* та *Pseudomonas* [1].

Цукрові буряки під час вегетації уражуються багатьма збудниками хвороб різної етіології, тому дуже важливим є виявлення патогенних організмів на поверхні та всередині насіння для попереднього забезпечення можливості уникнути інфікування молодих рослин.

Мета досліджень – ідентифікація виділених ізолятів бактерій, визначення ряду їх біологічних особливостей для завчасного запобігання ініціації ними інфекційного процесу.

*Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук, професор В.Т. Саблук.

Матеріали та методика досліджень. Для ізоляції бактерій насіння після 15 хв промивання проточною та стерильною водою розтирали з 0,5 мл фізіологічного розчину і використовували для бактеріологічного посіву на поверхню картопляного агару. Бактерії культивували в термостаті за температури 28 °С.

Морфологічні, культуральні та фізіолого-біохімічні властивості виділених бактерій визначали, використовуючи класичні методи [2, 8], ідентифікацію здійснювали відповідно до визначника Берджі [6].

Для визначення наявності пектолітичних ферментів вивчали здатність ізолятів бактерій мацерувати шматочки картоплі та буряка. У виділених ізолятів бактерій визначали також здатність індукувати реакцію надчутливості у листках тютюну. Патогенні властивості ізолятів визначали шляхом штучного зараження цукрових буряків та квасолі. Використовували суспензію бактерій (в концентрації 1×10^9 КУО/мл стерильної водогінної води), яку наносили на поверхню листків рослин із наступним пораненням голкою [2].

Спектр жирних кислот (ЖК) у загальних клітинних ліпідів досліджували за методом газорідинної хроматомас-спектроскопії. Для гідролізу бактеріальних клітин, їхніх ліпідів і метилювання ЖК бактеріальну масу витримували у 1,5%-ному розчину H_2SO_4 в метанолі в запаяних ампулах протягом однієї години при температурі 80 °С. Метилкові ефіри ЖК екстрагували сумішшю ефір – гексан (1:1). Підготовлені зразки аналізували в хроматомас-спектричній системі Agilent 6800N/5973 inert.

Результати досліджень. Із зразків насіння цукрових буряків, що дали проростки без видимих ознак ураження було ізольовано різні морфологічні типи ізолятів бактерій, які формували колонії жовтого, сірого, оранжевого кольорів.

Після первинної перевірки патогенності виділених ізолятів, яку ми здійснювали шляхом штучного зараження молодих рослин цукрових буряків та квасолі в польових умовах та теплиці відібрано 4 ізоляти, що викликали на листках квасолі симптоми ураження у вигляді темних, некротичних плям. Відібрані ізоляти також ініціювали реакцію надчутливості в листках тютюну: в місці введення бактеріальної суспензії утворювалася світло-коричнева зона, що з часом темнішала і спостерігали некроз тканин. Тому, встановивши наявність серед виділених патогенних бактерій, ми визначали їх біологічні властивості для ідентифікації.

Поглиблене вивчення біологічних особливостей патогенних ізолятів, яке порівнювали з даними Визначників показало, що за такими ознаками як фарбування за Грамом, рухливість, форма клітин, наявність флуоресціюючого пігменту, відсутність оксидази, аеробне використання глюкози, відсутність використання сахарози як єдиного джерела вуглецевого живлення, відсутність редукції нітратів, не

утворення індолу та сірководню виділені нами ізоляти ідентичні виду *Pseudomonas viridiflava* (табл. 1).

1. Морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості ізольованих з насіння бактерій

Ознака	Ізоляти, виділені з насіння цукрових буряків
Забарвлення за Грамом	—
Рухливість	+
Спороутворення	—
Форма клітин	П
Флуоресценція	+
Реакція надчутливості	+
Пектолітична активність	+
Використання джерел вуглецю:	
Глюкоза (анаеробно)	—
Глюкоза (аеробно)	+
сахароза	—
манітол	—
сорбітол	—
рамноза	—
арабіноза	+
аргінін	+
Наявність ферментів:	
оксидази	—
аргініндігідролази	—
Редукція нітратів	—
Утворення індолу	—
Утворення H ₂ S	—
Утворення левану	—

Примітка: «+» - наявність ознаки; «—» - відсутність ознаки; «П» - палички

Для ідентифікації бактерій роду *Pseudomonas* досить часто використовують LOPAT тест, що включає ряд ознак, а саме: L – здатність до утворення левану, O – наявністьоксидази, P – здатність мацерувати рослинні тканини, A – наявність аргініндігідролази, T – розвиток реакції надчутливості в листках тютюну. За цими ознаками ізольовані нами бактерії також ідентичні *P. viridiflava*, оскільки не продукують леван, є оксидазонегативними, спричинюють мацерацію рослинних тканин, не мають аргініндігідролази та викликають реакцію надчутливості в листках тютюну.

При визначенні пектолітичної активності ізолятів, патогенність яких ми підтвердили і попередньо ідентифікували як представників *P. viridiflava*, було встановлено, що вони викликають темно-коричневий, чітко відокремлений від іншої тканини некроз на шматочках картоплі та буряку.

При здійсненні ідентифікації бактерій важливою ознакою є характеристика жирнокислотного складу клітинних ліпідів (таблиця 2). За нашими даними у бактерій, що ідентифіковані як *Pseudomonas viridiflava*, виявлений спектр жирних кислот з довжиною ланцюга від C₁₀ до C₁₈. атомів вуглецю (табл. 2).

2. Склад жирних кислот клітинних ліпідів ізолятів, виділених з насіння цукрових буряків

Кислота	Вміст ЖК, % від загальної площі піків
3-гідроксидеканова (C _{10:0} 3 OH)	6,53
Додеканова (C _{12:0})	7,04
2-гідроксидодеканова (C _{12:0} 2 OH)	8,54
3-гідроксидодеканова (C _{12:0} 3 OH)	1,51
тетрадеканова (C _{14:0})	0,50
гексадеканова (C _{16:0})	67,84
октадеканова (C _{18:0})	6,03
октадеценова (C _{18:1})	2,01
	100

У досліджуваних штамів переважала кількість гексадеканової кислоти 67,84 %. Вміст 3-гідроксидеканової, додеканової та октадеканової кислот між собою відрізнявся несуттєво і перебував у межах від 6,03 % до 7,04 %. Як вважають деякі дослідники [10] саме профілі гідроксильованих жирних кислот можуть бути використані як додатковий критерій для з'ясування філогенетичних взаємозв'язків між мікроорганізмами і вирішення питань таксономії.

Таким чином, на підставі вивчення морфологічних і культурально-біохімічних властивостей досліджувані ізоляти ідентифіковані як *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder 1930) Dowson 1939. Виділені та ідентифіковані штами були порівняні за спектром ознак і встановлено їх ідентичність з даними, отриманими за здійснення ідентифікації бактерій цього виду, ізольованих з широко поширеного серед бур'янових угруповань пірію повзучого [5].

Штами *P. viridiflava* належать до епіфітних або опортуністичних видів бактерій, але за певних умов можуть бути причиною ураження рослин. При перебуванні цього виду в епіфітному стані на рослині помірні температури, часті дощі та високі показники відносної вологості повітря будуть сприяти їх поширенню [7]. Окрім широкого кола рослин-господарів серед сільськогосподарських культур *P. viridiflava* може виживати на бур'янах, зокрема на пірію [5], дурмані, гладкій виці, дикій гірчиці [9].

Висновки

Виділені з насіння цукрових буряків бактерії за сукупністю морфологічних, культурально-біохімічних, хемотаксономічних ознак ідентифіковані як представники виду *Pseudomonas viridiflava*, які в основному, знаходяться на рослинах в епіфітному стані, проте за певних умов здатні ініціювати інфекційний процес.

Список літератури

1. Канивец В.И. Бактериальная микрофлора протравленных семян сахарной свеклы / В.И. Канивец, И.Н. Пищур. // Микробиология. – 2001. – Т.70, №3. – С. 370-373.
2. Методы исследований бактериальных болезней растений / К.И.Бельтюкова, М. С. Матышевская, М. Д.Куликовская, С.С.Сидоренко. – К.: Наук. думка, 1968. – 316 с.
3. Піковський М.Й. Патологія насіння сільськогосподарських культур // М.Й. Піковський, М.М. Кирик. – К.: Вид центр НАУ, 2007. – 96 с.
4. Фітопатогенні бактерії. Бактеральні хвороби рослин: Монографія / [Р.І. Гвоздяк, Л.А. Пасічник, Л.М. Яковлева та ін]; за ред. В.П. Патики. – К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
5. Фітопатогенные бактерии пырея ползучего в посевах пшеницы / Л.М. Яковлева, В.П. Патыка, Р.И. Гвоздяк, Т.Н. Щербина. // Мікробіол. журнал. – 2009. – Т.71, №3 – С.30 – 37.
6. Bergey's Manual of Systematic bacteriology. Second Edition, Vol. 2, part B. / D.J. Brenneis, N.R. Krieg, J.T. Staley.- Springeu – 2005. – 1106 p.
7. González A.J. Identification of an emergent and atypical *Pseudomonas viridiflava* lineage causing bacteriosis in plants of agronomic importance in a Spanish region. / A.J. González, M.R. Rodicio, M.C. Mendoza. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, № 5. – P. – 2936–2341.
8. Klement Z. Methods in phytobacteriology. / Z. Klement, K. Rudolf, D.C. Sands. – Budapest: Akademiai Kiado, 1990. – 568 p.
9. Mariano R.L. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. / R.L. Mariano, S.M. McCarter. // Microb Ecol. – 1993. – Vol. 26, №1. – P. – 47–58.
10. Stead D. E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1992. – Vol. 42, №2. – P. 281 – 295.

*Из семян сахарной свеклы выделены и идентифицированы бактерии *Pseudomonas viridiflava*, определены их биологические особенности и проведено сравнение полученных результатов с данными других исследователей, которые также изолировали и исследовали этот вид.*

Изоляты, свойства, идентификация, *Pseudomonas viridiflava*

*Bacteria *Pseudomonas viridiflava* were isolated and identified from sugar beet seeds. Its biological characteristics were determined and*

received results were compared with data of other researchers that also had isolated and investigated this species.

Isolates, properties, identification, Pseudomonas viridiflava