

Захист і карантин рослин. 2019. Вип. 65.

УДК: 606.63:602.6:579.8:635.82

DOI: <https://doi.org/10.36495/1606-9773.2019.65.60-75>

<sup>1</sup>Н.В. ЖИТКЕВИЧ

<sup>2</sup>Т.В. ІВАНОВА, кандидат сільськогосподарських наук

<sup>3</sup>Т.В. ТАРАСЮК

<sup>4</sup>М.В. ПАТИКА, доктор сільськогосподарських наук

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології НАН України,

вул. Заболотного, 148, м. Київ, 03048, Україна,

<sup>2-4</sup>Національний університет біоресурсів і природокористування

України, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041, Україна,

e-mail: <sup>2</sup>tivanova1@ukr.net

## МОРФОЛОГО-КУЛЬТУРАЛЬНІ ТА ФІЗІОЛОГО-БІОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ПЕЧЕРИЦІ ДВОСПОРОВОЇ

**Мета.** Вивчення функціональних морфолого-культуральних, фізіолого-біохімічних особливостей ізолятів патогенних бактерій за вирощування печериці двоспорової. **Методи.** Предметом дослідження слугували 16 ізолятів патогенних бактерій, виділених з *Agaricus bisporus*. Вони проявлялися як первинні інфекції на стадії активного росту гриба і виявилися типовими лише для печериці двоспорової. У роботі використали біотехнологічні методи досліджень. За допомогою біохімічних методів визначали трофічні особливості патогенних бактерій з метою розробки біотехнологій щодо контролю їхнього поширення. Оксидазну активність бактерій визначали за методом Ковача на мембранному фільтрі, попередньо змоченому *NN*-диметил-*p*-фенілен-діамін сульфатом. Каталазну активність визначали, додаючи до краплі культури розчин перекису водню 10%. **Результати.** Визначили джерела вуглецевого живлення патогенних бактерій за допомогою тест-системи. Ізолят 9.4 утилізує цукри (кислозу, декстрозу, галактозу, що відносяться до моносахаридів), мелібіозу, *L*-арабінозу, маннозу, ОНПГ (орто-нітрофеніл- $\beta$ -галактопіраноза), ескулін, цитрат, малонат. Ізолят 6.2 за тестування показав позитивний результат на кислозу, декстрозу. Ізолят 6.1 використовує цукри — декстроза, трега-loза, мелібіоза, манноза. Ізолят 9.5 засвідчує присутність ОНПГ, ескуліну, цитрату та малонату і відсутність каталази. Позитивну реакцію на оксидазу мають ізоляти 11.1 та 9.5. Слабку реакцію мали ізоляти 6.2 та 13.2. Джерелами вуглецевого живлення є цукри групи моносахаридів (кислоза, декстроза, галактоза), полісахаридів та амінокислоти. Реакція

на розщеплення вуглеводів показала, що всі ізоляти мали окисний тип метаболізму. **Висновки.** Дослідили морфолого-культуральні особливості ізолятів патогенних бактерій печериці двоспорової, виділених із плодових тіл *Agaricus bisporus*. Вивчили фізіолого-біохімічні властивості бактерій, реакції на розщеплення вуглеводів на синтетичному середовищі, оксидазну активність бактерій за методом Ковача та каталазну активність. Провели ідентифікацію отриманих ізолятів, порівнюючи їх із властивостями бактерій збудників бактеріозів даного гриба, уже описаних в статтях та у Визначнику бактерій Берджі.

### **патогенні бактерії, *Agaricus bisporus*, морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні властивості**

Цінність їстівних грибів зумовлена високим вмістом білка, клітковини, вітамінів, мінералів та низьким вмістом жиру [1, 2]. Крім того, гриби мають більший вміст білка, ніж овочі. Вони містять багато різних біологічно активних сполук, що позитивно впливають на здоров'я людини [3]. Печериці містять велику кількість золи, 80—120 г/кг сухої речовини (головним чином калію, фосфору, магнію, кальцію, міді, заліза та цинку), вуглеводи (включаючи хітин, глікоген, трегалозу та манітол), клітковину,  $\beta$ -глюкани, геміцелюлозу та пектинові речовини. Глюкоза, манітол і трегалоза є надлишковими цукрами у культивованих їстівних грибах, але фруктоза та сахароза трапляються в малих кількостях. Печериці вважають джерелом вітамінів з високим рівнем рибофлавіну (вітаміну В2), ніацину, фолатів та слідів вітаміну С, В1, В12, Д і Е. Гриби — це єдине джерело харчування, яке містить вітамін D. Дикі гриби містять вітамін D2 на відміну від культивованих, адже культивовані зазвичай вирощують за слабого освітлення, а для отримання вітаміну D2 потрібне ультрафіолетове світло [3, 4].

Печериця двоспорова, як один з найпоширеніших грибів, дуже вибаглива до умов вирощування. Для її розвитку не потрібне світло, висока освітленість негативно впливає на розвиток гриба. Як зазначають вчені, температурний режим залежить від фази розвитку печериці [1]. Для проростання міцелію температура субстрату має становити 24—28°C, а в період плодоношення — 18—22°C. За температури 33°C міцелій може загинути, а за температури 3°C її ріст припиняється, хоча життєздатність зберігається навіть за температури нижче 0°C. Оптимальна температура повітря для розвитку плодового тіла гриба — 16°C. Плодоношення припиняється за температури менше як 10°C та понад 20°C. Печериця вимагає певних параметрів вологості живильного середовища і повітря. Під час росту міцелію вологість субстрату має становити 67—69%, а під час плодоношення — 65—67%. Різкі коливання температури і відносної вологості повітря можуть негативно впливати на розвиток культури [1]. У живленні гриба найбіль-

шого значення мають азотовмісні сполуки, з яких він використовує протеїни, пептони, амінокислоти та амонійні солі, також вуглеводи (целюлоза, геміцелюлоза і лігнін). Для розвитку необхідні також калій, магній, сірка, фосфор, залізо і кальцій. Щоб забезпечити одержання високих урожаїв, всі перелічені елементи мають знаходитися в субстраті у рівномірному співвідношенні. Для росту гриба оптимальним є рН 6,5—7,5 [1, 2].

Найчастіше за вирощування печериці трапляються бактеріальні інфекції — бура плямистість та муміфікація.

**Бура плямистість.** Збудники — бактерії *Pseudomonas tolaasii* Paine та *P. Ginger i Preeceet* Wong. Це палички розміром 0,7—3,0 мкм, рухаються за допомогою джгутиків, не утворюють жовто-оранжевих пігментів, оксидазопозитивні, використовують трегалозу. Мають аргініндегідролазну систему, не містять лізиндекарбоксилазу, орнітиндекарбоксилазу, амілазу, не засвоюють целобіозу, саліцин, гліколеву кислоту [5]. Зокрема, *P. tolaasii* може заражати майже всі види грибів. Хвороба виникає на плодових тілах у вигляді дрібних блискучих жовтих чи темно-жовтих (а пізніше шоколадного кольору) плям на поверхні шапінки. Плями розташовані на поверхні, в середину тканини шапінки вони проникають не більше ніж на 1—2 мм. Плодові тіла, уражені бактеріальною плямистістю, злегка в'язкі і липкі на дотик. Цей патоген зумовлює втрати врожаю 5—10% [5]. На сьогодні не розроблено заходів захисту, щоб повністю знищити дане захворювання.

**Муміфікація.** Збудник хвороби — бактерія *Pseudomonas spp.* Schisler (Singer, Sigel). Вважається, що клітини патогена проникають у клітинні стінки гіфів міцелія гриба, де вони розмножуються і призводять до порушення обміну речовин. При розрізуванні плодового тіла відчувається скрипіння, а тканина на розрізі — коричневого забарвлення. Інколи виникає порожнина, яка заповнюється бактеріальним слизом. Нині йде пошук біотехнологічних прийомів для захисту від цієї бактеріальної інфекції [5—7].

**Хворобу гіменофора** викликає *Pseudomonas cichorii*. Цим захворюванням уражується гриб *Agaricus bisporus*. Бактерії розвиваються на пластинках гіменофору, які поступово стають драглистими та руйнуються [5—8]. Симптоми: кремово-сірі бактеріальні плями, що спостерігаються на гіменофорі. Вони оточені темно-коричневими або чорними плями, які збільшуються в розмірі до 2 мм або більше. Плями можуть об'єднуватись. У складних випадках тканини руйнуються і стають білого кольору. На ніжці гриба, як правило, розвиваються дрібні поздовжні розколи. Вони стають коричневими з часом. Характерно, що прояв хвороби стає більш серйозним з кожною наступною хвилиною плодоношення.

Як індикатор стресового стану грибів використовують фермента-

тивну активність, зокрема пероксидазну. Нерідко важливого значення у антиоксидантному статусі грибів відіграє фермент поліфенолоксидаза, який за напружених умов каталізує механізми утворення захисних бар'єрів механічної або хімічної природи.

**Мета досліджень** — вивчити функціональні морфолого-культуральні, фізіолого-біохімічні особливості ізолятів патогенних бактерій при вирощуванні печериці двоспорової.

**Матеріали і методика досліджень.** Матеріалом для дослідження були плодові тіла печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*) (штам Silvan 130). Для експерименту відбирали зразки із вираженими ознаками ураження і розвитку патогенів та без них. В якості контролю слугували плодові тіла печериці, які відбирали за результатами візуального огляду на симптоми пошкодження. Досліди виконували у триразовому повторенні упродовж 2018—2019 рр. на кафедрі екобіотехнології і біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України та в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Для виділення та ідентифікації патогенів з печериць мікробіологічним методом відбирали зразки із явними ознаками (жовтуваті плями круглої чи неправильної форми, які з часом стають темнішими, набувають коричневого кольору; з деформацією плодових тіл; уражені поверхні покриті шаром коричневого слизу та сухими плямами).

Вивчення біохімічних властивостей патогенних бактерій необхідне для визначення їхньої родової і видової належності. Для виявлення і вивчення цих властивостей культуру бактерій висівають на поживні середовища, що містять у своєму складі різноманітні джерела вуглецю [5—9].

Патогенні бактерії засівають добовою культурою бактерій на поживні середовища. Після інкубування у термостаті вираховують результати ферментації вуглецю на 2-й, 4-, 7-, 10-й дні, відзначаючи початок кислото- і газоутворення. Утворення кислоти або лугу в пробірках відбувається зі зміною кольору живильного середовища. Деякі види патогенних бактерій спричиняють повільне кислотоутворення, тому пробірки витримують в термостаті до 14-ти діб задля переконання, що у бактерій є здатність розщеплювати вуглеводи [9—11].

Оксидазну активність (наявність цитохром-с-оксидази) визначають за методом Ковача. Бактеріальну масу однодобової культури платиновою петлею наносять на фільтрувальний папір, попередньо змочений 1% розчином NN-диметил-п-фенілен-діамін сульфату. Позитивна оксидазна реакція (темно-червоне забарвлення бактеріальної маси) з'являється за 5—10 с. Мікроорганізми є оксидазонегативними якщо колір бактеріальної маси не змінюється [11—13].

Каталазну активність у ізолятів бактерій виявляють за допомогою

10% розчину перекису водню. Дводобову культуру бактерій розтирають на скельці й додають по краплі розчин перекису водню. Поява бульбашок газу свідчить про наявність каталази [11—13].

### **Результати.**

*Визначення культурально-морфологічних властивостей.* На 4—5-ту добу після висівання гомогенізованої маси гриба на щільних живильних середовищах в чашках Петрі утворились видимі колонії бактерій. Зовнішній вигляд колоній, їхня структура і консистенція мають значення для діагностування патогенних бактерій. У кожного виду бактерій властивості колоній визначаються внутрішніми особливостями мікроорганізму.

Колонії досліджували за допомогою лупи та за малого збільшення мікроскопа. Визначали їхню кількість, характер росту, колір, структуру, профіль. Вимірювали лінійкою діаметр та визначали форму колоній. Консистенцію визначали тоді, коли пересівали їх на скошений агар за допомогою петлі (в'язкі колонії тягнулися за петлею) (табл. 1, 2). Перед посівом на середовище КГА потрібні колонії, які схожі на бактеріальні, обводили маркером та нумерували.

*Виділення чистих культур мікроорганізмів.* Для подальших досліджень з оцінки видової належності мікроорганізмів необхідним кроком було виділення чистих культур для визначення належності ізолятів та окремих колоній до біологічних видів, типів та родів.

Для пересіву колоній на скошений агар використовували стерильні інструменти та пробірки. В асептичних умовах мікробіологічною петлею переносили матеріал з чашки Петрі в пробірку.

Пробірки з ізолятами поміщали в термостат на 2—3 доби, утримували за температури 20°C. Після інкубації спостерігали неконтамінованість ізолятів (рис. 1).

*Визначення патогенних властивостей щодо печериці двоспорової.* Через 3 доби після висіву, з колоній, що проросли, приготували бактеріальні суспензії. Використовували бактеріальну



**Рис. 1. Чиста культура виділеного з печериць патогена (ізолят 6.1)**

## 1. Морфологічна характеристика колоній у Досліді №1

Ознаки	№ 1	№ 2.1	№ 2.2	№ 9.1	№ 9.2	№ 9.3	№6
Форма	Правильна	Правильна	Правильна	Неправильна	Кругла	Правильна	Правильна
Розмір	Середній (2–4 мм)	Точковий (до 1 мм)	Середній (2–4 мм)	Середній (2–3 мм)	Середній (2–3 мм)	Великий (понад 5 мм)	Точковий (до 1 мм)
Поверхня	Блискуча, гладка	Блискуча	Блискуча	Матова	Матова	Матова	Блискуча
Профіль	Підвищений	Підвищений	Опуклий	Краплеподібний	Опуклий	Підвищений	Підвищений
Прозорість	Прозора	Прозора	Прозора	Непрозора	Непрозора	Непрозора	Прозора
Колір	Жовтий	Безбарвний	Безбарвний	Світло-жовтий	Сірий	Жовтий	Жовтий
Контур краю	Рівний	Рівний	Рівний	Рівний	Хвилястий	Рівний	Рівний
Структура	Однорідна	Однорідна	Однорідна	Однорідна	Однорідна	Однорідна	Однорідна
Консистенція	Пастоподібна	В'язка	В'язка	В'язка	В'язка	Пастоподібна	Суха

## 2. Морфологічна характеристика колоній у Досліді №2

Ознаки	№ 11.1	№ 12.1	№ 12.2	№ 13.1	№ 13.2
Форма	Правильна	Правильна	Неправильна	Кругла	Кругла
Розмір	Великий (5–7 мм)	Середній (3–2 мм)	Середній (2–4 мм)	Точковий (менше 1 мм)	Середній (2–3 мм)
Поверхня	Блискуча, волога	Блискуча	Матова	Блискуча	Блискуча
Профіль	Підвищений	Опуклий	Підвищений	Підвищений	Плоский
Прозорість	Непрозора	Прозора	Непрозора	Непрозора	Непрозора
Колір	Оранжевий	Білий	Безбарвний	Жовтий	Жовтий
Контур краю	Рівний	Рівний	Хвилястий	Рівний	Рівний
Структура	Однорідна	Однорідна	Однорідна	Неоднорідна	Однорідна
Консистенція	В'язка	Суха	Пастоподібна	В'язка	Пастоподібна



Після першого інокулювання на місцях уколів не спостерігали характерних симптомів ураження. У порівнянні з контролем припускаємо, що виділені нами ізоляти виявились не патогенними (рис. 2).

Результати штучного зараження визначали через 4–7 діб за 4-бальною шкалою, з урахуванням ступеня і характеру появи симптомів

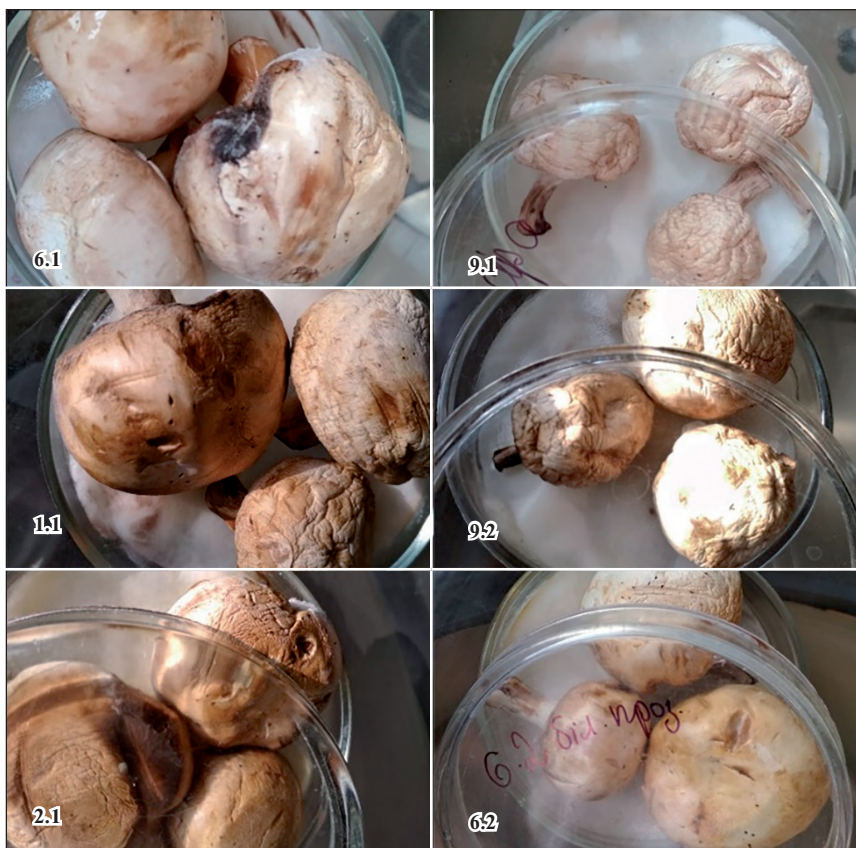


Рис. 2. Перше інокулювання *Agaricus bisporus* відібраними ізолятами

хвороби на шапинці та ніжці, а також за діагностики внутрішніх проявів захворювання (табл. 3).

Також штучно заражали печериці фітопатогенними бактеріями з Колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України. Використовували ізоляти видів: *Pseudomonas fluorescens* — IMB 8573, *Pseudomonas PV. Syringae* — IMB 8511, *Pseudomonas marginalis* — IMB 9175.

Зараження виконували за аналогічною методикою. Результати експерименту показали, що за зовнішньої і внутрішньої діагностики плодових тіл лише на грибах, уражених ізолятом *Pseudomonas marginalis*, з'явилися симптоми близькі до бактеріального ураження. Після повторного зараження штамом *Pseudomonas marginalis* — IMB 9175 було підтверджено, що він є вірулентним щодо *Agaricus bisporus* (рис. 4).

Після детального дослідження штучно інфікованих грибів, для подальшої ідентифікації було відібрано шість зразків з найбільш вираженими симптомами бактеріальних уражень.

*Морфологічні та фізіологічні властивості ізолятів.* Після того, як було доведено патогенність ізолятів, досліджували морфологію клітин.

### 3. Визначення вірулентних властивостей отриманих ізолятів

Ізолят	Агресивність, бал	Характеристика
P. marginalis	4	Коричневі плями, на місці уколу спостерігаються впадини
9.3-1	4	Ураження поширюється, займає 2/3 гриба
9.1-1	4	Сильне гниття по всій поверхні гриба. На місці уколу спостерігаються впадини. За розрізу внутрішня тканина темно-коричневого кольору
6.2-2	4	На поверхні плями чорно-коричневого кольору, за розрізу спостерігається коричневе забарвлення внутрішньої тканини
6.1-3	4	На місці ін'єкції спостерігаються темно-коричневі плями. Гниття на всіх зразках
3.1-2	2	Ззовні видно сліди від уколів. За розрізу спостерігається початок гниття
3.1-1	3	На місці уколу видиме зараження. Гниття ніжки та шапинки
2.1-1	4	На місці уколів спостерігається зелене забарвлення тканини. Видиме гниття
2.2-1	2	На місці ін'єкції майже не помітно змін. Початок гниття ніжки та шапинки
1.2-1	4	Тканина слизова, на місці уколу спостерігається потемніння тканини



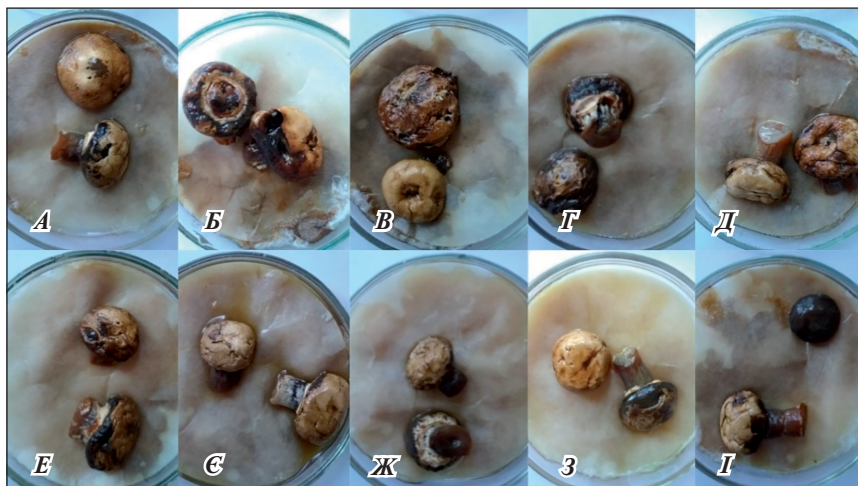


Рис. 3. Характерні симптоми ураження бактеріальними хворобами печериці двоспорової:

А — ізолят «*P. marginalis*» (контроль);  
 Б — ізолят 9.3-1; В — ізолят 9.1-1; Г — ізолят 6.2-2;  
 Д — ізолят 6.1-3; Е — ізолят 3.1-2; Є — ізолят 3.1-1;  
 Ж — ізолят 2.2-1; З — ізолят 2.1-1; І — ізолят 1.2-1



*P. fluorescens*

*P.VV. Syringae*

*P. marginalis*

Рис. 4. Печериці інкульовані штамами із Колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України

Для цього готували препарати (незабарвлені «роздавлена крапля» і забарвлені), які розглядали під мікроскопом. Препарати готували з одноклонової культури, вирощеної на скошеному агарі.

За результатами досліджень препарату «роздавлена крапля» виявили, що одержані ізоляти мали форму коротких паличок з полярними джгутиками (лофотрихи) та здійснювали поступальні рухи (табл. 4).

#### 4. Морфологічна та фізіологічна характеристика обраних ізолятів

№, ізоляту	Забарвлення за Грамом	Рухливість	Форма клітин	Джгутики	Спороутворення
9.1-1	—	+	П	+	—
6.2-2	—	+	П	+	—
6.1-3	—	+	П	+	—
2.1-1	—	+	П	+	—
1.1-1	—	+	П	+	—
9.3-1	—	+	П	+	—

*Примітки: «+» — наявність ознаки; «—» — відсутність ознаки; «П» — палички*

Після забарвлення за Грамом було встановлено, що одержані ізоляти однорідні за морфологічними ознаками. Бактерії були червоного та рожевого кольорів, що свідчить про їхню грамнегативність (рис. 5). Особливістю є те, що в клітинній стінці бактерій міститься тільки 10% муреїну та відсутні тейхоеві кислоти.

Всі отримані ізоляти виявились грамнегативними, рухаються за допомогою джгутиків, паличками, що не утворюють спор.

Визначення біохімічних властивостей патогенних бактерій. Для ідентифікації виділених культур мікроорганізмів про-

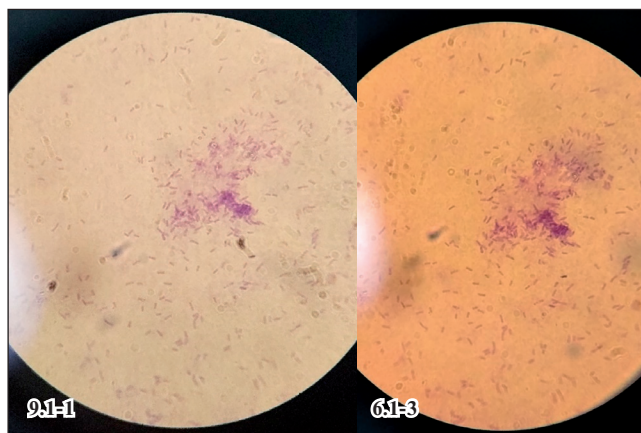


Рис. 5. Фарбування за Грамом ізолятів 9.1-1 та 6.1-3

водили реакції на розщеплення вуглеводів на синтетичному середовищі Омелянського з внесенням відповідних вуглеводів, та спостерігали на 2-й, 4-, 7- і 10-й дні результати ферментації. Оксидазну активність бактерій за методом Ковача визначали на мембранному фільтрі, попередньо змоченому NN-диметил-п-фенілен-діамін сульфатом. Каталазну активність визначали, додаючи до каплі культури розчин перекису водню 10%. За позитивної реакції (наявності каталази) перекис водню буде розкладатися з утворенням води та виділенням вуглекислого газу у вигляді бульбашок. Результати наведено в таблиці 5.

Як видно з таблиці, ізолят № 9.3-1 має негативний результат на каталазу. Позитивну реакцію на оксидазу показали ізоляти № 1.1-1 та № 9.3-1. Слабку реакцію мали ізоляти № 6.2-2 та № 2.1-1. Реакція на розщеплення вуглеводів показала, що всі ізоляти мали окисний тип метаболізму.

**5. Біохімічні властивості бактеріальних штамів, ізольованих із уражених тканин печериці двоспорової**

№ ізоляту	Оксидаза за Ковачем	Каталаза	Метаболізм глюкози
9.1-1	—	+	O
6.2-2	+/-	+	O
6.1-3	—	+	O
2.1-1	+/-	+	O
1.1-1	+	+	O
9.3-1	+	—	O
<b>Примітки:</b> «+» — наявність ознаки; «—» — відсутність ознаки; «O» — окисний			

## ВИСНОВКИ

Виділено ізольовані колонії мікроорганізмів з плодових тіл печериці двоспорової *Agaricus bisporus*. Після інкубації отримали колонії, різні за культурально-морфологічними властивостями. Це дало змогу провести дослід з визначення належності ізолятів до біологічних видів, типів та родів а також для приготувати суспензій щоб інокулювати плодові тіла печериць.

Доведено патогенність ізолятів щодо печериці. Після штучного зараження грибів встановлено, що ізоляти 9.3-1, 9.1-1, 6.2-2, 6.1-3, 3.1-2, 3.1-1, 2.2-1, 2.1-1 та 1.2-1, а також штамі *Pseudomonas marginalis* — ІМВ — 9175 із колекції культур мікроорганізмів відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України патогенні. За 4-баловою шкалою, з урахуванням ступеня і характеру появи симптомів хвороби на шапинці та ніжці,

а також за діагностики внутрішніх проявів захворювання відібрано 6 зразків, які показали найвищі бали.

Визначили фізіологічні, морфологічні та біохімічні властивості досліджуваних ізолятів. Вивчивши морфологічні та біохімічні властивості зазначаємо, що всі отримані нами ізоляти, виявились грам-негативними паличкоподібними бактеріями, які рухаються за допомогою джгутиків, не утворюють спор.

Провівши реакції з визначення біохімічних властивостей, можна зробити висновок, що ізолят № 9.3-1 має негативний результат на каталазу. Позитивну реакцію на оксидазу показали ізоляти № 1.1-1 та № 9.3-1. Слабку реакцію мали ізоляти № 6.2-2 та № 2.1-1. Реакція на розщеплення вуглеводів показала, що всі ізоляти мали окисний тип метаболізму.

Провели ідентифікацію отриманих ізолятів, порівнюючи їх із властивостями бактерій, збудників бактеріозів даного гриба, уже описаних в оригінальних статтях та у Визначнику бактерій Берджі.

Ізолят 9.3-1, виділений із плодових тіл печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*), не відповідає властивостям бактерій роду *Pseudomonas*, екстрагованих з плодових тіл грибів.

Особливістю ізоляту 6.2-2 є його властивість забарвлювати живильне середовище в коричневий колір (рис. 3. — А). За даними літератури така особливість характерна для *Pseudomonas agarici*. Ізолят 6.1-3 має рожевий пігмент, який проявляється через 7 діб після посіву на скошений агар, що не є характерним для представників роду *Pseudomonas* (рис. 3.7 — Б). Можна припустити, що він належить до *Erwinia rhapsodici* — це патоген, який продукує чіткий дифузійний рожевий пігмент на середовищі КГА.

Характерною особливістю ізоляту 2.1-1 є те, що він фарбує середовище в зелений колір. Ця властивість притаманна *Pseudomonas fluorescens*, який впливає на середовище за допомогою пігмента піовердина та фруоресцеїна.

## БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. Kalac P.A. Review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(2): P. 209—218. doi: 10.1002/jsfa.5960.
2. Іванова Т.В. Біотехнологія їстівних грибів. *Компринт*. 2018 (2). 165 с.
3. Sanguinetti M. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*. 2015; 2015: 376387: doi: 10.1155/2015/376387
4. Pereima I. V., Ivanova T. V. Stimulation of growth of species of the fungus of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. at a glucose nutrition. *Biotechnologia Acta*. 2017, 10(6), P. 45—52. doi: org/10. 15407 / biotech10.06.045

5. Патики В.П., Пасічник Л.А., Данкевич Л.А. Діагностика фітопатогенних бактерій: Методичні рекомендації. Київ, 2014. 57 с.
6. Іванова Т.В., Ковалишина Г.М. Біотехнології отримання міцелію *Pleurotus ostreatus* на зерні різних сортів пшениці. Збір. наук. праць «Миронівський вісник». Т.6, 2018. С. 25—30.
7. Ivanova, T.V. et all. New approaches extraction of viral RNA from edible mushrooms. *Scientific Journal «ScienceRise»*, 2015,1 (15), P. 44—46.
8. Радченко О.С. Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів та методи їх визначення: Навчальний посібник. ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. 211 с.
9. Патики В.П., Пасічник Л.А., Гвоздяк Р.І., Петриченко В.Ф., Корнійчук О.В., Калініченко А.В., Буценко Л.М., Житкевич Н.В. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. ТОВ Віндрук. 2017. 432 с.
10. Гадзало Я.М., Патики М.В., Заришняк А.С. Агробіологія ризосфери рослин. Аграрна наука. 2015. 368 с.
11. Патики Н.В., Колодяжний А.Ю., Ібатуллін І.І. Оцінка метагеному та виявлення функціонально значущих поліморфізмів прокариотів ґрунту методом піросекціонування. *Мікробіологічний журнал*. 2016, 78 (2): С. 43—51.
12. Патики Т.І., Патики М.В., Патики В.П. Філогенетичні взаємозв'язки між серологічними варіантами *Bacillus thuringiensis*. *Біополімери і клітина*. 2009. 25 (3):С. 240—244.
13. Орлова О.В., Воробйова Н.І., Свиридова О.В., Андронов Е.Є., Колодяжний А.Ю., Москалевська Ю.П., Патики М.В. Склад та функціонування мікробних угруповань при розкладанні соломи злаків у дерново-підзолистому ґрунті. *Сільськогосподарська біологія*. 2015, 50 (3). С. 305—314.
14. Патики М.В., Круглов Ю.В., Бердников А.М., Патики В.Ф. Роль *Linum usitatissimum* L. у формуванні мікробних угруповань підзолистих ґрунтів. *Мікробіологічний журнал*. 2008. 70 (1). С. 59—70.

<sup>1</sup>Житкевич Н.В., <sup>2</sup>Іванова Т.В., <sup>3</sup>Тарасюк Т.В., <sup>4</sup>Патики М.В.

<sup>1</sup>Інститут мікробіології та вірусології НАН України, ул. Заболотного, 148, г. Київ, 03048, Україна; <sup>2–4</sup>Національний університет біоресурсів та природопользовання України, ул. Героїв Оборони, 15, г. Київ, 03041, Україна, e-mail: <sup>2</sup>tivanova1@ukr.net

### **Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические особенности изолятов патогенных бактерий шампиньона двухспорового**

**Цель.** Изучены функциональные морфолого-культуральные, физиолого-биохимические особенности изолятов патогенных бактерий шампиньона двухспорового. **Методы.** Предметом исследования послужили



16 изолятов патогенных бактерий, выделенных из *Agaricus bisporus*. Они проявлялись как первичные инфекции на стадии активного роста гриба и оказались типичными только для шампиньона двухспорового. В работе использовали биотехнологические методы исследований. С помощью биохимических методов определяли трофические особенности патогенных бактерий с целью разработки биотехнологий по контролю их распространения. Оксидазную активность бактерий определяли по методу Ковача на мембранном фильтре, предварительно смоченном NN-диметил-п-фенилен-диамин сульфатом. Каталазную активность определяли, добавляя к капли культуры раствор перекиси водорода 10%. **Результаты.** Определили источники углеродного питания патогенных бактерий с помощью тест-системы. Изолят 9.4 утилизирует сахара (ксилозу, декстрозу, галактозу, которые относятся к моносахаридам), мелибиозу, L-арабинозу, маннозу, ОНПГ (орто-нитрофенил-β-галактопираноза), эскулин, цитрат, малонат. Изолят 6.2 при тестировании показал положительный результат на ксилозу, декстрозу. Изолят 6.1 использует такие сахара: декстроза, трегалоза, мелибиози, манноза. Изолят 9.5 указывает на присутствие ОНПГ, эскулина, цитрата и малоната, и на отсутствие каталазы. Положительную реакцию на оксидазу имеют изоляты 11.1 и 9.5. Слабую реакцию имели изоляты 6.2 и 13.2. Источниками углеродного питания являются сахара группы моносахаридов (ксилоза, декстроза, галактоза), полисахаридов и аминокислоты. Реакция на расщепление углеводов показала, что все изоляты имели окислительный тип метаболизма. **Выводы.** Исследованы морфолого-культуральные особенности изолятов патогенных бактерий шампиньона двуспорового, выделенных из плодовых тел *Agaricus bisporus*. Изучены физиолого-биохимические свойства бактерий, реакции на расщепление углеводов в синтетической среде, оксидазная активность бактерий по методу Ковача и каталазная активность. Осуществили идентификацию полученных изолятов, сравнивая их со свойствами бактерий возбудителей бактериозов данного гриба, уже описанных в статьях и в Определителе бактерий Берджи.

**патогенные бактерии, *Agaricus bisporus*, морфолого-культуральные, физиолого-биохимические свойства**

<sup>1</sup>Zhitkevych N., <sup>2</sup>Ivanova T., <sup>3</sup>Tarasyuk T., <sup>4</sup>Patyka M.

<sup>1</sup>Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Zabolotnogo 148, Kyiv, 03048, Ukraine; <sup>2-4</sup>National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Heroiv Oborony Str. 15, Kyiv, Ukraine, 03041, e-mail: <sup>2</sup>tivanova1@ukr.net

**Morphological-cultural and physiological-biochemical features of isolates of pathogenic bacteria of the *Agaricus bisporus***



**Purpose.** *The study of the functional features of pathogenic bacteria, which we are isolated from Agaricus bisporus.* **Methods** *We used biotechnological research methods. We determined the trophic features of pathogenic bacteria using biochemical methods. This is the development of biotechnology to control their distribution. We determined the oxidase activity of bacteria according to the Kovach method (on a membrane filter that we previously wetted with NN-dimethyl-p-phenylene-diamine sulfate. We determined the catalase activity by adding 10% hydrogen peroxide solution to the culture drop.* **Results.** *We determined the sources of carbon nutrition pathogenic bacteria using a test system Isolate 9.4 utilizes sugars such as xylose, dextrose, galactose, which are monosaccharides and melibiosis, L-arabinose, mannose, ONPG (ortho-nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranose), esculin, citrate, m Alonate. Isolate 6.2 showed a positive result for xylose, dextrose during testing. Isolate 6.1 uses the following sugars: dextrose, trehalose, melibiosis, mannose. Isolate 9.5 indicates the presence of ONPG, esculin, citrate and malonate and the absence of catalase. Isolates 11.1 and 9.5 have a positive reaction to oxidase. Isolates 6.2 and 13.2 had a weak reaction. Sources of carbon nutrition revealed sugars of the monosaccharide group (xylose, dextrose, galactose), polysaccharides and amino acids. The reaction to the breakdown of carbohydrates showed that all isolates had an oxidative type of metabolism.* **Conclusions.** *We investigated the morphological and cultural features of isolates of pathogenic bacteria of champignon bicuspid isolated from Agaricus bisporus. We studied the physiological and biochemical properties of bacteria and reactions to the breakdown of carbohydrates in a synthetic medium, the oxidase activity of bacteria according to the Kovacs method, and catalase activity. We carried out the identification of the obtained isolates, comparing them with the properties of bacteria of the causative agents of bacteriosis of this fungus, already described in the articles and in the Bergey Bacteria Guide.*

**pathogenic bacteria, Agaricus bisporus, morphological and cultural, physiological and biochemical properties**

## REFERENCES

1. Kalac P. A. (2013). Review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(2): P.209–218. doi: 10.1002/jsfa.5960 [in English].
2. Ivanova T.V. (2018). Biotechnologiya hrybiv. [Biotechnology of mushrooms]. V.2. Kompynt. 165 p. [in Ukrainian].
3. Sanguinetti M. (2015). Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*. 2015: 376387: doi: 10.1155/2015/376387. [in English].
4. Pereima, I. V., Ivanova, T. V. (2017). Stimulation of growth of species of the fungus of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. at a glucose nutrition. *Biotechnologia Acta.*, 10(6), P. 45–52. doi: org/10. 15407 / biotech10.06.045. [in English].

5. Patyka V.P., Pasichnyk L.A., Dankevych L.A. (2014). Diagnostyka phytopatogennyyh bakterii: Metodychni rekomendatsii. [Diagnostic of phytopathogenic bacteria: Guidelines]. Kyiv. 57 p. [in Ukrainian].

6. Ivanova T.V., Kovalyshyna H.M. (2018). Biotehnolohiyi Otrymannya mit-seliyu *Pleurotus ostreatus* na zerni riznykh sortiv pshenytsi. [Biotechnologies for obtaining *Pleurotus ostreatus* mycelium on grains of different wheat varieties]. *Zbir. nauk. prats' Myroniv's'kyi visnyk*. T. 6. P. 25–30. [in Ukrainian].

7. Ivanova, T.V. et al. (2015). New approaches extraction of viral RNA from edible mushrooms. *Scientific Journal «ScienceRise»*. 1 (15). P. 44–46.

8. Radchenko O. S. (2012). Fisiologo-biokhimichni vlastyvoli mikroorga-nizmv ta metody yih vyznachennya: Navchalniy posibnyk. [Physiological and biochemical properties of microorganisms and methods their determination: Tu-torial]. Agrar media group. 211 p. [in Ukrainian].

9. Patyka V.P., Pasichnyk L.A., Gvozdyak R.I., Petrychenko V.F., Korniy-chuk O.V., Kalinichenko A.V., Butsenko L.M., Zhytkevych N.V. (2017). Phytopa-togenni bakterii. Metody doslidzhen. [Phytopathogenic bacteria. Research meth-ods]. Vindruk. 432 p. [in Ukrainian].

10. Gadzalo Ya. M., Patyka M.V., Zaryshnyak A.S. (2015). Agrobiologiya ry-zosphery roslin. [Agrobiology of the rhizosphere of plants]. Agrarna nauka. 368 p. [in Ukrainian].

11. Patyka M.V., Kolodyazhnii A.Yu., Ibatullin I.I. (2016). Otsinka metage-nomu ta vyyavlennya funktsionalno znachuschyh polimorfizmiv prokariotiv gruntu metodom piroseksionuvannya. [Metagenome evaluation and detection of functionally significant polymorphisms of soil prokaryotes by pyrosequencing]. *Microbiologichnii journal*, 78 (2). P. 43–51. [in Ukrainian].

12. Patyka M.V., Patyka V.P., Patyka T.I., (2009). Filohenetychni vzayemoz'yazky mizh serolohichnymy variantamy *Bacillus thuringiensis*. [Phy-logenetic relationships between serological variants of *Bacillus thuringiensis*]. *Biopolimers and Cell*. 25 (3) : C. 240–244. <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0007E2> [in Ukrainian].

13. Orlova O.V., Vorobyova N.I., Svyrydova O.V., Andronov E.YE., Kolody-azhnyi A.YU., Moskalevs'ka YU.P., Patyka M.V. (2015). Sklad ta Funktsionuvannya mikrobnikh uhrupovan' pry rozkladanni solomy zlakiv u dernovo-pidzolystomu hrunti. [The composition and functioning of microbial communities in the de-composition of cereal straw in sod-podzolic soil]. *Sil's'kohospodars'ka biolohiya*. 50 (3). P. 305–314.

14. Patyka M.V., Kruhlov YU.V., Berdnykov A.M., Patyka V.F. (2008). Rol' *Linum usitatissimum* L. u formuvanni mikrobykh uhrupovan' pidzolystykh gruntiv. [The role of *Linum usitatissimum* L. in the formation of microbial groups of podzolic soils]. *Mikrobiologichnyi zhurnal*. 70 (1). P. 59–70.