

Н.М.Булеца, Л.М. Буценко, Л.А. Пасічник, В.П. Патица

ЧУТЛИВІСТЬ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ДО СТРЕПТОМІЦИНУ ЗА ДІЇ ПЕСТИЦИДІВ

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ 03143, Україна*

*Наведені результати зміни чутливості до стрептоміцину фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* і *Xanthomonas translucens* за дії пестицидів. Показано, що під дією пестицидів фітопатогенні штами проявляють більші зміни стрептоміцин чутливості, порівняно з епіфітним штамом *Pantoea agglomerans*. Гербіцид Гранстар, інсектициди Твікс та Альфа Супер збільшують кількість стрептоміцинорезистентних клітин *X. translucens* 3164, *P. syringae* pv *syringae* УКМ В-1027 та *P. syringae* pv. *atropaciens* УКМ В-1011, що свідчить про мутагенний вплив даних препаратів відносно зазначених фітопатогенів.*

Ключові слова: фітопатогенні бактерії, пестициди, антибіотикочутливість, стрептоміцин.

Для захисту сільськогосподарських культур від хвороб та інших шкодочинних факторів застосовують синтетичні пестициди [8]. Але їх використання у сільському господарстві проти цільових об'єктів – бур'янів, комах та грибних інфекцій не передбачає вилучення з екосистеми бактерій [2].

Фітопатогенні бактерії постійно супроводжують як культурні, так і дикі види рослин. За сприятливих умов вони уражують насіння та всі органи рослин протягом вегетації, погіршують якість та знижують обсяг продукції, що призводить до значних економічних збитків сільському господарству [1,13,14]. Крім того, часто при визначенні етіології збудника, виявляють змішані інфекції рослин. Так, за даними Д. Колесової [5], бактеріоз часто передує грибним захворюванням. З широко розповсюджених пестицидів антибактеріальну дію виявляють фунгіциди, до складу яких входять атоми металів (Cu, Hg, Mn, Zn, Fe) чи галогенів (Cl) [3]. Проте, пестициди, насамперед фунгіциди, порушують екологічну рівновагу між бактеріальною та грибною мікробіотою [18]. Результатом цього є загострення проблеми бактеріозів сільськогосподарських культур. Крім того, деякі пестициди мають генотоксичні властивості.

На території України боротьба з бактеріозами переважно базується на використанні Cu-вмісних сполук [9]. Антибіотики, що застосовуються в медицині, заборонені до використання в рослинництві, адже включення їх в систему захисту рослин має негативні наслідки. Проте, чутливість до антибіотиків може використовуватися як модельна мінлива властивість мікроорганізмів за дії пестицидів [4]. Так фунгіциди на основі беномілу, флудиоксонілу, тіофанат-метилу не пригнічують розвиток збудників бактеріозів зернових культур, проте підвищують рівень їх антибіотикорезистентності, тобто проявляють стосовно фітопатогенних бактерій мутагенну дію [11]. Перевагою таких досліджень мутагенної активності наряду з комерційними тест-системами (тест Еймса, Allium сера-тест), є безпосередній вплив пестицидів на досліджувані фітопатогенні бактерії, а не на віддалені тест-об'єкти.

Оскільки, за попередніми даними фітопатогенні бактерії є чутливими до дії стрептоміцину [11, 16], метою нашої роботи було вивчення впливу пестицидів на чутливість фітопатогенних бактерій до цього антибіотика для виявлення можливої їх мутагенної дії.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень слугували штами із колекції відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України *Xanthomonas translucens* 3164 – збудник чорного бактеріозу пшениці, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027[†] – збудник бактеріального опіку чи плямистості, *Pseudomonas syringae* pv. *atropaciens* УКМ В-1011[†] – збудник базального бактеріозу. Для порівняння використовували епіфітний штам *Pantoea agglomerans* П324, оскільки представники цього виду є потенційними фітопатогенами [1]. Досліджували 5 пестицидів, що рекомендовані до використання на посівах пшениці в Україні [9]: фунгіциди – Фалькон, Фолікур 250 Еw, інсектициди – Твікс, Альфа Супер, гербіцид Гранстар (табл. 1).

Застосовували методику, розроблену для визначення токсичної і мутагенної дії пестицидів на мікробні угруповання ґрунту [7], а саме врахування кількості стрептоміцинорезистентних колонієутворюючих одиниць (КУО Str^R) за дії пестициду. Культивуючи бактерії на картопляному агарі (КА) із стрептоміцином в різних концентраціях, визначали мінімальну інгібуючу концентрацію антибіотика, що була застосована в дослідженні.

Таблиця 1

Рекомендовані до застосування на посівах пшениці пестициди

Назва, виробник	Діюча речовина	Хімічна група	Рекомендована доза
Альфа Супер (Васма-Кемікал, Україна; Агрікоптер Азія Лімітед Гон- конг, КНР)	Альфа-циперметрин, 100 г/л К.е.	I	0,05мл/100мл
Твікс (Васма-Кемікал, Україна)	Хлорпірифос 500 г/л + циперметрин, 50 г/л К.е	I	0,25мл/100мл
Фалькон (Байер Кроп Саєнс АГ, Німеччина)	Тебуконазол 167 г/л + тріадименол 43 г/л + спіроксамін 250 г/л К.е.	Ф	0,2мл/100мл
Фолікур 250 Еw (Байер Кроп Саєнс АГ, Німеччина)	Тебуконазол, 250 г/л К.е.	Ф	0,17мл/100мл
Гран Стар Голд 75 (Дюпонт Інтернешнл Оперейшнз Сарл)	Трибенурон-метил 562,5 г/кг + Трифенсульфурон-метил 187,5 г/кг	Г	0,01г/100мл

Примітка: I – інсектицид; Ф – фунгіцид; Г – гербіцид.

Бактерії культивували в КБ з пестицидами в рекомендованій дозі, а потім висівали по 0,1 мл суспензії на чашку з твердим поживним середовищем із стрептоміцином. Порівнювали з фоновим рівнем антибіотикостійких бактерій без пестицидного навантаження та із загальною кількістю клітин (КУО) на картопляному агарі без добавок.

Культивування бактерій проводили при температурі 28°C в КБ впродовж 24, а на КА – 48 годин. Досліди проводили в трьох повторностях.

Розрахунки отриманих даних виконували за допомогою комп'ютерної програми *Microsoft Excel* '00. Вираховували частоту появи мутацій як відношення КУО Str^R до загальної кількості бактеріальних клітин для кожного варіанту досліду.

Результати та їх обговорення. Мінімальна інгібуюча концентрація стрептоміцину для досліджуваних псевдомонасів становила 1 мкг/мл, а для *P. agglomerans* П324 і *X. translucens* 3164 – 5 і 10 мкг/мл відповідно (табл. 2). Саме ці концентрації ми використовували для нашого експерименту.

Таблиця 2

Чутливість бактерій до стрептоміцину

Штами бактерій	Стрептоміцин, мкг/мл					Контроль
	1	2	5	10	20	
<i>X. translucens</i> 3164	+	+	+	сл.	-	+
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027, <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	сл.	-	-	-	-	+
<i>P. agglomerans</i> П324	+	+	сл.	-	-	+

Примітки: «сл.» – слабкий ріст; «+» – наявність та «-» – відсутність росту

Результати впливу пестицидів на частоту появи стрептоміцин резистентних клітин представлені в таблиці (табл. 3).

Загалом, культивуючи бактерії в КБ з фунгіцидами Фалькон і Фолікур, ми спостерігали зниження кількості КУО Str^R (*P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011) або повну відсутність росту бактерій (*P. agglomerans* П324 та *X. translucens* 3164) на середовищі зі стрептоміцином. Слід зауважити, що такий ефект обумовлений також пригнічувальною дією самих препаратів, враховуючи зменшення загальної кількості КУО (рис 1 А, Б). Тобто, фунгіциди і стрептоміцин проявляють синергічний антибактеріальний ефект. Проте у випадку фітопатогенних псевдомонасів, у клітин, що вижили

Таблиця 3

Вплив пестицидів на частоту мутацій стійкості до стрептоміцину

Пестициди / Штами бактерій	Середня частота мутацій Str ^R					
	Фолікур	Фалькон	Твікс	Альфа Супер	Гранстар	Контроль ¹
<i>X. translucens</i> 3164	0	0	23,4×10 ⁻⁶	90,5×10 ⁻⁶	1,09×10 ⁻⁶	0,20×10 ⁻⁶
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> УКМ В-1027	1,20×10 ⁻⁶	0	1,05×10 ⁻⁶	0,32×10 ⁻⁶	0,11×10 ⁻⁶	0,05×10 ⁻⁶
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,29×10 ⁻⁶	0,17×10 ⁻⁶	0,25×10 ⁻⁶	0,24×10 ⁻⁶	0,20×10 ⁻⁶	0,03×10 ⁻⁶
<i>P. agglomerans</i> П324	0	0	71,5×10 ⁻⁶	9,33×10 ⁻⁶	0,22×10 ⁻⁶	0,09×10 ⁻⁶

Примітка: 1–спонтанний рівень мутацій резистентності до стрептоміцину

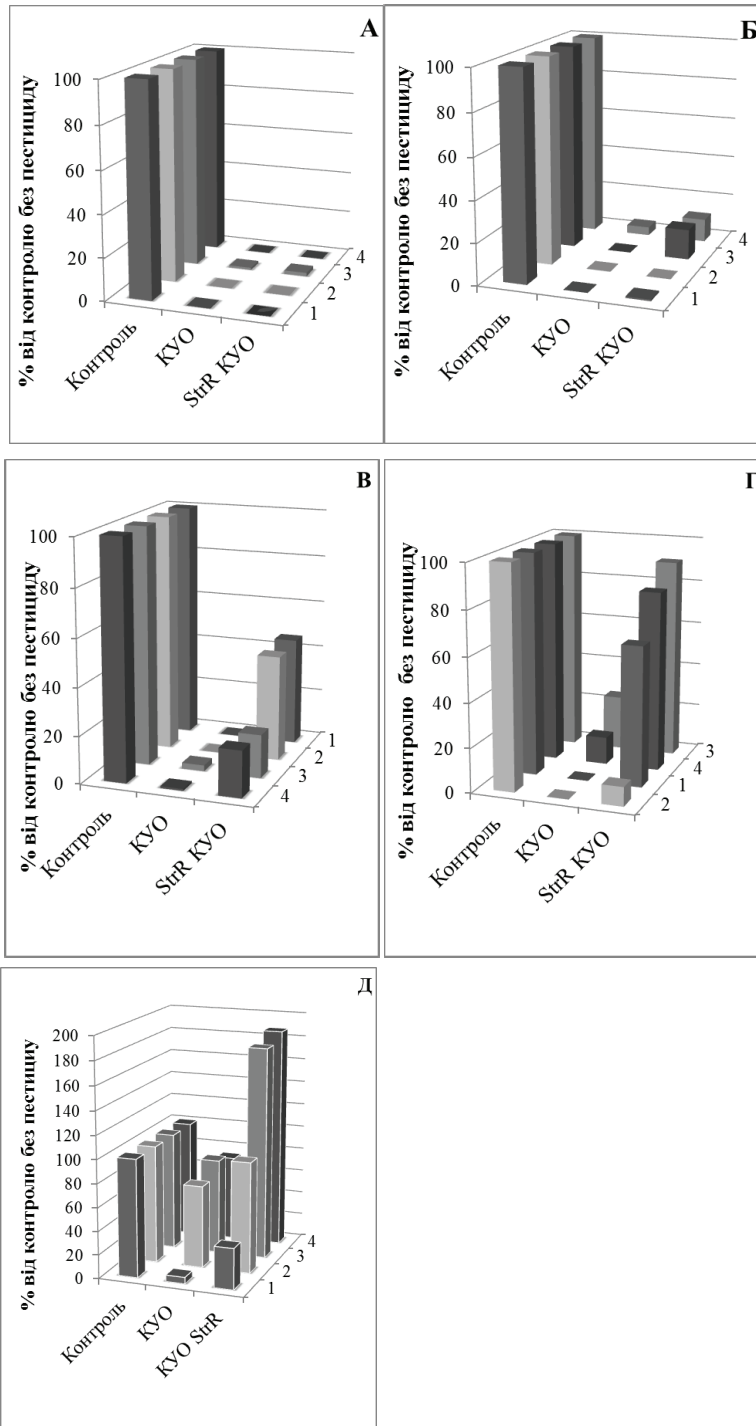


Рис.1. Вплив пестицидів на кількість бактеріальних клітин:

А – Фалькон, Б – Фолікур, В – Твікс, Г – Альфа Супер, Д – Гранстар.

1 – *Xanthomonas translucens* 3164; 2 – *Pantoea agglomerans* П324; 3 – *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* УКМ В-1011; 4 – *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027

КYO – кількість клітин за впливу пестициду; Str^R KYO – кількість клітин на середовищі з стрептоміцином після дії пестициду; Контроль – кількість клітин без внесення пестицидів (100%).

за дії фунгіциду Фолікур збільшувалася кількість резистентних форм. Даний препарат на основі тебуконазолу підвищував частоту КУО Str^R у 10 разів для *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 і у 25 разів для *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. Збільшення кількості стрептоміцинорезистентних клітин останнього штаму у 5,6 рази індукував препарат Фалькон. Такого ж впливу не спостерігали відносно інших трьох досліджуваних штамів.

Інсектициди Твікс та Альфа Супер також пригнічують ріст бактерій в КБ до мінімальних значень. Проте результат кількості клітин на середовищі зі стрептоміцином після дії препарату Твікс складав 20% для псевдомонасів і 40% для *P. agglomerans* ПЗ24 та *X. translucens* 3164 порівняно з контрольною кількістю КУО Str^R (рис. 1 В). За дії інсектициду Альфа супер КУО Str^R для фітопатогенних штамів *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та *Xanthomonas translucens* 3164 складала 90%, 81% та 63% відповідно, порівняно з контролем (рис. 1 Г). Частота прояву мутацій, що виражається відношенням КУО Str^R до кількості КУО, які виявилися життєздатними після дії вищезгаданих інсектицидів, збільшувалася у десятки і сотні разів (табл. 3).

Гербіцид Гран Стар викликає збільшення КУО Str^R *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 і *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 – на 80 і 87% більше від контролю, враховуючи, незначуще зниження рівня КУО за дії цього пестициду (рис. 1 Д). Отже даний препарат також виявляє мутагенну дію на фітопатогенні псевдомонаси. Показник частоти появи мутацій за дії цього пестициду збільшується на один порядок.

Слід зауважити, що фітопатогенні бактерії *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 та *X. translucens* 3164 проявляють більші зміни антибіотикочутливості під дією пестицидів, порівняно з епіфітним штамом *P. agglomerans* ПЗ24. За даними літератури резистентність до стрептоміцину, наприклад, у фітопатогенної *Erwinia amylovora* зумовлена двома генетично детермінованими механізмами: точковою мутацією у хромосомному гені *rpsL*, яка захищає від стрептоміцину перебудовою рибосомальної мішені та інактивацією стрептоміцину фосфотрансферазами, що кодуються плазмідними генами *strA* і *strB* [12]. Останні були ідентифіковані у принаймні 17 клінічних і природних популяціях бактерій різних еконіш, включаючи фітопатогенні представники родів *Erwinia*, *Pseudomonas* та *Xanthomonas* [10,17]. Це може бути пояснено тим, що філосфера є дуже специфічною еконішею, в якій сумісна локалізація бактерій сприяє збільшенню щільності та інтенсифікації метаболічного і генетичного обмінів [6].

Такі результати можна було б не враховувати, адже, як уже зазначалося, використання антибіотиків для захисту рослин в нашій країні заборонено. Але у ряді країн продовжують застосовувати такий підхід для боротьби з бактеріозами [16].

Не виключена можливість інших трансформацій фітопатогенних бактерій внаслідок впливу на них пестицидів, особливо тих, що не виявляють антибактеріальної дії. Хоч дана методика розроблена для ґрунтових мікроорганізмів, проте, як зазначалося раніше [11] її можна застосовувати для виявлення мутагенного потенціалу пестицидів безпосередньо на фітопатогенних бактеріях, що надає їй переваги порівняно з тест-системами на інших мікроорганізмах.

Таким чином, методику, розроблену для визначення токсичної і мутагенної дії пестицидів на мікробні угруповання ґрунту можна застосовувати для виявлення мутагенного впливу пестицидів на фітопатогенні бактерії.

Фітопатогенні штами виявляють більші зміни чутливості до стрептоміцину під дією пестицидів, порівняно з епіфітним штамом.

Фунгіциди на основі тебуконазолу з антибіотиком стрептоміцином сприяють зниженню виживання клітин, проте більш активними порівняно з монокомпонентним Фолікуром є полікомпонентний препарат Фалькон.

Гербіцид Гранстар, інсектициди Альфа Супер та Твікс збільшують кількість стрептоміцинорезистентних клітин *Xanthomonas translucens* 3164, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 та *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, що свідчить про мутагенний потенціал даних препаратів відносно зазначених фітопатогенів.

Н.М. Булеца, Л.Н. Буценко, Л.А. Пасичник, В.Ф. Патыка

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ К СТРЕПТОМИЦИНУ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПЕСТИЦИДОВ

Р е з ю м е

Приведены результаты изменения чувствительности к стрептомицину фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* и *Xanthomonas translucens* при воздействии пестицидов. Показано, что под действием пестицидов фитопатогенные штаммы проявляют большие изменения стрептомицин чувствительности сравнительно с эпифитным штаммом *Pantoea agglomerans*. Гербицид Гранстар, инсектициды Твикс и Альфа Супер увеличивают количество стрептомицинрезистентных клеток *Xanthomonas translucens* 3164, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 и *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, что свидетельствует о мутагенном действии данных препаратов в отношении указанных фитопатогенных бактерий.

К л ю ч е в ы е с л о в а: фитопатогенные бактерии, пестициды, антибиотикочувствительность, стрептомицин.

N.M. Buletsa, L.M. Butsenko, L.A. Pasichnyk, V.P. Patyka

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

THE SENSITIVITY OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA TO STREPTOMYCIN UNDER THE INFLUENCE OF PESTICIDES

S u m m a r y

The results of the streptomycin sensitivity changes of phytopathogenic *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas translucens* bacteria under the action of pesticides are presented. It is demonstrated that phytopathogenic strains show greater changes of streptomycin sensitivity compared to epiphytic *Pantoea agglomerans* strain under the pesticides influence. Granstar herbicide, Tviks and Alpha Super insecticides increase the number of streptomycin resistant cells of *Xanthomonas translucens* 3164, *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В-1027 and *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. This fact indicates mutagenic action of these pesticides against researched phytopathogenic bacteria.

К e y w o r d s: phytopathogenic bacteria, pesticides, streptomycin, antibiotic sensitivity.

1. Гвоздяк Р. І., Пасічник Л. А., Яковлева Л. М., Мороз С. М., Литвинчук О. О., Житкевич Н. В., Ходос С. Ф., Буценко Л. М., Данкевич Л. А., Гриник І. В. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин: монографія / за ред. В. П. Патики – К.: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. – 444 с.
2. Глинушкин А. П. Мониторинг болезней озимой пшеницы по мезоформам рельефа степной зоны Южного Урала // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. Агрономия и лесное хозяйство. – 2012. – **41**, №3. – С. 66-72.
3. Гольшин Н.М. Фунгициды. – М.: Колос, 1993. – 319 с.
4. Іутинська Г.О., Ямборко Н.А. Мутагенна дія синтетичних фунгіцидів і препаратів біологічного походження на мікроорганізми // *Мікробіологічний журнал*. – 2004. – **66**, №5. – С.57-61.
5. Колесова Д. А. Бактериозы как первопричина грибковых заболеваний плодовых деревьев и меры борьбы с ними // Научные труды ГНУ СКЗНИИСиВ. – 2013. – **2**. – С. 65-74.
6. Мошинець О.В. Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. Структурно-функціональна характеристика ризо-, енто- та філосфери // Вісник харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2010. – № 2 (20). – С. 19-35.
7. Пат. 62576 А (UA), 7A01N25/00 Спосіб визначення токсичної і мутагенної дії пестицидів на мікробні угруповання ґрунту / Іутинська Г.О., Ямборко-Костирко Н.А. Опубл. 15.12.2003. – Бюл. № 12.
8. Патики В.П., Макаренко Н.А., Моклячук Л.І., Серета Л.П., Шкатула Ю.М., Гриник І.В. Агроекологічна оцінка мінеральних добрив та пестицидів. – Київ: Основа, 2004. – 300 с.
9. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. – К.: Юнівест Медія, 2014. – 832 с.
10. Burr T.J., Norelli J.L., Katz B., Wilcox W.F., Hoying S.A. Streptomycin resistance of *Pseudomonas syringae* pv. *papulans* in apple orchards and its association with a conjugative plasmid. – *Phytopathology*. – 1988. – **78**, N4. – P. 410-413.
11. Butsenko L., Pasichnyk L., Khodos S., Karjeva I. Antibacterial and mutagenic action of fungicides on *Pseudomonas syringae* pv. *atofaciens* // *Agroecological journal*. – 2010. – № 4. – P. 71–79.
12. Chiou C.S., Jones A.L. Molecular analysis of high-level streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*. – *Phytopathology*. – 1995. – **85**, N3. – P.324-328.
13. Dvorak K., Sabluk V., Kalinichenko A., Butsenko L., Pasichnyk L., Patyka V. Biological properties of phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae*, isolated from sugar beet // *J. of Pure and Applied Microbiology*. India. – 2014. – 8 (6). – P. 4345-4349.
14. Pasichnyk, L.A., Patyka, V.F., Khodos, S.F., Vinnichuk, T.S. Basal bacteriosis of wheat and influence of agrotechnical methods on its spread // *Mikrobiolohichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine)*. – 2012. – 74, N4. – P. 37-44.
15. Patyka W., Gnatiuk T., Zhytkevych N., Kalinichenko A., Frączek K. Występowanie bakterii fitopatogenicznej *Pantoea agglomerans* w uprawie soi // *J. Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin*, Nr 55 (3), 2015 DOI: 10.14199/ppp-2015-049.
16. Stockwell V.O., Duffy B. Use of antibiotics in plant agriculture // Antibiotic resistance in animal and public health (G. Moulin & J.F. Acar, eds). *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* – 2012. – **31** (1). – P. 199-210.

17. *Sundin, G. W., Bender C. L.* Molecular genetics and ecology of transposon-encoded streptomycin resistance in plant pathogenic bacteria / Brown T, ed. Molecular genetics and evolution of pesticide resistance. Washington, DC: American Chemical Society. – 1996. – **645**. – P. 198-208.
18. *Wachowska U, Stasiulewicz-Paluch A. D., Głowacka K., Mikołajczyk W., Kucharska K.* Response of epiphytes and endophytes isolated from winter wheat grain to biotechnological and fungicidal treatments // *Pol. J. Environ. Stud.* – 2013. – **22**, No. 1. – P. 267-273.

Отримано 10.02.2015