

концентрации аммиака и высокие нитритов, что является свидетельством неэффективности процессов денитрификации. Сделано предположение о том, что одним из источников загрязнения ТМ, а также нитратами и нитритами может быть Малашевская свалка, обустройство которой не соответствует установленным требованиям.

*Ключевые слова:* Малашевская свалка (полигон), река Серет, загрязнение воды, тяжелые металлы, аммонийный азот, нитраты, нитриты

*H. B. Humenyuk, D. V. Strashnyuk, N. M. Drobyk*

Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University, Ukraine

#### HEAVY METAL CONTENT AND HYDROCHEMICAL INDICATORS CHARACTERISTIC OF THE SERET RIVER WATER NEAR MALASHIVTSI LANDFILL (TERNOPIL REGION)

Heavy metal (HM) (copper, nickel, cobalt, zinc, iron, manganese, lead, cadmium) content and several hydrochemical indicators (ammoniacal nitrogen, nitrate and nitrite concentrations) in the water of Seret river that flows near Malashivtsi landfill (Zboriv district, Ternopil region) were investigated. It was determined, that copper, nickel, cobalt and zinc concentrations on the Seret river exceed the background values while other element content does not reach over the permissible norms. The investigated samples had shown low ammonia and high nitrite concentrations, which is an evidence of low denitrification process efficiency. As a result, deterioration of the water sanitary state and its eutrophication takes place. It was assumed that one of the causes of HM, nitrate and nitrite pollution can be the Malashivtsi landfill which is set up without meeting the specific requirements.

*Keywords:* Malashivtsi landfill, Seret river, water pollution, heavy metal, ammoniacal nitrogen, nitrates, nitrites

Рекомендує до друку

Надійшла 29.12.2014

В. В. Грубінко

УДК 633.367:632.3

Л. А. ДАНКЕВИЧ

Інститут мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України  
вул. Заболотного, 154, Київ, Д 03680

#### **ФЕНОТИПОВІ ТА ГЕНОТИПОВІ ВЛАСТИВОСТІ ДОМІНУЮЧИХ ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІАЛЬНИХ ХВОРОБ ЯБЛУНІ В УКРАЇНІ**

Досліджено ряд характеристик фенотипу та генотипу найбільш поширених збудників бактеріальних хвороб яблуні в Україні у 2012-2014 роках. Встановлено, що за комплексом даних ознак 80 % ізольованих нами штамів споріднені з представниками виду *Pseudomonas syringae*.

*Ключові слова:* бактеріальні хвороби яблуні, *Pseudomonas syringae*

В Україні, як і в багатьох країнах світу, яблуня є однією з ключових культур садівництва. Серед плодово-ягідних культур на її частку припадає понад половина площ. Останнім часом, через інтродукування величезної кількості нових сортів, спостерігається посилення захворювань даної культури, а в окремих випадках і поява нових патогенів. Згідно даних літератури яблуню можуть уражувати збудники різної етіології, серед них бактеріальні є одними з найбільш шкодочинних, зокрема: збудник бактеріального опіку плодів (*Erwinia amylovora*), некроз кори (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*), бактеріальний рак коренів (*Agrobacterium tumefaciens*), чорний бактеріоз (*Erwinia horticola*) [2]. Слід відмітити, що ідентифікація збудників бактеріальних хвороб яблуні на відміну від аналогічних збудників грибної етіології є складним тривалим та багатоступеневим

процесом. Зокрема протягом тривалого часу у ідентифікації фітопатогенних бактерій застосовувався так званий «фенотиповий» підхід, що полягає у всебічному дослідженні ознак фенотипу. Але, останні декілька десятиріч у таксономії альтернативою «фенотипового» став «генотиповий» підхід, що дозволяє не тільки більш швидше та коректніше ідентифікувати об'єкт, а й встановити філогенетичні зв'язки між ним та іншими групами об'єктів [7, 12]. Та не завжди використання лише одних новітніх молекулярно-генетичних методів досліджень є запорукою успіху при видовій та внутрішньовидовій ідентифікації бактерій, оскільки деякі з них є трудомісткими та вартісними, та навіть не зовсім дієвими у випадку близької філогенетичної спорідненості видів в складі роду [7]. Саме тому ще одним підходом у видовій ідентифікації бактерій поліфазна таксономія, що є комбінуванням такого набору фенотипових та генотипових методів, який є на думку дослідника найбільш вдалим [4]. На думку багатьох дослідників, саме поліфазна таксономія є найкращим прийомом при ідентифікації фітопатогенних бактерій, оскільки у даному випадку важливо не тільки коректно ідентифікувати збудника, й вивчити наприклад його патогенні властивості [4, 7, 8]. Крім того, загальновідомо, що тривалий моніторинг, швидка та коректна діагностика і ідентифікація збудників є ключовим аспектом у боротьбі з їх розповсюдженням. Саме тому, метою наших досліджень було вивчення комплексу фенотипових та генотипових властивостей домінуючих збудників бактеріальних хвороб яблуні в Україні у 2012-2014 році для розробки схеми їх коректної ідентифікації та можливої експрес діагностики.

### Матеріал і методи досліджень

Протягом 2012-2014 років співробітниками відділу фітопатогенних бактерій ІМВ НАН України проведено моніторинг яблуневих садів у ряді приватних підприємств Київської, Запорізької., Херсонської, Одеської та Сумської областей. З уражених тканин у чисті культури відділено понад 50 ізолятів. У роботі також використано типові штами, що зберігаються у Українській колекції мікроорганізмів, зокрема і *P. syringae* pv. *syringae* УКМ В1027<sup>†</sup>.

Вірулентні властивості штамів вивчали методом штучного зараження гілок яблуні та бузку, водною суспензією однодобових клітин бактерій ( $10^7$  кл/мл). Облік вірулентності штамів проводили на сьомий день після зараження за 10-ти бальною шкалою. Реакцію надчутливості на листках тютюну проводили за методом Klement [12]. Культуральні, фізіологічні та фізіологічні властивості бактерій вивчали загально прийнятими методами [1]. Здатність засвоювати вуглеводи, органічні кислоти або амінокислоти, як єдине джерело вуглецевого живлення, визначали за ростом бактерій та зміною забарвлення середовища Омелянського, яке містило індикатор бромтимол синій. Як єдині джерела живлення випробували 0,5% розчини вуглеводів, 0,1% розчини багатоатомних спиртів і амінокислот та 0,15% розчинів органічних кислот. Засвоєння тих чи інших сполук оцінювали на 3, 7, 14 та 21 добу культивування за зміною кольору індикатора, яка відбувалася внаслідок зміни величини рН. Антигенні властивості штамів бактерій вивчали за допомогою реакцій аглютинації. Сироватки до живих клітин бактерій та антигени одержували описаними Пастушенко, Симонович методами [5, 6].

Для виділення та очищення хромосомної ДНК використовували Silica Spin колонки фірми Qiagen та набір реактивів „ДНК-сорб-В”. Концентрацію ДНК визначали спектрофотометрично за допомогою спектрофотометру BioPhotometr. ДНК копію гену 16S рРНК ампліфікували з використанням універсальних праймерів рА – 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (8-27, нумерація за *E.coli*) та рН – 3'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-5' (1542-1523, нумерація за *E. coli* за експериментально підібраних умов: денатурація ДНК – 94<sup>0</sup>С/15с, відпалювання – 65<sup>0</sup>С/15с, елонгація – 72<sup>0</sup>С/5хв. Продукти ампліфікації клонували в Т-вектор на основі плазмиди *pBLuescript SK(+)* фірми Promega, по сайту рестрикції *Eco RV* [11]. Пошук гомологічних, задепонованих у GenBank, нуклеотидних послідовностей що кодують ген 16S рРНК проводили за допомогою програми BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Для проведення фінгепринтування геному використали наступні універсальні праймери: REP 1R -5'-IIIICGICGICATCIGGC-3', REP 21 -5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'; ERIC 1R -5'-ATGTAAGTCTCTGGATTAC-3', ERIC 2 -5'-AAGTAAGTGAAGTGGGTGAGCG-3; BOX A1R -5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' [9, 10]. Умови проведення ампліфікування були наступними: додаткова денатурація ДНК – 96<sup>0</sup>С/6 хв. та основна денатурація ДНК – 94<sup>0</sup>С/ 1хв. (однакова для всіх видів REP– ПЛР); відпалювання –

44<sup>0</sup>C/1хв. (REP– ПЛР з REP праймерами), 52<sup>0</sup>C/1хв. (REP– ПЛР з ERIC праймерами) та 53<sup>0</sup>C/1 хв. (REP– ПЛР з BOX праймерами); елонгацію – 72<sup>0</sup>C/2хв. та заключний синтез –65<sup>0</sup>C/8хв. (однакова для всіх видів REP– ПЛР). Ампліфікування проводили з використанням термоциклера фірми Applied Biosystem. Продукти реакції розподіляли у електрофоретично з використанням 1,5% агарозного гелю, ТБЕ буферу протягом 4 годин за напруженості електричного поля 1,5 В/см. Одержані агарозні гелі візуалізували за допомогою гель-док станції Universal Hood II. Спорідненість одержані REP, ERIC та BOX профілів порівнювали візуально.

### Результати досліджень та їх обговорення

При візуальному обстеженні 80 % уражених дерев яблуні різних сортів виявлено наступні ознаки ураження. Гілки та стовбур були вкриті плямами різних розмірів, які від живої тканини відділяються тріщинами. Колір плям коричневий з фіолетово-вишневим відтінком, деревини-коричневий. Бруньки вище місця ураження на гілках не розвиваються. У всіх наданих зразках спостерігали наявність виразок різної величини і глибини. Крім того, також були виявлені зморщені пухирі, які мають висушений вигляд та місце ураження набуває ніби вдавненого вигляду. Камбіальне кільце та внутрішній шар кори легко відшаровуються від коричневої деревини (рисунок 1). Зазначені нами симптоми подібні до відомих з літератури симптомів [2], що викликаються збудником бактеріального некрозу кори яблуні та груші, але одних лише візуальних ознак вкрай недостатньо для ідентифікації патогена [7]. Тому, на наступному етапі наших досліджень була проведена поліфазна таксономія даного збудника.



Рис. 1. Природне ураження стовбуру дерев яблуні різних сортів у Херсонській (а, б, в) та Запорізькій (г) областях.

При вивченні патогенних властивостей ізолюваних нами штамів показано, що вони здатні уражувати усі надземні органи яблуні та бузку та викликати реакцію надчутливості на тютюні. За морфологією клітини усі ізолювані нами штами є прямими, рухливими паличками, які розташовуються поодиночці або парами, грамнегативні і не утворюють спор.

Окремі фізіологічні, біохімічні та патогенні властивості досліджуваних штамів

Ознака	Ізольовані нами штамми (50 штамів)	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B1027
зabarвлення по Граму	-	-
рухливість	+	+
Утворення індолу	-	-
Утворення сірководню	-	-
Утворення оксидази	-	-
Утворення каталази	+	+
Редукція нітратів	-/+	+
Коагуляція молока,	+	+
Розрідження желатина	+	+
Лакмусова сироватка	л	л
Ферментація глюкози, галактози, арабінози, манози, фруктози, сахарози, рафінози, манітолу	к	к
Ферментація лактози, мальтози, дульцитолу, глюкози (анаеробно)	-	-
Реакція надчутливості на тютюні	+	+

Примітки: 1. (-) – відсутність реакції; 2. (+) – наявність реакції; 3. (л) – ферментація сполук з утворенням лугу; 4. (-/+) – ознака, залежить від штаму; 5.(к) – ферментація сполук з утворенням кислоти

На картопляному агарі через дві доби утворюють типові для бактерій роду *Pseudomonas* колонії. Здатні рости на МПБ, пептонізувати або згортати молоко, пошарово розріджувати желатин. Варіюють за здатністю редукувати нітрати, здатні утворювати каталазу та оксидазу, підлужувати лакмусову сироватку, не утворюють індолу та сірководню. На мінеральному середовищі Омелянського, до якого додавали як єдине джерело вуглецевого живлення глюкозу, галактозу, арабінозу, ксилозу, манозу, фруктозу, сахарозу, рафінозу та маніт утворюють кислоту. Не засвоюють лактозу, мальтозу, дульцит, саліцин і варіабельні за споживанням рамнози. Не ростуть на середовищі, яке містить солі янтарної кислоти, але засвоюють решту органічних кислот. Здатні рости на середовищі, яке містить як єдине джерело азоту та вуглецю аланін, аспарагінову та глютамінову кислоти, серин, пролін і гістидин, але не засвоюють лейцин, валін, лізин, треонін, фенілаланін, тирозин, триптофан, цистин (табл. 1). Отже ізольовані нами штамми за основними фізіологічними та біохімічними властивостями подібні до типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* B1027<sup>1</sup>. Саме тому, на наступному етапі наших досліджень ми використали декілька найбільш агресивних штамів.

Таблиця 2

Результати реакції аглютинації антигенів ізольованих штамів з сироваткою до типового штаму *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*

ОН антигени штамів	Титр реакції аглютинації з сироваткою до типового штаму <i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> B-1027 <sup>Т</sup>
Ізольовані штамми <i>Pseudomonas</i> sp. 1п, 2п	6400-51200
Гомологічні реакції	12800-51200

Дані штамми також здатні специфічно реагувати з моновалентною сироваткою до типового штаму *P. syringae* pv. *syringae* УКМ B1027<sup>1</sup> (табл. 2). За результатами філогенетичного аналізу ізольовані нами штамми споріднені (97-100% гомології) з задепонованими у GenBank нуклеотидними послідовностями гену 16S рРНК окремих представників роду *Pseudomonas*,

зокрема близькоспоріднених з *Pseudomonas syringae* видів, що згідно даних сучасної входять до так званої "*Pseudomonas syringae* group" [12] (табл. 3).

Таблиця 3

Ідентичність нуклеотидних послідовностей гену 16S рРНК ізольованих нами штамів з нуклеотидними послідовностями гену 16S рРНК бактерій, які зберігаються у нуклеотидній базі GenBank

Штам	Вид, патовар і референс-штам у нуклеотидній базі Gen Bank	Кількість нуклеотидів у фрагментах гену 16S рРНК що співпадає	Ідентичність послідовностей, (%)
Ізольовані штами <i>Pseudomonas</i> sp. 1п, 2п	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> NCPPPB 281	1478/1478	100
	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	1478/1481	99
	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448	1478/1482	99
	<i>P. savastanoi</i> pv. <i>morsprunorum</i> MAFF301436	1438/1443	97

Для більш точної та коректної ідентифікації ізольованих штамів нами було проведено фінгепринтування їх геному (рисунок 2).

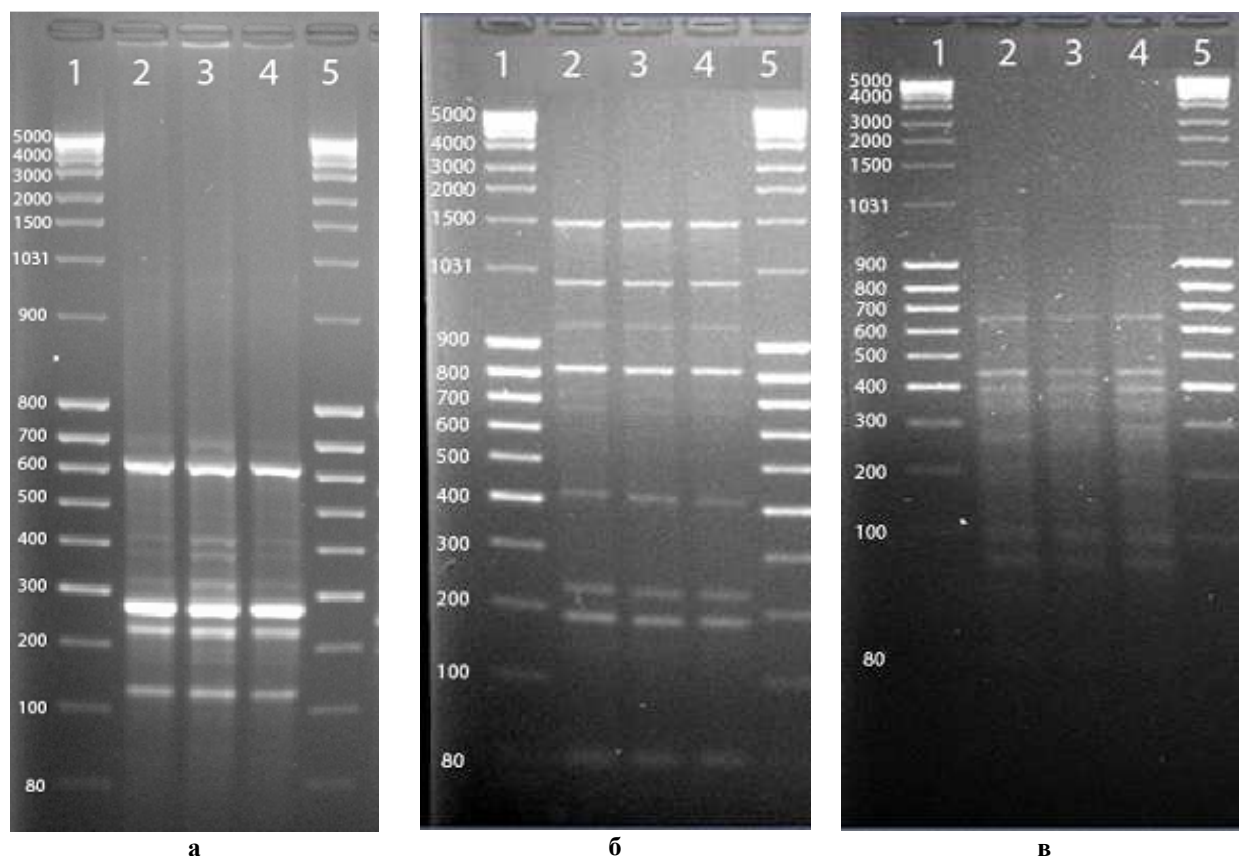


Рис. 2. Електрофоретичний розподіл продуктів ПЛР реакції з використанням BOX (а), REP (б), і ERIC(в) праймерів у 1,5% агарозному гелі: 1- маркери молекулярних мас, 2- *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B1027<sup>T</sup>, 3- *Pseudomonas* sp. 1п, 4- *Pseudomonas* sp. 2п, 5- маркери молекулярних мас

Зокрема, у ізолюваних нами штамів та типового штаму *P. syringae pv. syringae* B-1027 за результатами BOX та REP профілювання виявлено 8 спільних продуктів ПЛР реакції, а за результатами ERIC профілювання виявлено 10 спільних ДНК фрагментів. Тобто за результатами фінгепринтування геному ізолювані нами штами близькоспоріднені з типовим штамом *P. syringae pv. syringae* B-1027 .

### Висновки

Отже на основі комплексу ознак фенотипу та генотипу показано, що більшість ізолюваних нами штамів споріднені з типовим штамом *P. syringae pv. syringae* B-1027 . На наш погляд, найбільш дієвим для експрес діагностики даного збудника є фінгепринтування його геному та створення відповідної бази даних.

1. Бельтюкова К.И. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений / [Бельтюкова К.И., Матышевская М. С., Куликовская М.Д. и др.]. — К.: Наукова думка, 1968.—316 с.
2. Гвоздяк Р.І. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин / [Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Яковлева Л.М. та ін.]; За ред. В.П. Патики. — Київ: ТОВ "НВП "Інтерсервіс", 2011. — 444 с.
3. Данкевич Л.А. REP-ПЛР аналіз збудників бактеріальних хвороб ріпаку / [Данкевич Л.А., Захарова О.М., Мельничук М.Д. та ін.] // Мікробіол. журн. — 2014. — Т. 76, № 4. — С. 17–26
4. Коцофляк О. І. Дослідження бактерій роду *Pseudomonas* методами поліфазного таксономічного аналізу: автореф. дис...канд.биол.наук: 03.00.07 / О.І. Коцофляк / Ін-т. мікробіолог. и вирусолог. им. Д.К. Заболотного — К., 2004. — 21 с.
5. Пастушенко Л.Т. Вивчення методів одержання антигенів фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* / Л.Т. Пастушенко, І.Д. Симонович // Мікробіол. журн. — 1971. — Т. 33, № 3. — С. 289—295.
6. Пастушенко Л.Т. Одержання специфічних атисироваток до фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* / Л.Т. Пастушенко, І.Д. Симонович // Мікробіол. журн. — 1971. — Т. 33, № 1. — С. 37—40.
7. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / [Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J. T., Garrity G.M.] // New York; USA: Springer Science+ Business Media. — 2005. —Vol. 1. 2<sup>nd</sup> ed. — 1108 p.
8. Kaluznal M. Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. / [Kaluznal M., Ferrante P., Sobiczewski P., Scortichini M. ] // Journal of Plant Pathology. — 2010. — 92, N 3 — P. 781—787.
9. Louws F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. / [Louws F.J. Louws F.J., Fulbright D.W., Stephens C.T.] // Applied and Environmental Microbiology. — 1994. — 60, N 7— P. 2286—2295.
10. Louws F.J. The three DS of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, Detection, and Disease Diagnosis. / Louws F.J., Rademaker J. L.W, de Bruijn F.J. // Annual Reviews Phytopathology. — 1999. — 37, — P. 81—125.
11. Marchuk D. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR product / [Marchuk D., Drumm M., Saulino A., S et all.] // Nucl. Acid Res. — 1990. — Vol. 19, № 5. — P. 1154—1155.
12. Mulet M. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* speciese / Mulet M., Lalucat J., García-Valdés E. // Environmental Microbiology. — 2010. —12, N 6. — P. 1513—1530.

Л. А. Данкевич

Институт микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного НАНУ

### ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДОМИНИРУЮЩИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЯБЛОНИ В УКРАИНЕ В 2012-2014 ГОДАХ

Исследован ряд характеристик фенотипа и генотипа наиболее распространенных возбудителей бактериальных болезней яблони в Украине в 2012-2014 годах. Установлено, что по комплексу данных признаков 80% изолированных нами штаммов сроднены с представителями вида *Pseudomonas syringae*

Ключевые слова: бактериальные болезни яблони, *Pseudomonas syringae*

L. A. Dankevych

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

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC PROPERTIES OF THE AGENT OF APPLE'S DOMINANT BACTERIAL DISEASE IN UKRAIN IN 2012-2014

A range of phenotypical and genotypical characteristics of the of the most extended agents apple 's bacterial diseases in Ukraine in 2012-2014 have been investigated. It has been determined that on the basis on the complex features 80% of isolated by us strains *closely related* to the *Pseudomonas syringae* species.

*Keywords: apple 's bacterial diseases, Pseudomonas syringae*

Рекомендує до друку

Надійшла 23.12.2014

В. В. Грубінко

УДК 581.192.4:631.416.14:632.15(665.61)

М. В. ДОВГАЮК-СЕМЕНЮК, О. І. ВЕЛИЧКО, О. І. ТЕРЕК

Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, Львів 79005

**ВМІСТ АМОНІЙНОГО ТА НІТРАТНОГО НІТРОГЕНУ  
У РОСЛИНАХ КОНЮШИНИ ЛУЧНОЇ ЗА ДІЇ НАФТОВОГО  
ЗАБРУДНЕННЯ ҐРУНТУ ТА ПІДЖИВЛЕННЯ ФОСФОРНО-  
КАЛІЙНИМИ ДОБРИВАМИ**

Встановлено, що унаслідок забруднення нафтою у ґрунті зменшується вміст мінерального нітрогену, особливо його нітратної форми. За дефіциту  $N-NO_3^-$  у нафтозабрудненому ґрунті рослини конюшини лучної інтенсивніше поглинали амонійну форму нітрогену. Для рослин, вирощених у нафтозабрудненому ґрунті, характерне переважання вмісту  $N-NH_4^+$  у коренях, тоді як у нормі амонійного нітрогену містилося більше у листках. Недостатнє забезпечення  $N-NO_3^-$  у нафтозабрудненому ґрунті спричинило істотне зменшення кількості нітратного нітрогену у коренях та листках конюшини лучної. Підживлення нафтозабрудненого ґрунту  $P_{60}K_{60}$  сприяло збільшенню вмісту  $N-NO_3^-$  у коренях рослин.

*Ключові слова: N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Trifolium pratense L., нафтозабруднений ґрунт, фосфорно-калійні добрива*

Нітроген є одним із основних біогенних елементів і тому відіграє надзвичайно важливу роль у життєдіяльності рослин. За умов нестачі нітрогену відбувається зниження інтенсивності метаболічних та ростових процесів. Нітроген у ґрунті знаходиться у формі нітратних і амонійних солей, білків та продуктів їхнього розщеплення – амінокислот, пептидів, амінів, амідів; гумусу та ін. Доступними для рослинного організму є мінеральні форми нітрогену – амонійна та нітратна. Наявні у науковій літературі відомості про вміст неорганічних форм нітрогену у ґрунті під впливом нафтового забруднення часто суперечливі. Це пов'язано із різними типами ґрунтів, що використовувались для досліджень, особливостями умов, у яких проводились дослідження, тощо. Недостатньо дослідженим залишається метаболізм нітрогену у рослинах за умов нафтозабрудненого ґрунту. Нез'ясованою є можливість оптимізації живлення рослин у нафтозабрудненому ґрунті шляхом його підживлення мінеральними добривами. У роботі досліджували вміст доступних для рослини форм нітрогену у нафтозабрудненому дерново-підзолистому суглинковому ґрунті з околиць м. Борислава Львівської області – регіону, що потерпає від наслідків нафтовидобування. Досліджували вміст амонійного та нітратного нітрогену також у рослинах конюшини лучної, вирощеної у нафтозабрудненому ґрунті.