

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ РИЗОСФЕРНОЇ БАКТЕРІЇ PSEUDOMONAS PUTIDA ТА ЇЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ МЕТАБОЛІТИ У РЕГУЛЯЦІЇ РОСЛИННО-МІКРОБНИХ СИСТЕМ

М. В. ПАТИКА, доктор сільськогосподарських наук, член-кореспондент
НААН, завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття
Національний університет біоресурсів і природокористування України,
Н. В. ЖИТКЕВИЧ, старший науковий співробітник відділу фітопатогенних
бактерій

Інституту мікробіології і вірусології НАН України,

Т. В. ІВАНОВА, кандидат сільськогосподарських наук, доцент кафедри
екобіотехнології та біорізноманіття

Національний університет біоресурсів і природокористування України,

Т. В. ТАРАСЮК, студент факультету захисту рослин, біотехнологій та
екології

Національний університет біоресурсів і природокористування України,

В. П. ПАТИКА, доктор біологічних наук, професор, академік НААН
завідувач відділу фітопатогенних бактерій

Інституту мікробіології і вірусології НАН України

E-mail: tivanova1@ukr.net

<https://doi.org/10.31548/dopovidi2019.01.002>

Анотація. *Мета.* Вивчення культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей колекційних штампів *Pseudomonas putida* та визначення їх можливого використання в біотехнологічних розробках та технологіях захисту рослин. *Методи.* Використовували біотехнологічні (одержання і субкультивування штампів *P. putida* 8617, 8618, 8619, 8672 в умовах in vitro), мікробіологічні (отримання ізольованої колонії бактерій, вивчення зростання мікробів на чашках, вивчали характер росту на скошеному агарі, морфологічні, культуральні, біохімічні та фізіологічні властивості дослідних тест-культур), статистичні методи,

світлову мікроскопію. *Результати.* Проведені дослідження показали, що всі дослідні штами *Pseudomonas putida* однорідні, не були контаміновані та не мутували, зберегли свої культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості. Було визначено, що колекційні штами *Pseudomonas putida*, які тривалий час зберігались у колекції ІМВ (Інститут Мікробіології і Вірусології імені Д.К. Заболотного) зберегли свої основні біологічні властивості і можуть бути використані для подальших мікробіологічних і біотехнологічних досліджень. *Висновки.* За результатами проведених досліджень та аналізом літературних джерел показано, що

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

Pseudomonas putida відрізняється від інших типових представників свого роду. Отримані результати повністю зійшлися з даними, представленими в літературі з засвоєння вуглецю та азоту, як

єдиного джерела живлення в таксономії дослідних культур.

Ключові слова: біологічно активні метаболіти, *Pseudomonas putida*, рослинно-мікробні системи.

Актуальність. Різноманітність біосинтетичних і катаболічних реакцій, висока швидкість росту на простих за складом поживних середовищах, особливості генетичної організації, зокрема наявність плазмід та широкі можливості для генно-інженерного маніпулювання – дозволяють розглядати бактерії роду *Pseudomonas*, як перспективний об'єкт для робіт в області біотехнології та інноваційного використання у широкому спектрі народного господарства.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Аеробні бактерії роду *Pseudomonas* – перспективні в науковому і практичному біотехнологічному відношенні мікроорганізми, що приймають активну участь у процесах мінералізації органічних з'єднань та зумовлюють регенерацію навколишнього середовища від забруднення та антропогенного навантаження. Ця група бактерій і, зокрема *Pseudomonas putida*, здійснює позитивний вплив на ґрунтове середовище та сприяє розвитку сільськогосподарських культур. Деякі сапрофітні види псевдомонад широко заселяють

ризосферу, відіграють важливу роль у захисті рослин від бактеріальних і грибних хвороб. Серед мікроорганізмів цього роду є продуценти вітамінів і коферментів, органічних кислот і амінокислот, полісахаридів і поверхнево-активних речовин, антибіотиків і багато інших біологічно-активних сполук. В останні роки із бактерій роду *Pseudomonas* були виділені нові, своєрідні за структурою і спектром дії антибіотичні речовини, в тому числі аміноглікозиди, монобактами, кислоти, ефективні у відношенні щодо антибіотико-резистентних збудників захворювань [10].

Ця група бактерій має певні антагоністичні властивості до широкого ряду фітопатогенних мікроорганізмів, що зашкоджують рослинам і значно погіршують стан сільського господарства, адже знищують врожай. Тож, можна припустити, що використання певних штамів *Pseudomonas putida* є доволі перспективним напрямом в агробіотехнології.

Також, можна звернути увагу на здатність представників роду *Pseudomonas*, до біоремедіації. На сьогодні постійно відбуваються

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

скиди шкідливих, забруднюючих речовин із різних виробництв у навколишнє середовище, зокрема, у ґрунт.

У свою чергу забруднення ґрунтів призводить до значного екологічного та економічного збитку: падає врожайність сільськогосподарських культур, зменшується продуктивність лісових

ресурсів, вилучаються з господарського землекористування великі площі, погіршується санітарний стан навколишнього середовища.

За сукупними даними визначника Берджи [4], класифікація - систематичне положення *Pseudomonas putida* є таким, як показано в таблиці 1.

1. Систематичне положення виду *Pseudomonas putida* (Trevisan 1889) (Migula, 1895)

<i>Pseudomonas putida</i> входить до:	
Домену:	Бактерії (<i>Bacteria</i>)
Типу:	<i>Proteobacteria</i>
Класу:	<i>Gamma Proteobacteria</i>
Ряду:	<i>Pseudomonadales</i>
Родини:	<i>Pseudomonadaceae</i>
Роду:	<i>Pseudomonas</i>
Групи: <i>P. putida group</i>	<i>P. putida group</i>

Родина *Pseudomonadaceae* об'єднує грам-негативні організми – прямі або слабо вигнуті палички, з полярними джгутиками, що не утворюють спор і ростуть в аеробних умовах. Енергію вони отримують шляхом аеробного, а деякі види і анаеробного дихання (денітрифікація, нітратне дихання), але не за рахунок бродіння. Псевдомонади – хемоорганотрофи, проте деякі з них факультативно можуть рости, як хемолітотрофи. Рід *Pseudomonas* являє собою прототип родини. Цей рід, як і всю групу 7, можна охарактеризувати певними метаболічними особливостями. Його представники здатні засвоювати більшу частину органічних

субстратів, у тому числі гетероциклічні й ароматичні з'єднання, котрі не використовуються іншими бактеріями. Цукри, як правило, розкладаються ними за шляхом Ентнера-Дудорова. Деякі види *Pseudomonas* окислюють цукри не повністю – з виділенням цукрових кислот (глюконової, 2-оксоглюконової) [11].

Рід *Pseudomonas* описаний Migula у 1894 році для безспорних грам негативних бактерій із полярними джгутиками. Фундаментальні дослідження флуоресцентних бактерій роду *Pseudomonas* було проведено Джессеном. Більше ніж 800 штамів псевдомонад, в тому числі 354 штама

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

P. aeruginosa, були вивчені вивчені цим автором за 29 фенотиповим ознакам. У результаті були детально охарактеризовані типовий вид роду – *P. aeruginosa* – і флуоресцентна група в цілому. Вивчена колекція мікроорганізмів була розділена Джессеном на шість груп (відмінних одна від одної й розподілених, у свою чергу, на 82 біотипа). Першу групу склали штами *P. aeruginosa*, другу – *P. ovalis* і *P. putida*, третю – культури морського походження, четверту – штами *P. fluorescens*, п'яту – також штами *P. fluorescens*, але такі, що утворюють полісахариди на середовищах із сахарозою, і, нарешті, шосту групу – бактерії, патогенні для рослин [12;19].

Згодом, у результаті дуже великої кількості досліджень, численні, що раніше не дуже відрізняли види флуоресцентної групи (за виключенням *P. aeruginosa*) були «збільшенні» всього до двох – *P. Fluorescens* і *P. putida*. Останні, у свою чергу, були розділені на біотипи, що відрізняються спектрами вуглеводневого живлення і наявністю деяких ферментних систем [3; 11].

Всепроширенність роду *Pseudomonas* забезпечується також їх здатністю розвиватися в самих різноманітних умовах у природному середовищі. Бактерії даного роду здатні використовувати найрізноманітніші сполуки вуглеводню і азоту в енергетичному і

конструктивному обміні в процесах своєї життєдіяльності. У свою чергу, відмінності в фізіології окремих видів псевдомонад дозволяють представникам цього роду рости або зберігати життєздатність і в екстремальних умовах [12]. З цього випливає їх здатність рости на різноманітних та не дуже дорогих поживних середовищах, що є безперечним плюсом у економічному плані.

Температурні межі для розвитку більшості видів псевдомонад є доволі широкими (4 – 43°), багато видів цього роду є мезофілами і розвиваються за 27 – 30°, проте, зустрічаються термофільні і психрофільні штами. Не маючи здатності до створення спор чи цист, псевдомонади, тим не менш, витримують довготривале зневоднення без втрати життєдіяльності.

Метою нашої роботи було вивчення культурально-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей колекційних штамів *Pseudomonas putida* та визначення їх можливого використання у біотехнологічних розробках та технологіях захисту рослин.

Матеріали і методи дослідження. Робота виконана з використанням колекційних тест-культур *P. putida*. Як предмет досліджень використовували колекційні штами *P. putida*, які

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

зберігаються в колекції культур мікроорганізмів відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України: УKM Б-120, УKM Б-115Т(типова) = АТТС 12633= NCIB 9494= ВKM В-973;

8617 – джерело ізолювання – ґрунт.

8618 – джерело ізолювання – ґрунт.

8619 – джерело ізолювання – ґрунт.

8672 – надіслано у 1972 році Москва ІНМІ відділ типових культур.

Колекційні бактеріальні штами після разконсервації та відсіву перевіряли на однорідність культури за допомогою лупи, проглядаючи пробірки з культурами на світлі.

Перевіряли біологічні властивості дослідних культур, які тривалий час зберігались у колекції фітопатогенних бактерій.

Краплю досліджуваного матеріалу забирали мікробіологічною петлею, після чого обережно втирали культуру біля стінки чашки Петрі, а після, розтирали всійєю поверхнею середовища штриховими рухами. Штрихи розташовували максимально близько, але при цьому так, щоб вони не торкалися один одного. Штрихи проводили строго від краю до краю чашки – це гарантувало суцільний ріст на чашці. Не прокалюючи і не перевертаючи петлю, проводили посів на 2-й, а потім на 3-й чашці. За

такого посіву на 1-у чашку отримуємо багато матеріалу і відповідно багато мікробних колоній, на 2-у менше і на 3-у ще менше [15].

У результаті ми отримали ізольовані колонії під час посіву петлею. Для цього досліджуваний матеріал емульгували в бульйоні.

На 2-й день нами було проведено вивчення зростання мікробів на чашках. У першій чашці отримали суцільний ріст, виділити ізольовану колонію не вдалося. На поверхні агару в другій і третій чашці вирости ізольовані колонії. Їх вивчали неозброєним оком, за допомогою лупи. Потрібну колонію відзначили з боку дна чашки і пересіяли на скошений агар. Посіви були поміщені в термостат.

На 3-й день досліджень вивчали характер росту на скошеному агарі. Робили мазок, фарбували його і, переконавшись у тому, що культура чиста, перейшли до її вивчення. На цьому виділення чистої культури закінчилося [7; 10].

Далі нами були вивчені морфологічні, культуральні, біохімічні та фізіологічні властивості дослідних тест-культур. Морфологію клітин та колоній бактерій вивчали в процесі росту на картопляному агарі за 27°C протягом доби. Описували колір, форму, консистенцію колоній, визначали розмір колоній, проводили фарбування клітин за Грамом. Культуральні властивості ізольованих бактеріальних культур

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

вивчали за характером росту на м'ясопептонному агарі, м'ясопептонному бульйоні. Усі отримані нами дані представлені у розділі результати.

Для визначення рухливості, бактерії культивували у м'ясопептонному бульйоні протягом однієї доби. Мікроскопіювали у препаратах роздавлена або всяча крапля і визначали характер руху досліджуваних бактеріальних культур.

Біохімічні властивості досліджуваних тест-культур визначали за наявністю росту на різних джерелах вуглецевого живлення за зміною рН та газовиділенням на середовищах Омелянського з індикатором бромтимол синім. У якості джерела вуглецевого живлення в дослідженнях ми використовували наступні 0,1% розчини вуглеводів: моносахариди – арабіноза, глюкоза, манноза, рамноза, ксилоза; дисахариди – мальтоза, сахароза, лактоза; багатоатомні спирти – манніт. За традиційними методиками проводили визначення протеолітичної властивості [4;13].

Оксидазну активність визначали за модифікованою реакцією Kovachs [2].

Для цього використовували реактив NN – диметилфенілен солянокислий. За його допомогою визначається наявність або відсутність ферменту дихального

ланцюга – оксидази: краплину 1% розчину NN-диметил-м-фенилендіаміна солянокислого (0,5 г в 50 мл дистильованої води) наносили піпеткою на фільтрувальний папір. На змочений розчином фільтрувальний папір додали 1 добуву бактеріальну культуру за допомогою петлі. У разі позитивної реакції спостерігається почервоніння бактеріальної маси нанесеної на фільтрувальний папір. Відсутність почервоніння свідчить про відсутність ферменту у клітині. Досліджувані штами набули червоного кольору в результаті.

Збереження біологічних властивостей дослідних мікроорганізмів та відповідність їх класичним типовим зразкам отримали завдяки порівнянню їх за властивостями бактеріальних збудників представлених у літературних джерелах [2; 6; 14; 17] та властивостями типового штаму.

Результати дослідження та їх обговорення. Для початку роботи, потрібно було впевнитися у збереженні біологічних властивостей досліджуваними бактеріями, що тривалий час зберігалися у колекції. За допомогою лупи перевіряли спочатку чистоту обраних колекційних штамів. Впевнилися у відсутності зараження. Після чого, кожен штам відсіяли на маленький скошений агар по 2 рази. Посів робили мікробіологічною петлею, краплю досліджуваного матеріалу

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

брали петлею і обережно, не торкаючись стінок пробірки, розтирали поверхнею агару круговими рухами.

Після того, як отримали свіжу культуру на скошеному агарі, перевіряли також на чистоту і, впевнившись у тому, що зараження іншими мікроорганізмами немає – пересіяли кожен штам на чашки Петрі.

Таким чином, отримавши ізольовані колонії на чашках Петрі, на 3-й день перевірили їх на культурально-морфологічні ознаки. Потрібні колонії позначали з боку

дна чашки та вивчали неозброєним оком, за допомогою лупи.

Як показали результати досліджень, морфологія колоній дослідних штамів мала типовий вигляд як для представників виду *Pseudomonas putida*, а також не відрізняється від даних, представлених у літературних джерелах, що дає нам змогу впевнитися, що дані бактерії дійсно належать до роду *Pseudomonas*. У таблиці 2 представлені ознаки колоній, що утворилися на картопляному агарі протягом 3 діб.

2. Морфологічні особливості колоній досліджуваних штамів

Назва ознаки	Основні морфологічні ознаки
Форма колоній	Круглі, гладкі, з трохи ущільненим центром
Назва ознаки	Основні морфологічні ознаки
Розмір колоній	Від 1,1 – до 4,7 мм
Колір колоній	Молочно-білі, сіро-білі, блискучі
Краї колоній	Круглі, трохи хвилясті

Дані колонії можемо побачити на рисунку 1, представленому нижче.

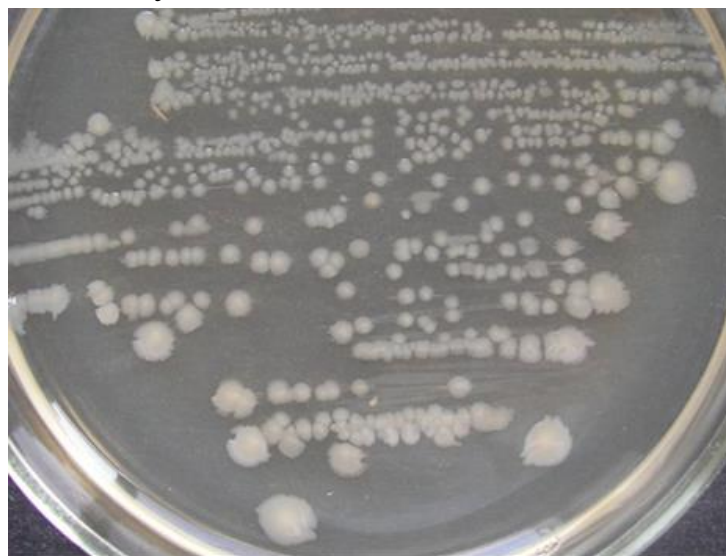


Рис. 1 Колонії бактерій *Pseudomonas putida*

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

Під час мікроскопіювання дослідні штами являли собою Грам-негативні, неспорогенні, рухливі палички, рух – поступальний, що характерно для лофотрихів, якими і є досліджувані нами бактерії *Pseudomonas putida*, оксидазопозитивні. Оксидази – це ферменти, які беруть участь в внутрішньоклітинних процесах окиснення, являються залізовмісними білками. Оксидази каталізують реакцію з'єднання H_2 з O_2 . Для фітопатогенних представників роду *Pseudomonas* є характерним негативна реакція на оксидазу, проте *Pseudomonas putida* є оксидазо-позитивною.

Даний вид є у більшості випадків виключенням із систематики роду *Pseudomonas*, проте міцно тримається в екологічній ніші разом з іншими псевдомонадами, незважаючи на багаточисленні переформування всередині роду.

Подальше вивчення збереження основних біологічних властивостей колекційних *Pseudomonas putida* проводили за фізіолого-біохімічними властивостями. Ріст і тип штамів на діагностичних середовищах ми порівнювали з колекційно-еталонними штамами та перевіряли їх ідентичність за літературними джерелами, та міжнародними загальноприйнятими висновками [6; 22; 30].

Фізіолого-біохімічні

властивості Pseudomonas putida. Отримані результати повністю зійшлися з даними, представленими у літературі з засвоєння вуглецю та азоту, як єдиного джерела живлення в таксономії дослідних культур. Також описано, що для видової диференціації *Pseudomonas putida* можна застосовувати й негативні показники, ніж схожість [6; 19], що і було продемонстровано у даному досліді.

Дуже цікавою особливістю є те, що представники саме цього виду не гідролізують желатин, що відрізняє їх від інших представників флюоресцентної групи псевдомонасів. Також нетиповим є наявність позитивної оксидазної реакції.

Досліджувані нами ізоляти, які за морфологічними, так і за фізіолого-біохімічними ознаками бути віднесені до роду *Pseudomonas*, використовували в якості джерел вуглецевого живлення глюкозу, галактозу, арабінозу, ксилозу, мальтозу, рамнозу так, як і еталонний штам. Не використовують трегалозу та сахарозу. Водночас, дуже багато показників були відмінними від показників *P. syringae*, що є патогеном. Це ще раз демонструє належність *Pseudomonas putida* до фітопатогенів.

Отже, нами було визначено, що колекційні штами *Pseudomonas putida*, які тривалий час зберігались у колекції ІМВ (Інститут Мікробіології

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

і Вірусології імені Д.К. Заболотного) зберегли свої основні біологічні властивості і можуть бути використані для подальших мікробіологічних і біотехнологічних досліджень.

Pseudomonas putida, є сапрофітними мікроорганізмами, і являються потенційними антагоністами для патогенних бактерій та мікроміцетів рослин, що захоплюють середовище ризосфери. Фітопатогенні бактерії, які

викликають хвороби сільськогосподарських та декоративних рослин, широко розповсюджені в Україні і наносять значну шкоду господарству України. Тому нами було проведено визначення можливої антагоністичної дії дослідних *Pseudomonas putida* на широке коло представників найбільш поширених та високоагресивних фітопатогенних бактерій. У таблиці 3 представлені результати проведених досліджень.

3. Чутливість представників основних родів фітопатогенних бактерій до колекційних штамів *Pseudomonas putida*

Культури	<i>P. putida</i> УКМ Б-120, УКМ Б-115 ^T	8617	8618	8619	8672
1. <i>Pseudomonas syringae</i> – УКМ В-1027 ^T (8511-ІМВ)	0	17±1,37	0	7,2±0,96	0
2. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	10±1,05	0	0	6,6±1,23	0
3. <i>Pectobacterium carotovorum</i> - УКМ В-1095 ^T	16±1,33	15±1,10 (б/ц+б/с)	0	5,6±1,36	0
4. <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> – УКМ В-1049	15±1,29	15±1,29	0	6,6±1,72	0
5. <i>Clavibacter michiganensis</i>	15±1,29	19±1,29	0	0,3±0,51	0
6. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 8628	0	0	0	0,3±0,69	20±0,74

Дослідження показали, що штам бактерій *Pseudomonas putida* 8617 проявляє високу антагоністичну активність до таких фітопатогенів, як *Pseudomonas syringae* – УКМ В-10277 (8511-ІМВ), *Pectobacterium carotovorum* - УКМ В-1095^T, та *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – УКМ В-1049. Також він здійснює

бактерицидну та бактериостатичну дію на *Pectobacterium carotovorum* - УКМ В-1095^T, затримуючи їх ріст. Певні показники перевищують навіть результати дії типового штаму *P. putida* УКМ Б-120, УКМ Б-115^T. Це свідчить про доцільність використання саме штаму *Pseudomonas putida* 8617 в боротьбі

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

проти даних збудників хвороб рослин.

Даний штам проявляв також активність проти *Clavibacter michiganensis*.

Водночас, штам є неактивним до *Pseudomonas fluorescens*, який також являється умовним фітопатогеном, а це є позитивним показником, що

означає, що дана бактерія не вступає в антагонізм із нешкідливими мікроорганізмами і не завдає їм шкоди.

Також штам 8617 не був активним і у відношенні *Agrobacterium tumefaciens* 8628. Результати представлені на рисунку 2.

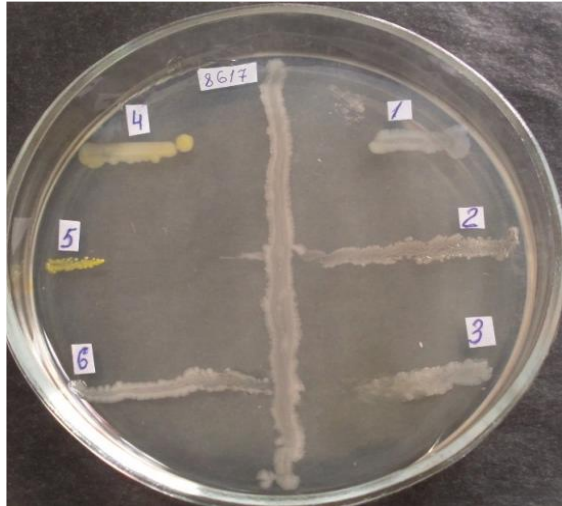


Рис. 2 Чутливість представників основних родів фітопатогенних бактерій до штаму *Pseudomonas putida* 8617

Штам *Pseudomonas putida* 8618 взагалі не проявив активності до жодного з досліджуваних фітопатогенів, що свідчить про неможливість використання його в захисті рослин проти конкретно цих збудників.

Штам бактерій *Pseudomonas putida* 8619 проявив слабку

активність проти всіх фітопатогенів родів *Pseudomonas*, *Pectobacterium*, та *Xanthomonas campestris* можливо, доцільно використовувати його у комплексі з іншими бактеріями для кращих результатів. Результати представлені на Рис.3

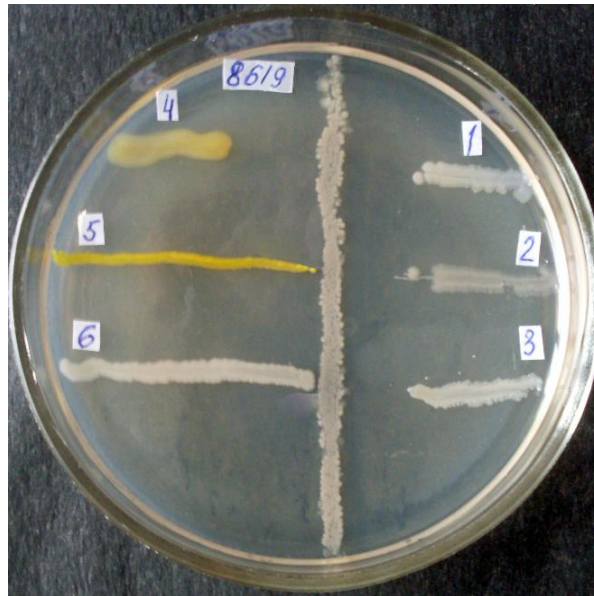


Рис. 3 Чутливість представників основних родів фітопатогенних бактерій до штаму *Pseudomonas putida* 8619

Колекційний штам *Pseudomonas putida* 8672 не мав антагоністичних властивостей у відношенні *Pseudomonas syringae* – УКМ В-10277 (8511-ІМВ), *Pseudomonas fluorescens*, *Pectobacterium carotovorum* - УКМ В-1095Т, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* – УКМ В-1049, *Clavibacter michiganensis*. Проте, проявив дуже високу активність проти *Agrobacterium tumefaciens* 8628. Тож, можемо припустити, що є перспективним створення біологічного препарату прямого спрямування проти бактеріального раку рослин на основі штаму *Pseudomonas putida* 8672.

Бактерії роду *Agrobacterium* викликають пухлини та плямистості рослин. Вони є факультативними паразитами. Утворюють нарости, які, в основному, локалізуються на шийці коренів уражених рослин, але вони

можуть розвиватися на інших частинах коренів і, рідше, на стовбурах (виноградна лоза). На відміну від інших збудників бактеріальних хвороб, він не вбиває рослинні клітини, а, навпаки, стимулює їх до нерегулярного поділу (завдяки дії плазміді). Часто пухлини покривають весь штамп або парость виноградної лози, повністю його деформуючи. У наших дослідженнях використані колекційні штами (колекція відділу фітопатогенних бактерій ІМВ), які зберігалися тривалий час і мають різні джерела ізолювання.

Для цього нами було проведено дослідження щодо антагоністичних властивостей проти ряду колекційних штамів *Agrobacterium tumefaciens* різних джерел походження. Адаже, за літературними джерелами відомо, що існує вибіркова штамона чутливість

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

бактеріальних культур до представлені на Рис. 4 біологічних антагоністів. Результати

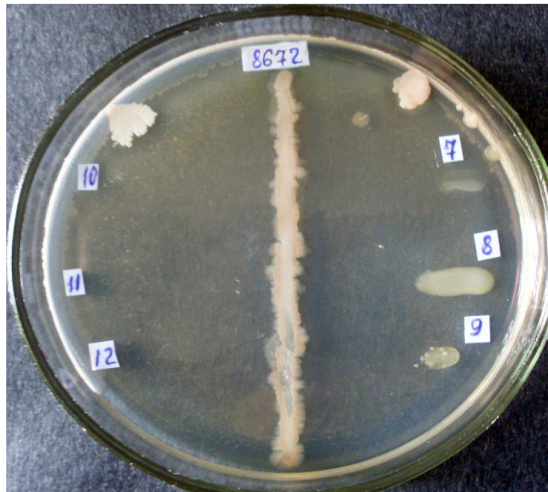


Рис. 4 Дослідження антагоністичної дії *Pseudomonas putida* 8672 проти *Agrobacterium tumefaciens* 6 - 8641; 7 - 8935; 8 - 8969; 9 - 8997; 10 - 9047; 11 – 9053; 12 – 8628.

Результати цього експерименту показали різну, проте дуже високу зону затримки у штамів *Agrobacterium tumefaciens*. Ми

вирішили провести дослідження з іншим штамом *Pseudomonas putida* – 8619. Результати представлені на Рис. 5.



Рис. 5 Чутливість представників роду *Agrobacterium* до штаму *Pseudomonas putida* 8619. 1 - 8464; 2 – 8465; 3 - 8470; 4 - 8471; 5 - 8629; 6 - 8641; 7 - 8935; 8 - 8969; 9 - 8997; 10 - 9047; 11 – 9053; 12 – 8628.

Отримані результати свідчать про значну штамову гетерогенність виду *tumefaciens* до дослідних антагоністів. Дослідний штам *Pseudomonas putida* 8619 не проявив себе в повній мірі як антагоніст проти даного виду фітопатогена, окрім штаму *Agrobacterium tumefaciens* 8629, де була повна

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

затримка росту культури та штамів *Agrobacterium tumefaciens* 8464, 8465, 8969, де було відмічено затримку росту культури.

Щодо штаму *Pseudomonas putida* 8672 можна сказати, що результати дослідження були кращі і зони затримки росту коливалися на рівні середньої і високої активності. Зокрема, штами *Agrobacterium tumefaciens* 9047, 9053, 8628 повністю був пригнічений антагоністом, штами 8935; 8969; 8997 були на середньому, або трохи вище середнього, рівні затримки росту. Тобто, цей штам доцільніше використовувати для боротьби с захворюваннями, що викликає *Agrobacterium tumefaciens* різних джерел походження.

Також, нами було проведено дослідження антагоністичної дії тест-штамів *Pseudomonas putida* проти гриба *Fusarium oxysporum*.

Fusarium oxysporum викликає в рослин судинне (трахеомікозне) зів'янення, він вражає переважно ксилемні тканини рослини, викликаючи зниження гідравлічного тиску всередині, внаслідок чого відбувається сильне зів'янення листя. Грибок вражає безліч видів сільськогосподарських культур, зокрема, горох, льон, ріпак, помідор, пшениця, бавовник тощо. [1; 17]

Результати виявлення антагонізму представлені на рисунках 6 та 7.

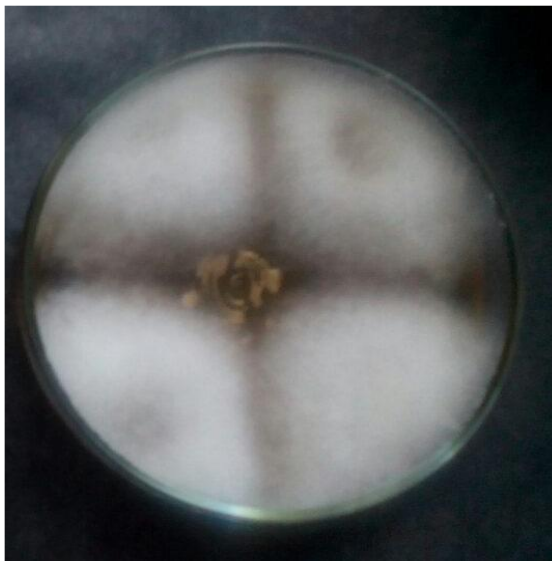


Рис. 6 Дослідження антагоністичної дії *Pseudomonas putida* 8617 проти *Fusarium oxysporum*



Рис. 7 Дослідження антагоністичної дії *Pseudomonas putida* 8618 проти *Fusarium oxysporum*

Висновки і перспективи.

Жоден із вивчених нами штамів не проявляв антагоністичної дії проти грибів *Fusarium oxysporum*, проте ще не можна зробити висновки, чи можна використовувати дані бактерії проти збудників хвороб цього роду, адже потрібно провести більше досліджень на цю тему в подальшому.

З отриманих результатів виходить, що досліджені штами фітопатогенних бактерій виявляють вибірково за ступенем чутливості до колекційних штамів *Pseudomonas putida*, які зберігались у колекції. Практично всі тест-культури –

Список використаних джерел

1. Ахатов А. К., Ганнибал Ф. Б., Мешков Ю. И. Болезни и вредители овощных культур и картофеля. М. : Товарищество научных изданий КМК, 2013. 463 с.

представники основних бактеріальних фітопатогенів були чутливими до штамів-антагоністів, за виключенням *Agrobacterium tumefaciens* (штам 8628 – збудника бактеріального раку рослин), антагонізмом якого був лише штам *Pseudomonas putida* 8672.

Проведені дослідження показали, що відібрані штами-антагоністи проявляють вибірково різного рівня пригнічуючий вплив на широкий спектр родів, видів та штамів фітопатогенних бактерій і є перспективними для використання у захисті рослин.

2. Бельтюкова К. И., Королева И. Б., Мурас В. А. Бактериальные болезни зернобобовых культур. К.: Наук. думка, 1974. 338 с.

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

3. Визначник бактерій Берджі: в 2 т. Т.1: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита. М. : Мир, 1997. 32 с.

4. Лабінська А. С. Микробиологія с техникой микробиологических исследований. Изд. 4-е, М. : Медицина, 1978. 394 с.

5. Ленгелер Й. «Современная микробиология: Прокариоты: В 2-х томах» Т. 2. Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. – М. : Мир, 2005. 496 с.

6. Люта В. А., Кононов О. В. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень та основами імунології. Київ: Здоров'я, 2006. 510 с.

7. Прозоркина Н. В., Рубашкина Л. А. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии. Изд. 6-е, стер. Серия "Среднее профессиональное образование "Ростов-на-Дону», «Феникс», 2012. 378 с.

8. Рубан Е. Л. «Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*» / ред. Е. Н. Мишустрина М. : Наука, 1986. 200 с.

9. Смирнов В. В., Киприянова Е. А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев : Наук. думка, 1990. 264 с.

10. Утевский Н. Л. Микробиология с техникой микробиологических исследований. Москва: Медицина, 1975. 471с.

11. Espinosa-Urgel M., Salido A., Ramos J. Genetic Analysis of Functions Involved in Adhesion of *Pseudomonas putida* to Seeds. Journal of Bacteriology. V. 182. p .2363-2369. URL: <http://jb.asm.org/cgi/content/full/182/9/2363>

12. Kowalski H. U. S. German Research Consortium Sequences Genome of Versatile Soil Microbe / [J.Craig Venter Archive]; December 2002.

13. Vandenberg P. A., Wright A. M. Plasmid Involvement in Acyclic Isoprenoid Metabolism by *Pseudomonas putida*. Applied and Environmental Microbiology. 1983. V.45. p. (1953-1955). URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=242567>

14. Ward P. G., Roo de G., O'Connor K. E. Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phylacetic Acid by *Pseudomonas putida* CA-3/. Applied Environmental Microbiology. 2005. Volume 71. p. 2046-2052. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1082534>

15. NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=21068>

16. Арданов П. Є., Лященко С. В., Подоліч О. В., Рязанцев В. Б., Заєць І. Є., Козировська Н. О. Застосування ендofітних бактерій для адаптації рослин картоплі *in vitro* до умов *ex vitro* з метою захисту посадкового матеріалу від фітопатогенів. Наука і інновації. Т. 6, № 6. 2010. 51-56 с.

References

1. Akhatov, A. K., Hannibal, F. B., Yu. I. Bags (2013). Diseases and pests of vegetable crops and potatoes. Moscow: Partnership of scientific publications KMK, 463 [in Russian].

2. Beltyukova, K. I. Koroleva, I. B., Muras, V. A. (1974). Bacterial diseases of leguminous crops. K. : Nauk. Dumka, 338 [in Russian] .

3. Hoult, J., Kriega, N. (1997). Visitor of bacterium Berge. In 2 volumes. V. 1: Per. from English at P. Snit. M : Mir, 32 [in Ukrainian].
4. Labinska, A. S. (1978). Microbiology with the technique of microbiological research. Ed. 4th. M. : Medicine, 394 [in Ukrainian].
5. Lengelera, J., Drevsa, G., Schlegel, G. (2005). Modern Microbiology: Prokaryotes: In 2 Volumes, v. 2. Per. from English. Mir, 496 [in Russian].
6. Lyuta, V. A., Kononov, O. V. (2006). Microcology with technology microbiological dostajen and basics of immunology. Kyiv: Health, 510 [in Ukrainian].
7. Prozorkina, N. V., Rubashkina, L. A. (2012). Fundamentals of microbiology, virology and immunology. Ed. 6th, erased. Series "Secondary vocational education" Rostov-on-Don, Phoenix. 378 [in Russian].
8. Ruban, E. L. (1986). Physiology and biochemistry of representatives of the genus *Pseudomonas*. M. : Science, 200 [in Russian].
9. Smirnov, V. V. Kipriyanova, E. A. (1990). Bacteria of the *Pseudomonas* genus Kyiv: Nauk. Dumka, 264 [in Russian].
10. Utevsky, N. L. (1975). Microbiology with the technique of microbiological research. Moscow: Medicine, 471[in Russian].
11. Espinosa-Urgel, M., Salido, A., Ramos, J. (2000). Genetic Analysis of Functions Involved in *Pseudomonas putida* to Seeds. Journal of Bacteriology, V.182, p. 2363-2369. DOI: 10.1128/JB.182.9.2363-2369, 2000 [in Russian].
12. Kowalski, H. (2002). U.S. – German Research Consortium Sequences Genome of Versatile Soil Microbe. J. Craig Venter Archive. CH December 2002. http://www.tigr.org/news/pr_12_02_02.shtml
13. Vandenberg, P. A. Wright, A. M. (1983). Plasmid Involvement in Acyclic Isoprenoid Metabolism by *Pseudomonas putida*. Applied and Environmental Microbiology. 45(6): 1953–1955. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=242567>
14. Ward, P. G., de Roo, G., O'Connor, K. E. (2005). Accumulation of Polyhydroxyalkanoate from Styrene and Phylacetic Acid by *Pseudomonas putida* CA-3. Applied Environmental Microbiology, 71, 2046-2052. doi: [10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005](https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.2046-2052.2005)
15. NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=21068>
16. Ardanov, P.E., S.V. Lyashchenko, Ryazantsev, V.B., Hare, I.E., Kozyorskaya N.O. (2010). Application of endophytic bacteria for the adaptation of in vitro potato plants to ex vitro conditions for the protection of post-material from phytopathenes Science and Innovation. 6, 6, 51-56 [in Ukrainian].

Патика М. В., Житкевич Н. В., Иванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
РИЗОСФЕРНЫХ БАКТЕРИИ
PSEUDOMONAS PUTIDA И ЕЕ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ
МЕТАБОЛИТЫ В РЕГУЛЯЦИИ
РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫХ
СИСТЕМ**

**Т. В. Иванова, Н. В. Житкевич,
М. В. Патика, Т. В. Тарасюк,
В. П. Патика**

Анотация. Цель. Изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств коллекционных штаммов *Pseudomonas putida* и определения их возможного использования в биотехнологических разработках и технологиях защиты растений. Методы. Использовали биотехнологические (получение и субкультивированием штаммов *P. putida* 8617, 8618, 8619, 8672 в условиях *in vitro*), микробиологические (получение изолированного колонии бактерий, изучение роста микробов на чашках, изучали характер роста на скошенном агаре, морфологические, культуральные, биохимические и физиологические свойства исследовательских тест-культур), статистические методы, световую микроскопию. Результаты. Проведенные опыты показали, что все исследовательские штаммы *Pseudomonas putida* однородные не были контаминированные но не мутировали, сохранили свои культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства и. Было определено, что коллекционные штаммы *Pseudomonas putida*, которые длительное время хранились в коллекции ИМО (Институт

микробиологии и вирусологии имени Д. К. Заболотного) сохранили свои основные биологические свойства и могут быть использованы для дальнейших микробиологических и биотехнологических исследований. Выводы. По результатам проведенных исследований и анализом литературных источников показано, что *Pseudomonas putida* отличается от других типичных представителей своего рода. Полученные результаты полностью сошлись с данными, представленными в литературе по усвоению углерода и азота, в качестве единственного источника питания в таксономии исследовательских культур

Ключевые слова: биологически активные метаболиты, *Pseudomonas putida*, растительно-микробные системы

**BIOLOGICAL PROPERTIES OF
RISOSPHERIC BACTERIA
PSEUDOMONAS PUTIDA AND
THEIR BIOLOGICALLY ACTIVE
METABOLITES IN REGULATION
OF PLANT MICROBIAL SYSTEMS**

**T. V. Ivanova, N. V. Zhitkevich,
M. V. Patyka, T.V. Tarasyuk,
V. P. Patyka**

Abstract. Purpose. Study of the cultural-morphological and physiological and biochemical properties of *Pseudomonas putida* collection strains and their possible use in biotechnological developments and plant protection technologies. Methods. Biotechnological methods were used (obtaining and subcultivation of strains *P. putida* 8617, 8618, 8619, 8672 *in vitro*), microbiological (obtaining an isolated colony of bacteria, studying the

Патика М. В., Житкевич Н. В., Іванова Т. В., Тарасюк Т. В., Патика В. П.

*growth of microbes on cups, studying the nature of growth on beveled agar, morphological, cultural, biochemical and physiological properties of experimental test cultures), statistical methods, light microscopy.. Results. The conducted experiments showed that all the experimental strains *Pseudomonas putida* were homogeneous, not contaminated and not mutated, retained their cultural-morphological and physiological and biochemical properties. It was determined that the collection strains *Pseudomonas putida*, which for a long time remained in the collection of IVB (Institute of Microbiology and Virology named after DK Zabolotny), have retained their basic biological properties and can be used for further microbiological and biotechnological research. Conclusions. According to the results of research and analysis of literary sources, *Pseudomonas putida* has been shown to differ from other typical representatives of its kind. The obtained results are completely consistent with the data presented in the literature on the absorption of carbon and nitrogen, as the only source of power in the taxonomy of experimental crops*

Key words: *biologically active metabolites, *Pseudomonas putida*, plant-microbial systems*