



Рослинництво, кормовиробництво

УДК 633.11:579.841.1:
632.95.024

© 2017

Л.М. Буценко,

кандидат
біологічних наук

Л.А. Пасічник,

доктор
біологічних наук

Н.М. Булеца

В.П. Патики,

академік НААН,
доктор
біологічних наук

Інститут
мікробіології і вірусології
ім. Д.К. Заболотного
НАН України

ВПЛИВ ІНСЕКТИЦИДУ АЛЬФА СУПЕР НА ФІТОПАТОГЕННІ БАКТЕРІЇ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* АГРОФІТОЦЕНОЗУ ПШЕНИЦІ

Мета. Вивчення впливу інсектициду альфа супер на морфологічну дисоціацію у фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978, збудників бактеріозів зернових культур. **Методи.** Використано класичні мікробіологічні та біохімічні методи, вивчено здатність бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* формувати біоплівки під час росту в поліпропіленових планшетах. **Результати.** Установлено, що інсектицид альфа супер характеризується незначною токсичністю щодо фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Показано, що за дії препарату альфа супер збільшується кількість R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Вивчено властивості індукованих інсектицидом альфа супер R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011. **Висновки.** Інсектицид альфа супер спричиняє морфологічну дисоціацію фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens*. R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens*, індуковані інсектицидом альфа супер, характеризуються більшою стійкістю та краще формують біоплівки, що збільшує можливості виживання цих фітопатогенних бактерій в агрофітоценозі.

Ключові слова: пестициди, інсектициди, альфа супер, *P. syringae* pv. *atrofaciens*, токсична дія, R-форми, фітопатогенні бактерії.

Постійно перебуваючи в агрофітоценозах, фітопатогенні бактерії зазнають впливу всіх хімічних речовин, які в значних кількостях використовують за інтенсивного вирощування сільськогосподарських рослин [1].

Однак із вивченням впливу пестицидів на біологічні об'єкти саме ця група мікроорганізмів майже повністю залишається поза увагою дослідників. Проте в наших дослідженнях було встановлено, що фунгіциди та

інсектициди, які не мають значного токсичного впливу на фітопатогенні бактерії виду *Pseudomonas syringae*, можуть виявляти мутагенну дію на ці бактерії. Крім того, було відзначено, що деякі інсектициди та гербіциди можуть зумовлювати морфологічну дисоціацію у фітопатогенних бактерій [1].

Морфологічна дисоціація в бактерій є одним із виявів мінливості мікроорганізмів [2–4]. Унаслідок морфологічної дисоціації бактерії, які утворюють на щільних середовищах гладенькі блискучі колонії (зазвичай вони позначаються як S-форма, від англ. *smooth* — гладкий), починають утворювати мутантні складчасті матові колонії (R-форма, від англ. *rough* — шорсткий) [3]. Морфологічна дисоціація в бактерій може виникати спонтанно або під впливом фізичних і хімічних чинників [2, 4]. Слід зазначити, що за морфологічної дисоціації змінюються також фізіологічні, біохімічні та імунологічні властивості бактерій. Явище дисоціації сприяє гетерогенності бактеріальної популяції, підвищує її стійкість, розширює межі виживання виду [2, 5]. Для фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* характерна природна мінливість популяції з розщепленням на різні морфотипи, однак, частота такої дисоціації невелика [4].

Особливе значення морфологічна дисоціація має для патогенних мікроорганізмів. У переважній більшості вона супроводжується зміною вірулентних властивостей бактерій. Здебільшого модифікація колоній із гладенького типу в шорсткий супроводжується зниженням чи навіть втратою вірулентності в патогенних видів, та для деяких збудників ці явища співвідносяться навпаки: R-форма — вірулентна, S-форма — слабовірулентна [2, 3].

Мета досліджень — вивчення впливу інсектициду альфа супер на морфологічну дисоціацію у фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978.

Методика досліджень. Об'єктом досліджень були штами *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 із колекції живих культур відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології НАН України: *P. syringae* pv. *atrofaciens* штам УКМ В-1011 (PDDCC

4394), неопатотиповий штам; *P. syringae* pv. *atrofaciens* штам 9400, виділений із листя пшениці ярої сорту Рання 93 у фазі кушіння (Київська обл.); *P. syringae* pv. *atrofaciens* штам 9417, виділений із листя пшениці ярої сорту Рання 93 у фазі колосіння (Київська обл.).

Досліджували інсектицид альфа супер («Агрікоптер Азія Лімітед», Гонконг, Китайська Народна Республіка) з діючою речовиною альфа-циперметрин, 100 г/л (хімічний клас синтетичні пиретроїди, II клас слабкотоксичні речовини). Альфа супер — це інсектицид контактної дії, який використовують для захисту пшениці озимої, ячменю, люцерни, гороху, капусти, яблуні, сливи, буряків цукрових проти шкідливої черепашки, пшеничного трипсу, п'явиці, попелиці, горохової зернівки, попелиці, трипси, совки, молі та ін. [6].

Культивування бактерій здійснювали на картопляному бульйоні та картопляному агарі за температури 28°C. Морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості бактерій визначали за описаними методиками [7].

Для виявлення здатності утворювати біоплівки бактерії культивували в поліпропіленових планшетах, уносили по 2 мл картопляного бульйону в лунки [8].

Реакцію надчутливості, серологічні властивості, здатність виживати за різних температури та концентрації солі визначали згідно з методичними рекомендаціями [7].

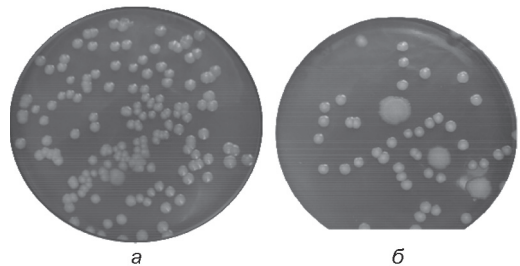


Рис. 1. Колонії *P. syringae* pv. *atrofaciens* на картопляному агарі: а — вихідний штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011; б — S- та R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 після дії інсектициду альфа супер

1. Морфолого-культуральна дисоціація *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* за дії інсектициду альфа супер

Показник	<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011		<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9400		<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> 9417	
	альфа супер	контроль	альфа супер	контроль	альфа супер	контроль
Частота появи R-форм	5×10^{-2}	5×10^{-3}	2×10^{-2}	1×10^{-3}	2×10^{-1}	5×10^{-3}
Час появи R-форм (години культивування)	8	24	24	48	24	48

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою пакета прикладних програм STATISTICA v.6.0.

Результати досліджень. За сучасного рівня розвитку сільського господарства неможливо повністю відмовитися від використання пестицидів (інсектицидів). Однак за можливості широкого використання пестицидів слід урахувати їх вплив на нецільові організми, з якими ці речовини контактують в агрофітоценозах.

Установлено, що інсектицид альфа супер не має антибактеріальної активності щодо фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens*. Після інокуляції фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens* з інсектицидом альфа супер спостерігали ріст на агаризованому середовищі колоній 2-х видів: типової S-форми (гладенькі, блискучі, з піднятим центром і рівними чи слабохвилястими краями) та видозміненої R-форми колоній (шорсткі, матові, плоскіші та більші, з нерівними краями) (рис. 1).

Для фітопатогенних бактерій *P. syringae*

явище спонтанної морфологічної дисоціації відоме давно [4], але частота такої дисоціації не перевищує 10^{-3} . Після обробки клітин *P. syringae* pv. *atrofaciens* інсектицидом альфа супер спостерігали значне — у 10–100 разів підвищення частоти морфологічної дисоціації. Частота появи R-форм залежала від штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens*. Так, для штаму *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 частота появи R-форм становила 5×10^{-2} , для *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9400 — 2×10^{-2} . Штам *P. syringae* pv. *atrofaciens* 9417 виявився чутливішим до досліджуваного інсектициду — частота появи R-форм становила 2×10^{-1} (табл. 1). До того ж появу індукованих інсектицидом R-форм спостерігали вже на початкових і ранніх стаціонарних стадіях культивування бактерій, спонтанні R-форми з'являлися в пізній стаціонарній і фазі відмирання.

Морфологічна дисоціація призводить не лише до зміни зовнішнього виду колоній бактерій, а й зміни їхніх фізіолого-біохімічних властивостей. Вона може впливати

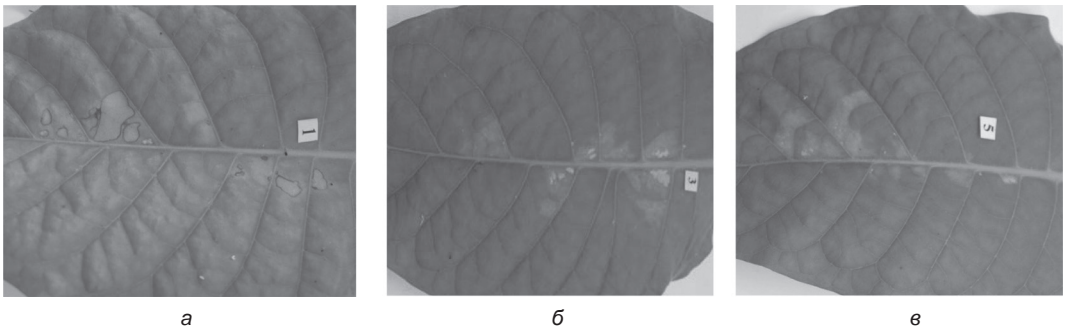


Рис. 2. Реакція надчутливості, спричинена штамом *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (а), його спонтанним (б) та індукованим пестицидом альфа супер (в) дисоціантами

2. Ріст S- та R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 за різних умов культивування

Умова культивування	Концентрація клітин <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011 через 48 год культивування, КУО/мл		
	S-форма	Спонтанна R-форма	Індукована інсектицидом R-форма
Ріст за температури:			
40°C	3×10 ⁵	27×10 ⁵	25×10 ⁵
6°C	13×10 ⁷	11×10 ⁷	12×10 ⁷
за концентрації NaCl 4%	15×10 ⁶	11×10 ⁶	28×10 ⁶

на їх здатність виживати в довкіллі, колонізувати різні поверхні, змінювати вірулентні властивості [3, 5, 9].

Вірулентні властивості фітопатогенних псевдомонасів корелюють із їх здатністю індукувати реакцію надчутливості на листках тютюну (РНЧ). Тому для перевірки збереження вірулентних властивостей у досліджуваних R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* перевіряли їх здатність індукувати РНЧ. Установлено, що *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 з видозмінених R-колоній спричиняли реакцію надчутливості на листках *Nicotiana tabacum* так само, як і типовий S-морфотип (рис. 2). За літературними даними, спонтанна морфологічна дисоціація *P. syringae* також не впливає на їх вірулентність [4].

Для вивчення здатності R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* виживати в навколишньому середовищі дослідили їхню здатність рости за високих і низьких температур та високої концентрації хлориду натрію. Установлено, що R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (спонтанна та індукована) краще, ніж вихідна S-форма ростуть за температури 40°C. Концентрація клітин R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 через 48 год культивування

була у 10 разів вищою, ніж концентрація клітин S-форми (табл. 2). Не було виявлено достовірної різниці в здатності S- та R-форм *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 рости за температури 6°C та концентрації NaCl 4% (табл.2).

Успішна колонізація поверхні рослини є необхідною умовою для виживання фітопатогенних бактерій і визначає можливість індукції ними патологічного процесу. Утворення біоплівки розглядається як одна зі стратегій колонізації бактеріями *P. syringae* рослин [10].

S- та R-форми бактерій можуть значно різнитися за здатністю формувати біоплівку на різних поверхнях [11] і здатністю до адгезії як першого етапу формування біоплівки [9].

Установлено, що спонтанна та індукована R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 краще формують біоплівку порівняно з S-формою цього штаму. Так, маса біоплівки, індукованої альфа супер R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011, була більш ніж удвічі, а спонтанної R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 — більш ніж утричі більшою порівняно з масою біоплівки, сформованою S-формою *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011 (табл. 3).

3. Накопичення біомаси в планктонній культурі та біоплівці S- та R-формами *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1011

Варіант досліджу	Накопичення біомаси в планктоні, E ₅₄₀	Біомаса біоплівки, E ₅₉₂
S-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,65±0,03	0,32±0,04
Спонтанна R-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,58±0,02	1,17±0,19
Індукована інсектицидом R-форма <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1011	0,55±0,01	0,75±0,04

Висновки

Установлено, що інсектицид альфа супер характеризується низькою токсичністю щодо фітопатогенних бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens*, які є збудниками бактеріозів зернових культур. Проте за його дії значно збільшується частота морфологічної дисоціації у фітопатогенних

бактерій *P. syringae* pv. *atrofaciens*. R-форми *P. syringae* pv. *atrofaciens* характеризуються підвищеною здатністю до формування біоплівки й активніше ростуть за температури 40°C зі збереженням вірулентності. Це може призвести до формування агресивніших популяцій цього збудника в природі.

Бібліографія

1. Specifics of pesticides effects on the phytopathogenic bacteria/V. Patyka, N. Buletsa, L. Pasichnyk et al.//Ecol. Chem. Eng. S. — 2016. — V. 23, № 2. — P. 311–331.
2. Милько Е.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации/Е.С. Милько, Н.С. Егоров. — М.: Изд-во МГУ, 1991. — 144 с.
3. Милько Е.С. Процесс диссоциации у бактерий: учеб. пособие/Е.С. Милько, И.Б. Котова, А.И. Нетрусов. — М.: МАКС Прес, 2007. — 68 с.
4. Естественная изменчивость морфолого-биохимических и патогенных свойств коллекционных культур фитопатогенных бактерий/В.А. Мурас, Р.И. Гвоздяк, Н.В. Житкевич, А.Г. Азимцев//Микробиол. журнал. — 1983. — Т. 45, № 5. — С. 36–42.
5. Rough and smooth morphotypes isolated from *Lactobacillus farciminis* CNCM I-3699 are two closely-related variants/R. Tareb, M. Bernardeau, P. Horvath, J.P. Vernoux//Int. J. Food Microbiol. — 2015. — V. 193, № 16. — P. 82–90.
6. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. — К.: Юніверс Медіа, 2014. — 832 с.
7. Methods in phyto bacteriology/Z. Klement, K. Rudolf, D. Sands et al. — Budapest: Academiai Kiado, 1990. — 568 p.
8. Особливості формування біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 при темновому та фотоіндукованому впливі вісмутмістких порфіринів/М.Б. Галкін, С.В. Водзінський, Г.М. Кириченко, В.О. Іваниця//Мікробіологія і біотехнологія. — 2010. — № 3. — С. 51–60.
9. Adhesion and splash dispersal of *Salmonella enterica typhimurium* on tomato leaflets: effects of rdar morphotype and trichome density/J.M. Cevallos-Cevallos, G. Gu, M.D. Danyluk, A.H. van Bruggen//Int. J. Food Microbiol. — 2012. — V. 160, № 1. — P. 58–64.
10. Ueda A. Characterization of the ability to form biofilms by plant-associated *Pseudomonas* species/A. Ueda, H. Saneoka//Curr. Microbiol. — 2015. — V. 70, № 4. — P. 506–513.
11. Greendyke R. Differential antibiotic susceptibility of *Mycobacterium abscessus* variants in biofilms and macrophages compared to that of planktonic bacteria/R. Greendyke, T.F. Byrd//Antimicrob Agents Chemother. — 2008. — V. 52, № 6. — P. 2019–2026.

Надійшла 25.01.2017.