

МОРФОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ФІТОПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ – ЗБУДНИКІВ БАКТЕРІОЗІВ ДУБА ЗВИЧАЙНОГО

Р.І. Гвоздяк, доктор біологічних наук, професор

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

А.Ф. Гойчук, доктор сільськогосподарських наук, професор

В.В. Розенфельд, кандидат біологічних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України

Наведено анатомо-морфологічні та фізіолого-біохімічні властивості фітопатогенних бактерій, ізольованих з м'якої гнилі жолудів, бактеріальної водянки, краплинної хвороби стовбурів, сухої гнилі гілок і стовбурів, раково-виразкового захворювання дуба звичайного, а також фітопатогенних бактерій – потенційних збудників бактеріозів дуба звичайного.

Ключові слова: дуб звичайний, штам, ізолят, фітопатогенні бактерії, анатомо-морфологічні властивості бактерій, фізіолого-біохімічні властивості бактерій.

Мета роботи полягала у вивченні анатомо-морфологічних та фізіолого-біохімічних властивостей збудників бактеріозів дуба звичайного з метою їх ідентифікації.

Об'єктом дослідження були виявлені в Україні бактеріальні хвороби дуба звичайного. Предмет дослідження – фітопатогенні бактерії, що спричинюють бактеріальні хвороби дуба звичайного.

Для досягнення поставленої мети застосовували загальноприйняті методи мікробіологічних досліджень [1, 2]. Для визначення видової приналежності бактеріальних ізолятів використовували «Bergey's manual of determination of Bacteriology» [3] та дані, які опубліковано у статтях, монографіях [4, 6].

Результати досліджень. Властивості *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* – збудника м'якої гнилі жолудів дуба звичайного.

Клітини *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* – грамнегативні палички розміром 0,5-0,8×1,4-2,1 мкм, рухомі, з перитрихальним розміщенням джгутиків, довжина яких у 3-4, іноді в 5 разів перевищує довжину бактеріальної клітини. На КА колонії круглі, розміром 1-2,5 мм, напівпросвічуються в світлі,

що проходить через них, янтарні, зі слабо помітними радіальними променями; поверхня поступово припіднята, гладенька, блискуча; по периферії проходить борозенка.

Край хвилястий, зубчастий. На МПА колонії круглі, з щільними краями, блискучі, білувато-сірі, напівпросвічуються. Бактерії добре ростуть в МПБ. На середовищах Кінга А колонії брудно-молочно білі, а на Кінга Б – молочно-білі, блискучі, ріст рясний, інтенсивний.

Всі штами досить активні на середовищах, які містять вуглеводи. Глюкозу, сахарозу, лактозу, маніт, сорбіт, рибозу, арабінозу, манозу і тригалоу ізоляти використовують вже через добу з виділенням кислоти та газу. На середовищах з целобіозою, інозитом, ксилозою, рамнозою, гліцерином бактерії утворюють тільки кислоту. Ескулін, рафінозу, саліцин і мелібіозу використовують з утворенням кислоти, або кислоти і газу. Не засвоюють дульцит і мальтозу. На мінеральному середовищі Омелянського (з джерелом азоту) ізоляти підлужнюють на 4-у добу аспаргін, глютамінову, аспаргінову, а 8-у добу – і γ -аміномасляну кислоти. Бактерії підлужнюють також мінеральне середовище Омелянського з кетоглутаровою, мурашиною і лимонною кислотами.

Бактерії розріджують желатин, редукують нітрати; молоко швидко згортають (зсідають), але не пептонізують. Виділяють сірководень, значно менше – аміак, але не індол; лакмусову сироватку спочатку підкислюють, а потім підлужнюють; крохмаль не гідролізують. Оксидазонегативні; не виявлені амілаза, уреаза, липаза, але є пектиноруйнуючі ферменти.

Властивості *Enterobacter nimipressuralis* – збудника бактеріальної водянки дуба звичайного.

Клітини *E. nimipressuralis* – грамнегативні, еліпсоїдні палички розміром 0,6-0,8×0,7-1,6 мкм. Клітини рухомі, з перитрихально розміщеними джгутиками, розміщуються поодинокі, парами, рідше – короткими ланцюжками.

На КА колонії круглі, діаметром 4-5 мм, сірі, сіро-білі, іноді з кремовим відтінком, напівпрозорі, випуклі, блискучі. Край колоній слабохвилястий, рідше рівний, по периферії проходить гофрована смужка, на світло добре видно радіальні промені і напівпрозорі круги.

На МПА колонії дрібніші, сірі, напівпрозорі, блискучі, гладенькі, слабовипуклі, зернисті. Край валоподібний, слабо-радіальноокреслений. Бактерії добре ростуть в МПБ, утворюючи рівномірне помутніння, пристіночне кільце, плівку і звурджений осад.

На середовищах Ейкмана, Ушинського, з аспаргіном утворюють білу, сіро-білу плівки. На середовищах Кінга А і Б колонії брудно-молочно-білі або молочно-білі, ріст рясний. Не ростуть на середовищі з дульцитом. Бактерії утворюють кислоту і газ на мінеральних середовищах з арабінозою, глюкозою, ксилозою, галактозою, фруктозою, сахарозою, мальтозою, лактозою, манозою, рафінозою, манітом, сорбітом, саліцином. У якості джерела вуглецю використовують деякі амінокислоти і аміді. Не відмічено змін у середовищі з цистинном, цистеїном, лейцином, триптофаном, тирозином. Не використовують винну та щавлеву кислоти, а на мінеральному середовищі з натрієвими солями кетоглутарової, лимонної, мурашиної, оцтової, яблучної, бурштинової, фумарової, молочної кислот відмічене інтенсивне їх піддуговування протягом доби.

Бактерії швидко згортають молоко, желатин не розріджують, не відмічено утворення оксидази, протопектинази; утворюють каталазу, уреазу; редукують нітрати.

Властивості *Erwinia quercina* – збудника краплинної хвороби жолудів дуба звичайного (в Україні виявлена на стовбурах дуба [5]).

Клітини *E. quercina* грамнегативні, дрібні, прямі, неспоронні палички розміром 0,6-1,1×1,0-2,5 мкм з перитрихально розміщеними джгутиками. На КА колонії дрібні, d=3 мм, білі, з рівним краєм і конусовидно піднятою, гладенькою, блискучою поверхнею. На МПА колонії невеликі, білуваті, блискучі, з рівним краєм, випуклі, майже непрозорі. В МПБ утворюють рівномірне помутніння, слабке пристіночне кільце і незначний осад. Добре ростуть на рідких середовищах Ейкмана, Ушинського, Фермі; не відмічено росту на середовищі Кона. На середовищах Кінга А і Б ріст рясний. Факультативний аероб. Оптимальна температура росту – 27-32°C.

Штами мають обмежений набір ферментів. На мінеральному середовищі Омелянського на другу добу ізоляти зображу-

ють з утворенням кислоти без газу глюкозу, сахарозу, гліцерин, саліцин, рибозу, манозу, ескулін, маніт; повільніше ферментують (на 4-5 добу) фруктозу, галактозу. Не ростуть на рамнозі, лактозі, ксилозі, мальтозі, рафінозі, інозиті, дульциті, мелібіозі, целобіозі. Варіабельні властивості отримані на арабінозі і сорбіті. На середовищі Омелянського з глюкозою (без азоту) бактерії підкисляють цистин, цистеїн, лейцин, тирозин і γ -аміномасляну кислоту, а аспаргін, аргінін, глутамін, глутамінову і аспаргінову кислоти підлужнюють. Ізоляти підлужнюють також мінеральне середовище Омелянського з кетоглутаровою, мурашиною, молочною та малоною кислотами. Ріст на молоці не відмічений. Штами не розріджують желатин, підлужнюють лакмусову сироватку з наступною редукцією; нітрати не відновлюють, не утворюють індолу, сірководню та аміаку.

Властивості *Erwinia rhapontici* – збудника сухої гнилі гілок і стовбурів дуба звичайного.

Клітини *E. rhapontici* – дрібні, неспороносні, грамнегативні, рухомі, тонкі або еліпсоподібні поліморфні палички з перитрихальним розміщенням джгутиків. В мазках із МПБ і КА клітини розміщуються переважно поодинокі, рідше – попарно або короткими ланцюжками. Факультативні аероби. На 5-10 добу утворюють рожевий, дифундуючий в агар, пігмент.

На КА колонії круглі, діаметром 3-4 мм, сірі, з блакитним або жовтувато-кремовим відтінком, напівпрозорі, іноді з більш темними, у вигляді пухирців газу, включеннями. Поверхня блискуча, слаборадіально розсічена, по краю розміщена борозенка. Центр поступово припіднятий, край гофрований. На МПА колонії з рівним краєм, випуклою блискучою поверхнею; не забарвлюються в рожевий колір. В МПБ ріст рівномірний по всій товщині бульйону з утворенням півки, пристіночного кільця і пухкого осаду. Культури добре ростуть на середовищах Ушинського і Фермі, але не на Ліске і Кона.

На середовищі Кінга А колонії брудно-молочно-білі, а на Кінга Б – блакитно-сірі. Крохмаль не гідролізують, відношення до нітратів не постійне і залежить від штаму, але більшість ізолятів їх не відновлюють; індол і сірководень не утворюють, аміак слабо виділяють не всі штами.

Бактерії утворюють кислоти без газу на арабінозі, рамнозі, ксилозі, глюкозі, галактозі, мальтозі, фруктозі, сахарозі, рафінозі, гліцерині, інозиті, сорбіті, маніті, дульциті, салі цині. Не засвоюють лактозу.

На середовищі Омелянського з глюкозою бактерії спочатку підкислюють, а через 4-6 днів підлужнюють аспарагін, глутамінову і аспаргінову кислоти, а цистин, цистеїн, лейцин, аргінін, глутамін, триптофан, тирозин; γ -аміномасляну кислоту підкислюють вже через добу без наступного підлужнювання. Ізоляти підлужнюють середовище з кетоглутаровою, мурашиною, молочною і яблучною кислотами; не використовують винну кислоту. Культури не розріджують желатин, активність на молоці дуже слабка, а більшість штамів залишають його без змін. Оксидазонегативні, не утворюють пектиноруйнуючих ферментів. Бактерії спочатку підкислюють лакмусову сироватку, а потім – підлужнюють з наступним відновленням.

Властивості *Pseudomonas fluorescens* і *Pseudomonas* sp. – збудників раково-виразкового захворювання дуба звичайного.

Клітини *P. fluorescens* грамнегативні, розміром 0,4-0,6×1,2-1,5 мкм, 0,7-0,8×2,0-3,0 мкм, неспоронсні, неоднакової товщини, рухомі (завдяки наявності одного або декількох полярних джгутиків) палички. На КА колонії досягають 5-8 мм в діаметрі, сіро-блакитні, іноді з кремовим відтінком, по периферії хвилясті, із зазубреними краями і горбистою поверхнею. Центр піднятий, біло-сірий, гладенький, блискучий. В МПБ помутніння починається зверху, згодом по всій товщині, утворюється плівка, слабкий осад і жовто-зелений флюоресцируючий пігмент. Бактерії добре ростуть на середовищах Фермі, Ейкмана (з утворенням плівки). Більш повільний ріст відмічений на середовищах Кона і Ліске; не ростуть на середовищі Чапека.

На середовищі Кінга А і Б вони утворюють дифундуючий в агар жовто-зелений пігмент. *P. fluorescens* – чітко виражений аероб. Бактерії не гідролізують крохмаль, не утворюють сірководень, індол, дуже слабо продукують аміак. Мають оксидазну, каталазну та уреазну активність. Не утворюють левансахаразу і лецитиназу. Молоко пептонізують, желатин

розріджують. Підлужнюють лакмусову сироватку з наступною редукацією; нітрати не редукують. На мінеральному середовищі Омелянського використовують арабінозу, ксилозу, глюкозу, галактозу, манозу, фруктозу, інозит, сорбіт, маніт з утворенням кислоти без газу. Не засвоюють лактозу, мальтозу, сахарозу, дульцит, саліцин, ескулін. Використовують з піддуговуванням середовища аргінін, аспаргін, аланін, аспаргінову, глютамінову і γ -аміномасляну кислоти, а також кетоглутарову, мурашину, малонову, яблучну органічні кислоти; лейцин і цистин утилізують з підкисленням середовища. Не використовують винну кислоту.

Бактерії роду *Pseudomonas* повільно ростуть на поживних середовищах, мають менші за розмірами колонії з кремовим відтінком і наявністю концентричних борозенок. На МПА колонії дрібні, 1-2 мм в діаметрі, сферичні, з рівним краєм, сіро-білі, більш прозорі. Бактерії інертні до всіх 18 випробуваних джерел вуглеводів як на мінеральному середовищі Омелянського, так і на середовищі Гісса. Ріст в МПБ різної інтенсивності, що залежить від штаму. Спочатку утворюється помутніння середовища, а потім формується плівка і слабкий осад. Бактерії використовують деякі амінокислоти і солі органічних кислот. Оксидазонегативні. Володіють каталазоною активністю; не виявлені пектиноуруйнуючі ферменти, амілаза, уреаза. Молоко тільки пептонізують. Лакмусову сироватку підлужнюють вже через добу. Оптимальна температура росту – 25-30°C. Мінімальна 4°C. Не ростуть при 41°C.

Властивості *Pseudomonas syringae van Hall* – збудника бактеріозів деревних рослин.

P. syringae – надзвичайно поширений вид, що складається з 41 патовара, які різняться між собою спеціалізацією на живильних рослинах. На деревних рослинах, у тому числі і на дубі звичайному, паразитує патовар *P. syringae pv. syringae*.

Клітини *P. syringae pv. syringae* грамнегативні, рухливі, за допомогою одного або декілька полярних джгутиків, розміщуються поодинокі, попарно або короткими ланцюжками.

На КА колонії круглі, брудно-білі з хвилястим краєм, поверхня припіднята, зерниста, центр ущільнений. На МПА колонії круглі, дрібні 2-3 мм в діаметрі. Краї рівні або хвилясті.

Бактерії дуже слабо ростуть на середовищі Кона, де утворюють незначну кількість білого осаду. На середовищі Ушинського – помірне помутніння з нижнім кільцем та плівочкою, або мало помітною зеленою флюорисценцією. На дні утворюється білий аморфний за структурою осад. На середовищі Фермі формують плівку та блакитно-зелену флюорисценцію.

Крохмаль не гідролізують або слабо гідролізують, желатину воронкоподібно розріджують, молоко протягом 2 тижнів пептонізують. Оксидазонегативні. Оптимальна температура росту +28°C, максимальна +35°C, мінімальна +1°C, термічна точка загибелі +51°C.

Бактерії не продукують індол та сірководень, аміак, оксидазу, амілазу, протопектиназу; відмічена наявність каталази, левансахарази, уреазі [6]. Лакмусову сироватку підлужнюють.

Бактерії використовують сахарозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, манітол, гліцерол, арабінозу, ксилозу, манозу, рафінозу, сорбітол з утворенням кислоти, але не ферментують лактозу, мальтозу, декстрин; не засвоюють казеїн, протеїн, глікопротеїн, тирозин, винну кислоту, амоній молочнокислий; володіють каталазною активністю, гідролізують сечовину, арбутин, ескулін [4].

Властивості *Erwinia horticola* – збудника чорного бактеріозу бука лісового (в експерименті патогенна і для дуба звичайного).

Клітини *E. horticola* – грамнегативні, дрібні, еліпсоїдні, не спороносні, рухомі палички з перитрихальним розміщенням джгутиків. В мазках із КА і МПБ розміщуються поодинокі, парами, короткими ланцюжками або скупченнями. На МПА колонії круглі, діаметром 4-5 мм, конусоподібні, іноді з запавшою шорсткою вершиною, слабохвилястим, майже рівним краєм; гладенькі, блискучі, сірі, напівпрозорі, маслянистої консистенції. На КА через 48 годин при 27°C утворюють дрібні, діаметром до 1-1,5 мм, випуклі, із рівним краєм, сіро-білі, гладенькі, напівпрозорі колонії. На 4-ту добу колонії виростають до 5-7 мм в діаметрі, підняті, конусоподібні, зі вчавленим центром, нерівним хвилястим краєм, іноді бубликоподібні, гладкі, блискучі, однорідні, від напівпрозорих у центрі до прозорих –

по краю, масляної консистенції. В МПБ вже через 16 годин спостерігається рівномірний ріст бактерій, через декілька днів поверхня бульйону покривається ніжною плівкою, на стінці – кільце, на дні – слабо в'язкий осад. Факультативний анаероб. Спостерігається помірний ріст на середовищах Георгія і Пое, Чапека, Ушинського, Фермі, Ендо. Не відмічений ріст на середовищах Кона, Ліске, Федорова, а також за наявності 10% NaCl. Нітрати відновлюють, утворення сірководню варіабельне і залежить від умов вирощування бактерій; аміак і індол не продукують. Не розріджують желатин, не пептонізують молоко, проте спостерігається дуже слабка його коагуляція, її можна виявити лише при нагріванні. Реакція Фогес-Проскауера негативна. Відновлюють лакмусову сироватку, утворюють спочатку кислоту, а через тиждень – луг. Повільно ростуть на манозі, ксилозі, арабінозі, саліцині. Видимий ріст і підкислення на цих вуглеводах можна спостерігати на 3-ю добу, тоді як на середовищі з глюкозою, галактозою, мальтозою, рафінозою, рамнозою, фруктозою, гліцерином, манітом – через добу після інокуляції. Не ферментують лактозу, інозит, етиловий спирт, винну і сульфанілову кислоти; бактерії засвоюють ескулін в аеробних і анаеробних умовах. Джерелом вуглеводів у середовищі можуть слугувати солі кетоглутарової, молочної, мурашиної, яблучної, лимонної і бурштинової кислот, амінокислоти і аміни, аспарагін, аспаргінова і глутамінова кислоти, гістидин. Не утворюють амілазу, лецитиназу, левансахарозу, протопектиназу, целюлазу, оксидазу, желатиназу, уреазу, позаклітинні нуклеази. Виявлені орнітин- і лізиндекарбоксілазна активності.

Властивості *Clostridium butyricum* v. *phytopathogenicum* – збудника пухлино-туберкульозного захворювання граба звичайного й інших лісових деревних рослин при штучному зараженні.

Вегетативні клітини *Cl. butyricum* v. *phytopathogenicum* являють собою грампозитивні спороносні поліморфні, розміром 0,8-0,9×3-5 мк, палички, які мають кластридальну форму при спороношенні. Утворюють капсулу. Рухомі, з перитрихальним розміщенням джгутиків.

Фітопатогенні кластридії на КА на другу третю добу утворюють масовому кількості спор розміром $0,9-1,2 \times 1,8-2,2$ мк. Менш сприятливим для спороношення є рідке середовище Рушмана. Навіть через 10-12 днів кількість спор на цьому середовищі незначна порівняно з вегетативними клітинами.

Бактерії добре ростуть на картопляних середовищах, особливо рідких, добавка до КА дріжджового автолізата або глюкози суттєво не впливає на ріст анаеробних бактерій. Добавка до середовища моркв'яного бульйону призупиняє ріст *Cl. butyricum v. phytopathogenicum*; бактерії погано ростуть на картопляно-соляному агарі. На КА видимий ріст *Cl. butyricum v. phytopathogenicum* з'являється через 2-3 доби. Колонії на КА через 3 доби неправильної форми із сильно хвилястим краєм, діаметром 2-3 мм, радіально бугриста, центр конусовидно припіднятий, блискуча, непрозора, сіро-жовтого кольору, слабоослизнена, з віком – маслянистої консистенції. Висока пектолітична активність добре проявляється на картоплі, але не на моркві і буряковому пектині.

Не виявлено протеологічної активності на МПА і желатині без і з добавкою глюкози, молоці із цистеїном і з глюкозою. Молоко тільки зсідається. Однак в МПБ і МПБ з сахарозою можна побачити ріст. Бактерії відновлюють лакмусове молоко, спочатку підкислюючи його. Не виявлена каталазна, оксидазна, терозиназна активність. Лецитиназа виявлена не у всіх штабів. Не утворюють індоли і сірководню.

Бактерії добре збражують на мінеральних середовищах лактозу, ксилозу, сахарозу, фруктозу, манозу, галактозу, целобіозу. На лактаті кальцію утворюється лише газ. Відношення до рафінози, рамнози, сорбіту, гліцерину, дульцину і маніту залежать від штаму. Не використовують у якості вуглеводного живлення амінокислоти і органічні кислоти, за виключенням молочної (лактат кальцію).

Кластридії значно відрізняються від аеробних бактерій термальними значеннями температури росту. Вони не ростуть на середовищі Рушмана при $+100^{\circ}\text{C}$, тоді як анаеробні і факультативні анаеробні неспороносні бактерії, як правило, розмножуються за цієї температури. Аеробні бактерії в більшості

не ростуть вище 40-420°C, а при 500°C – гинуть. Ріст фітопатогенних клостридій не припиняється при 500°C; мінімальна температура росту +150°C, оптимальна +28-370°C [4].

Висновки. Із бактеріальних уражень дуба звичайного виділено фітопатогенні бактерії, які за анатомо-морфологічними та фізіолого-біохімічними властивостями ідентифіковані як *Enterobacter nimipressuralis* (Carter, 1945) Brenner, Me Whorter, Kai, Steigerwalt and Farmer 1988; *Erwinia quercina* Hildebrand and Schroth 1967; *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948; *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* (Jones 1901) Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Hunton; *Pseudomonas fluorescens* Migula і *Pseudomonas sp.* Фітопатогенні бактерії *Pseudomonas syringae* van Hall; *Erwinia horticola* Beltjukova, Gwozdjak, Pastushenko, Zujkova, 1972 та *Clostridium butyricum* Plazmowski v. *phytopathogenicum* Gwozdjak, Chodas, Lipshic, які ізольовані з бактеріальних уражень інших деревних порід, в експерименті спричиняють захворювання дуба звичайного і є потенційними збудниками бактеріозів цієї цінної деревної породи.

Перспективи подальших досліджень мають бути спрямовані на розширення фітопатобактеріологічних досліджень як дуба звичайного, так і інших лісових деревних порід. Важливим є вивчення системної взаємодії фітопатогенних бактерій з іншими складниками мікробіоти деревних рослин.

Література:

1. Методы исследования возбудителей бактериальных болезней растений / Бельтюкова К. И., Матышевская М. С., Куликовская М. Д., Сидоренко С. С. — К. : Наук. думка, 1968. — 316 с.
2. Klement Z. Methods in phyto bacteriology / Klement Z., Rudolf K., Sands D. S. — Budapest : Academical Knido, 1990. — 568 p.
3. Bergey's manual of determination of Bacteriology. 8 th ed. — Baltimore : Williams and Wilkins, 1974. — 1268 p.
4. Гвоздяк Р. И. Бактериальные болезни лесных древесных пород / Гвоздяк Р. И., Яковлева Л. М. — К. : Наук. думка, 1979. — 244 с.
5. Гойчук А. Ф. Капельная болезнь дуба черешчатого в Лесостепи УССР // Фитонциды. Бактериальные болезни растений. — К. : Наук. думка, 1985. — С. 79—80.
6. Рыбалко Т. М. Бактериозы хвойных Сибири / Рыбалко Т. М., Гукасян А. Б. — Новосибирск : Наука, 1986. — 80 с.