

М.М. Вінчук,

кандидат сільськогосподарських наук, професор
(ЖДТУ, м. Житомир);

П. Веннман,

Т. Ослон,

Е. Марклунд

(Шведський університет сільськогосподарських наук, Упсала, Швеція)

ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЬОДОУТВОРЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ ОКРЕМИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ, ЩО ВИДІЛЕНІ ЗІ СТОВБУРІВ ВЕРБИ, ЛІСОВОЇ ПІДСТИЛКИ ТА ҐРУНТУ

Виявлено вплив температурних умов при вирощуванні штамів бактерій на прояв їх льодоутворювальної здатності. Окремі з досліджуваних штамів бактерій (*P. syringae* (2) та *Xanthomonas* (1)), виявили льодоутворювальну здатність при всіх температурах вирощування бактерій, а більшість інших штамів ($n = 10$) проявляли льодоутворюючу здатність лише у разі вирощування їх при температурах 15-20 °С. Лише у чотирьох штамів бактерій не було виявлено здатності формувати лід (замерзання при температурі нижче -5 °С). Проведені дослідження не дозволяють пояснити відсутність у більшості штамів здатності утворювати лід у разі вирощування штамів бактерій при низьких температурах. Ця обставина може бути наслідком фізіологічної приналежності згаданих штамів бактерій до психрофільних чи мезофільних угруповань.

Здатність деяких штамів бактерій формувати лід може викликати серйозні наслідки в насадженнях верби та інших дерев'янистих рослин, що вирощуються з метою одержання енергії. Крім того, деякі із згаданих штамів бактерій також можуть бути патогенними або підвищувати чутливість рослин до інших патогенних організмів.

Вважається, що властивість забезпечувати формування льоду в охолодженій воді, яка притаманна деяким бактеріям, зумовлюється наявністю специфічних льодоутворювальних генів (ЛЮ-генів). Такі гени є відповідальними за продукування певних білків, що виконують роль центрів ядер конденсації, сприяючи таким чином виникненню морозобійних тріщин у рослин. Ефект ураження, що викликаний утворенням кристалів льоду та збільшенням об'єму, пов'язаний зі стресовим станом рослин і супроводжується розривом епідермальних тканин. Цукри флоєми стають доступними для патогенів. У свою чергу розрив тканин рослин робить їх більш чутливими до патогенів [1]. Нездорові рослини, як і молоді тканини здорових рослин, є найбільш чутливими до дії низьких температур і, ймовірно, зазнають розривів уже при температурі від 0 до -5 °С, коли має місце льодоутворення з участю бактерій, а рослини ще не встигають акліматизуватись [2].

Уперше штами бактерій, що здатні утворювати лід, були виявлені у деяких епіфітних штамів, асоційованих з грушею, картоплею, томатами та деякими іншими рослинами [3]. Виділені штами належали до *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola* та *Pseudomonas fluorescens*. Встановлено також, що найвищий ступінь розвитку популяції льодоутворювальних бактерій (ЛЮБ) спостерігається через приблизно 6 тижнів після проростання однорічних рослин або розпускання бруньок широколистяних порід дерев, що свідчить про роль температури у доступності цукрів з бруньок, стебел та листків.

Найбільш дослідженими ЛЮБ є бактерії *Pseudomonas syringae*. У результаті проведених лабораторних тестів було встановлено [4], що бактерії *P. syringae*, ізольовані зі стовбурів тополі та верби (*Salix* spp), можуть формувати лід, а також є патогенами. *P. syringae* було виявлено в декількох відмінних мікробіологічних угрупованнях як епіфіт на більшості рослин, включаючи вербу [5, 6, 7], а також як патогенний ендодіт.

У попередніх дослідженнях [4] було встановлено, що формування льоду спостерігалось в діапазоні температур між 0 °С та -9 °С. Прийнято, що формування льоду при температурі замерзання -5 °С або вище є свідченням присутності ЛЮБ.

У нашій роботі були досліджені бактерії, що здатні формувати лід. Такі бактерії виявлені серед 16 штамів бактерій, що належать до 7 груп, зокрема *Bacillus*, *Clavibacter*, *Pseudomonas fluorescence*, *P. syringae*, *Sphingomonas*, *Erwinia herbicola* та *Xanthomonas*. Досліджувані бактерії були ізольовані зі стовбурів верби (*Salix*), з лісової підстилки та ґрунту, відібраних у місцях зростання верби. Було досліджено здатність ЛЮБ формувати лід в охолоджену розчину. Спочатку штами бактерій, що аналізувалися, були досліджені шляхом проведення окремих загальноприйнятих фізіологічних тестів з наступним вирощуванням останніх на поживних середовищах при різних температурах. Після пророщування штамів бактерій були досліджені щодо здатності формувати лід. Досліджувані штами бактерій було поділено на 12 груп, відповідно грам-позитивні та грам-негативні, щодо їх реакції на окислення та тест на флуоресценцію. Досліджувані штами бактерій виявили різні здатності щодо вирощування при температурах +2, +4, +10, +15 та +20 °С. При температурі +2 та +4 °С більшість з досліджуваних штамів показали добрі темпи росту на четвертий – шостий день після інокуляції. При вищих температурах усі досліджувані штами показали ознаки доброго росту уже на другий день після інокуляції. Результати досліджень показали, що ЛЮБ були присутні у всіх трьох середовищах, що досліджувалися.

Об'єкти досліджень

2.1. Класифікація досліджуваних штамів бактерій

Штами бактерій, які потенційно здатні забезпечувати формування льоду, були ізольовані з насаджень верби (стовбури дерев), листяного опаду та ґрунту восени 2002 року. Плантації насаджень верби (*Salix*) розміщені в

Brunnby, Västerås, Швеція. Всього було відібрано та інокульовано дев'ять штамів бактерій з кожного із зазначених вище місць відбору зразків. Штами бактерій були інокульовані протягом одного дня на різних поживних середовищах з метою наступної їх ідентифікації. Штами бактерій було тестовано з метою виявлення їх приналежності до грам-позитивних чи грам-негативних, щодо їх реакції на окислення, тест на флуоресценцію та каталазну реакцію. Після ідентифікації штами бактерій були поділені на 12 груп (табл. 1). Додатково було ідентифіковано два штами бактерій, з якими проводилося порівняння (V_1D_1 та *Bacillus subtilis*).

Таблиця 1.

Групування штамів бактерій, досліджуваних на здатність формувати лід, відповідно до їх реакцій на проведені тести

Група	Представники груп	Ідентифіковані штами бактерій*	Грам** реакція	Реакція окислення	Реакція на флуоресценцію
1	Не тестовано		+	+	+
2	<i>Bacillus</i>	S 12, F 265, A 34	+	+	-
3	Не тестовано		+	-	+
4	<i>Clavibacter</i>	M 275, A 21	+	-	-
5	Не тестовано		+	- +	+
6	Не тестовано		+	- +	-
7	<i>Pseudomonas fluorescence</i>	S 320, F 50, A 56	-	+	+
8	<i>Sphingomonas</i>	E 200, F 69, A 96	-	+	-
9	<i>Pseudomonas syringie</i>	S 229, F 202, V_1D_1	-	-	+
10	<i>Erwinia</i>	F 67, A 12, S 262	-	-	-
11	Не тестовано		-	- +	+
12	<i>Xantomonas</i>	S 117	-	- +	-

* штами бактерій були ізолювані з ґрунту (A), лісової підстилки (F) та стовбурів верби – (M, E та S)

** "+" реакція позитивна; "-" реакція негативна; "- +" слабка реакція

2.2. Вирощування штамів бактерій при різних температурах для проведення тесту на формування льоду

Для проведення тесту на здатність формувати лід необхідно, щоб культура бактерій перебувала на завершальній експоненціальній стадії росту та розвитку. З цією метою штами бактерій було тестовано щодо їх здатності рости та розвиватися при різних температурах. Для проведення вищезазначеного тесту всі штами бактерій були заново інокульовані та поміщені у шафи з автоматичним підтриманням температури для наступного росту та розмноження. Штами бактерій вирощувалися при температурі +2, +4, +10, +15 та +20°C. Здатність бактерій до росту та розмноження при згаданих температурах перевірялася через один, два та шість днів після початку експерименту.

2.3. Основні характеристики досліджуваних штамів бактерій

Clavibacter: грам-позитивний, з негативною реакцією на окислення та флуоресценцію штам, який містить найбільш важливі фітопатогенні бактерії. В середовищі *Clavibacter* присутній переважно у ґрунті, а також як рослинний епіфіт. Бактерії переважно не рухливі, але деякі представники що входять до цього штаму можуть рухатися з допомогою одного або двох полярних джгутиків [7].

Pseudomonas syringae: грам-негативний, з негативною реакцією на окислення та позитивною реакцією на флуоресценцію патогенний для рослин штам бактерій, що утворює жовто-зелений дифузивний пігмент, здатний до флуоресценції [7]. В середовищі *Pseudomonas syringae* присутній переважно як ендofітні бактерії. Патогенність цих бактерій проявляється через ураження листових пластин, що супроводжується хлорозом та некрозом тканин листків та стовбура рослин.

Pseudomonas fluorescence: грам-негативний, з позитивною реакцією на окислення та флуоресценцію штам, який містить жмут полярних джгутиків. Здебільшого поселяються в підстилці та ґрунті і можуть бути зрідка патогенними для рослин та тварин.

Xanthomonas: Грам-негативний бактеріальний штам з слабкою реакцією на окислення та негативною реакцією на флуоресценцію. Характерною рисою такого штаму бактерій є наявність пігментів, що мають жовтий колір. Всі представники цього штаму є добре відомими патогенами рослин, багато з яких є ендofітними, тому

виявлені лише в асоціації з рослинами та тваринами. Викликають некротичні ураження листкових пластин, стовбурів, плодів, а також їх в'янення та гниль.

Sphingomonas: грам-негативний, з позитивною реакцією на окислення та негативною реакцією на флуоресценцію штаму бактерій, що набувають жовтого забарвлення, коли вирощуються на азотовмісному агарі. Класифікація цього штаму дещо ускладнена. 16S-RNA аналіз *Sphingomonas* свідчить про близьку його подібність до роду *Pseudomonas syringae*, хоча за морфологічними ознаками спостерігається подібність до *Erwinia*. *Sphingomonas* є надзвичайно фітопатогенним штамом і трапляється переважно як ендоефітні бактерії.

Erwinia herbicola: епі/ендоефітний бактеріальний штаму, що характеризується як грам-негативний, з негативною реакцією на окислення та флуоресценцію *Erwinias* є виключно патогенними бактеріями рослин, що є факультативними анаеробами. Деякі здатні викликати некротичні ураження та хвороби в'янення, інші – м'яку гниль рослин.

2.4. Методика визначення присутності льодоутворювальних бактерій

Для оцінки присутності льодоутворювальних бактерій 16 досліджуваних штамів бактерій та два контрольних штами було перевірено в лабораторії Шведського університету сільськогосподарських наук. Культури бактерій були інокульовані в TSA (чашках Петрі) та вирощені при температурах +2 °C, +4 °C, +10 °C, +15 °C та +20 °C протягом 2, 3 та 6 днів залежно від штаму та температури. Після чого в стерильних умовах було приготовлено бактеріальну суспензію, до складу якої входили 0.01 M MgSO₄ та культура бактерій, вирощена на агаровому середовищі. З виготовленої таким способом бактеріальної суспензії було відібрано зразки в 50, 50 та 100 μ л (у трьох повторностях), які було перенесено в попередньо стерилізовані скляні пробірки з додаванням 9 мл розчину 0.01 M KН₂РO₄ як буфера.

Вміст пробірок було доведено до гомогенного стану шляхом вихороподібного перемішування на спеціальному обладнанні з наступним збовтуванням протягом 10 хвилин перед тестуванням в охолоджувальній ванні (96 % етиловий спирт).

Зниження температури проводилося через кожні 20 хвилин на 1 °C при початковій температурі 2 °C. Спостереження за формуванням льоду проводилося двічі при кожному зниженні температури.

Результати досліджень

3.1. Групування бактеріальних штамів

Досліджувані штами бактерій було виділено в 12 груп відповідно до відношення їх до таких реакцій (таблиця 1):

- Грам-позитивні, негативні;
- Реакція на окислення;
- Реакція на флуоресценцію.

Усі штами бактерій, виділених з ґрунту, підстилки та стовбурів верби (*Salix* spp.) було розподілено на 12 груп. Шість з ізольованих штамів, що належать до груп *Bacillus* та *Clavibacter* виявили Грам-позитивну реакцію, деякі з них також виявили позитивні реакції на окислення та флуоресценцію. Більшість з досліджуваних штамів бактерій (тринадцять зразків) виявилися грам-негативними бактеріальними штамми, що виявляли як позитивну, так і негативну реакцію на окислення та флуоресценцію. Окремі штами, такі як S117 та інші, виявили слабу реакцію на окислення. Штаму *Pseudomonas syringie* виявився грам-негативним, з негативною реакцією на окислення та позитивною на флуоресценцію.

3.2. Дослідження росту бактеріальних штамів

Дослідження росту бактеріальних штамів проводилося шляхом візуального спостереження за розвитком колоній інокульованих бактерій. Штами бактерій, що вивчалися, виявили різну здатність для росту та розвитку. Так, при температурі +15 та +20 °C всі бактеріальні штами показали гарні темпи росту уже після двох днів з часу інокуляції. При температурі +10 °C лише окремі з досліджуваних штамів, зокрема A56, E320, F69, F96 та 262, виявили ознаки доброго росту після двох днів спостережень. Решта штамів вимагали додаткового часу для досягнення достатніх темпів росту. При температурі +2 та +4 °C лише штаму A56 добре розвивався після двох днів, що пройшли з часу інокуляції. Крім того, більшість з досліджуваних штамів при цій температурі виявили ознаки росту лише через чотири або шість днів після інокуляції.

3.3. Результати досліджень присутності льодоутворювальних бактерій

У таблиці 2 наведено температуру, при якій спостерігалось утворення льоду у пробірках з досліджуваними зразками. Зауважимо, що задля чистоти експерименту та з метою уникнення одержання неоднозначних результатів вимірювання при температурі -25 °C (температура замерзання буферного розчину) не проводилися.

Таблиця 2.

Температура замерзання досліджуваних штамів бактерій, вирощуваних при різних температурах

Групи бактерій	Номер бактерій	Температура, при якій вирощувалися штами бактерій (°C)					
		2	4	10	15	20°	25*

2	S12	×	-14	-14	×	-3	-11
2	F265	×	×	×	×	-3	-12
2	A34	×	×	×	-4	-4	-10
4	A21	×	×	×	-4	×	-11
7	F50	-8,9	-12	-12	-3	×	-11
7	A56	×	×	×	-4	-4	-8
7	S320	-14	×	-14	×	-12	-5
8	E200	-14	-12	-12	-6	-9	-6
8	F69	-11,5	-12	×	-10	-4	-11
8	A96	×	×	×	×	×	-11
9	S229	-2,2	-2,2	-4	-3	-2	-4
9	F202	×	-13	×	-9	-4	-15
9	V ₁ D ₁	-4	-4	-4	-3	-3	-2,5
10	F67	-14	-14	×	-4	×	-12
10	A12	×	×	×	×	-14	-7
10	S262	×	×	×	×	×	-11
12	S117	-4	-3	-4,5	-4	-4	-3

× Лід не утворювався до температури замерзання буферного розчину.

* Згідно з даними попередньо виконаних експериментів Evi Marklund, Шведський університет сільськогосподарських наук.

Як згадувалося раніше, лише бактерії, які здатні проявляти ген, що забезпечує формування льоду при температурі $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ або вище, розглядаються як ті, що потенційно здатні викликати ураження рослин. Вважається, що при температурах нижче $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ рослини встигають адаптуватись (акліматизуватись) до дії низьких температур і краще переносять пошкоджуючу дію льоду. В таблиці, наведеній нижче, спостерігається деяка закономірність між зростанням температури, при якій вирощувались штами бактерій, та здатністю проявляти ген льодоутворення. Крім того, дані, одержані в експерименті, не дають підстав з достатньою долею ймовірності стверджувати про достовірність такої залежності, що потребує подальших досліджень.

Таблиця 3.
Відсоток бактеріальних штамів, здатних до льодоутворення залежно від температури росту, %

Інтервали температури замерзання, $^{\circ}\text{C}$	Температура росту, $^{\circ}\text{C}$				
	2	4	10	15	20
від -1 до -5	19	19	19	50	56
від -6 до -12	13	13	13	19	13
не утворювали лід при -12	68	68	68	31	31

4. Обговорення результатів досліджень аналізованих штамів бактерій.

4.1. *Bacillus*

У межах цієї групи спостерігалася цікава закономірність. Існує ймовірність того, що було ізольовано ту саму групу бактерій з усіх трьох досліджуваних місць відбору зразків. До того ж встановлено, що проявлення гена, відповідального за утворення льоду, спостерігалася лише в штаммах бактерій, які росли при температурі 15 та 20 $^{\circ}\text{C}$. Наразі ми не можемо пояснити причину такого явища. Здатність утворювати лід виявлено у S12, F265 та A34.

4.2. *Clavibacter*

У межах цієї групи вирощувалися лише штами бактерій, ізольовані з ґрунту. A21, схоже, проявляє льодоутворювальні властивості лише тоді, коли вирощується при температурі 15 $^{\circ}\text{C}$. Результати свідчать, що температурні умови при вирощуванні штамів бактерій справляють вплив на прояв їх льодоутворювальної здатності. Крім того, остаточні висновки щодо цієї групи бактерій можна буде робити лише після проведення додаткових досліджень.

4.3. *Pseudomonas fluorescense*

Досліджувані штами бактерій можуть розглядатись як патогенні, коли вирощуються при вищій температурі.

F50: Лід +. Бактерії проявляють чітку здатність щодо утворення льоду і можуть розглядатись як патогенні, коли вирощуються при температурі 15 $^{\circ}\text{C}$.

A56: Лід +. Льодоутворювальна здатність проявляється досить чітко, особливо коли вирощуються при підвищених температурах.

S320: Лід –. Льодоутворювальну здатність не виявлено при температурах вирощування до 20 °С. В інших дослідах лід формувався, коли штами бактерій вирощувалися при температурі 25 °С, що свідчить про можливість прояву гена при вищих температурах.

4.4. *Sphingomonas*

У межах цієї групи здатність утворювати лід спостерігалася лише у штамів бактерій, що росли при низьких температурах. Результати свідчать, що бактерії даної групи не становлять небезпеки для рослин з точки зору ураження внаслідок утворення льоду.

E200: Лід +. Утворює лід, але не розглядається як патоген.

F69: Лід +. Утворює лід і може розглядатись як патоген при вирощуванні при температурі 20 °С.

A96: Лід –.

4.5. *Pseudomonas syringae*

Єдиним узагальненням в межах цієї групи є здатність формувати лід. Таку здатність проявили всі три штами бактерій. Варто зауважити, що в подальших дослідженнях щодо впливу температури вирощування штамів бактерій на їх здатність формувати лід варто зосередити увагу на V₁D₁ та S229.

S229: Лід +. В наших дослідженнях льодоутворювальна здатність цих бактерій проявилася досить чітко, особливо в діапазоні порівняно високих температур, причому незалежно від температури, при якій ці бактерії вирощувалися. Одержані результати підтверджуються попередніми дослідженнями.

F202: Лід +. Як багато інших, ці бактерії потенційно здатні формувати лід, особливо коли вирощуються при температурі 20 °С.

V₁D₁: Лід +. Ці бактерії використовувались як еталон, з яким порівнювались інші бактерії. Одержані результати підтверджуються попередньо одержаними даними.

4.6. *Erwinia*

Бактерії в межах цієї групи виявили здатність до льодоутворення при низьких температурах. З огляду на це зазначена група бактерій може розглядатись як така, що не являє собою небезпеки для рослин в умовах низьких температур.

F67: Лід +. Утворює лід, коли вирощується при температурі 15 °С.

A12: Лід –. Згідно з нашими даними не утворює льоду, хоча в попередніх дослідженнях утворення льоду спостерігалось при температурі –7 °С, коли бактерії вирощувалися при температурі 25 °С.

S262: Лід –.

4.7. *Xanthomonas*

S117: Лід +. Це був єдиний штам із зазначеної групи, у якого виявлено льодоутворювальну здатність у всьому діапазоні досліджуваних температур вирощування бактерій.

Висновки

У результаті проведених досліджень були виявлені льодоутворювальні здатності в усіх групах бактерій. Три з досліджуваних штамів виявили льодоутворювальну здатність при всіх температурах вирощування бактерій (*P. syringae* (2) та *Xanthomonas* (1)), а більшість інших штамів (n = 10) проявляли льодоутворювальну здатність лише у разі вирощування їх при температурах 15-20 °С. Як свідчать результати попередніх тестів, льодоутворювальна здатність бактерій знижувалася при вирощуванні їх при підвищених (25 °С) температурах. Лише у двох штамів бактерій (чотири в нашому випадку) не було виявлено здатності формувати лід (замерзання при температурі нижче –5 °С). Проведені дослідження не дозволяють пояснити відсутність у більшості штамів здатності утворювати лід у разі вирощування штамів бактерій при низьких температурах. Ця обставина може бути наслідком фізіологічної приналежності згаданих штамів бактерій до психрофільних чи мезофільних угруповань.

Гени, що зумовлюють формування льоду, добре відомі у групах 7, 9, 10 та 11, але не відомі в групах 2, 4 та 8. Таким чином, результати наших досліджень є новими стосовно штамів бактерій, виділених з ґрунту та лісової підстилки, які належать до груп 2, 4, 7, 8, 9 та 10. Останні варто дослідити: чи проявляють вони ознаки патогенності, напр., у відношенні до верби.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ТА ЛІТЕРАТУРИ

1. Nejad P., Ramstedt M. & Granhall U. Synergistic Effects between Frost Damage and Bacterial Infection in Salix plants. Unpublished.
2. Granhall, U. fil. Dr. Professor. Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural science, Uppsala, Sweden. *Особисте спілкування.*
3. Lindow S. E. Population dynamics of ice nucleation active bacteria on frost sensitive plants and frost control by means of antagonistic bacteria. In: Plant Cold Hardiness (P.H. Li and Sakai, A., eds). Academic press. N.Y. – 1982. – P. 395-416.
4. Ramstedt M., Astrom B. & Von Fricks H.A. Dieback of poplar and willow caused by *Pseudomonas syringae* in combination with freezing // Ecm. Stress. For. Path. – 2002. – № 24. – P. 305-315.
5. Lindow S. E., Arney D. C., & Upper C. D. Distribution of ice nucleation active bacteria on plants in nature. // Appl. Environ. Microbiol. – 1978. – № 36. – P. 831-838.

6. Maki L. R. & Willoughby K. J. Bacteria as biogenic sources of freezing nuclei. // J. Appl. Meteorol. – 1978. – № 17. – P. 1049-1053.
7. Agrios G.N. Plant Pathology. ACADEMIC PRESS, Inc. (London) Ltd. – 1988. – 804 pp.

Матеріал надійшов до редакції 10.02.2005 р.

Виничук М.М, Веннман П., Ослон Т., Марклунд Е. Исследование льдообразующей способности отдельных штаммов бактерий, выделенных из стволов ивы, лесной подстилки и почвы.

Исследовано влияние температурных условий при выращивании штаммов бактерий и их способности формировать лед. Отдельные из исследуемых штаммов бактерий проявили льдообразующую способность при всех температурах выращивания бактерий, тогда как большинство других штаммов проявляли льдообразующую способность только в случае выращивания их при температурах 15-20 °С.

Vinichuk M. M., Wennman P., Olsson T., Marklund E. Ice Nucleation Active Bacteria in Willow, Litter and Soil

The paper investigates into the effects temperature conditions when growing bacteria strains and their capacity for ice nucleating. Certain bacteria investigated revealed their ice nucleation capacities of forming ice at all temperatures at the same time the majority of other strains displayed their ice forming abilities only at 15-20°C