

***Р.І. Гвоздяк¹, Л.А. Пасічник¹, Л.М. Ващенко¹,
Т.Я. Покиньброда², О.В. Карпенко²***

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

²Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглекімії
ім. Л.М. Литвиненка НАН України, вул. Наукова, 3а, Львів, 79060, Україна

СИНТЕЗ СУРФАКТАНТІВ ШТАМАМИ *PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. CORONAFACIENS* ТА *PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. ATROFACIENS*

Штами Pseudomonas syringae pv. coronafaciens, P. syringae pv. atrofaciens та мунівий штам P. syringae pv. syringae дуже слабо синтезують сурфактанти порівняно з P. fluorescens 8573 – сапрофітним штамом, продуцентом поверхнево-активних речовин. Виявлено, що поверхневий натяг супернатанту культуральної рідини P. fluorescens дорівнює 27 мНм, а індекс емульгування – 50 %; для фітопатогенних псевдомонасів ці показники складають 50–54 мНм та 0,8–1,3 % відповідно. Штами патоварів coronafaciens і atrofaciens не відрізняються між собою за здатністю синтезувати поверхнево-активні речовини.

Синтез ПАР штамми патоварів P. syringae не корелює з належністю їх до патоварів, агресивністю, антигенним складом та екологічним походженням.

Ключові слова: фітопатогенні бактерії, сурфактанти, патогенність, антигенний склад.

Унікальні перспективи при створенні нових і модифікації існуючих препаратів для сільського господарства мають поверхнево-активні речовини біологічного походження (біоПАР, біосурфактанти), які здатні значно знижувати поверхневий і міжфазний натяг рідин, емульгувати жири та вуглеводні, регулювати процеси змочування, впливати на капілярні процеси, змінювати проникливість клітинних мембран [5]. Вони можуть впливати на взаємовідносини фітопатогенних мікроорганізмів із рослинами та іншими мікроорганізмами, так як міжфазний натяг рідин впливає на поведінку води в капілярах, адсорбцію чи десорбцію клітин, проникнення мембран.

© Р.І. Гвоздяк, Л.А. Пасічник, Л.М. Ващенко, Т.Я. Покиньброда, О.В. Карпенко, 2009

Звичайно, у взаємовідносинах патоген—рослина певну роль відіграють біоПАР як мікро-, так і макроорганізму. Поверхневу активність відмічено у бактеріальних гліколіпідів (в т.ч. ліпополісахаридів), полісахаридліпідних комплексів, ліпопептидів, фосфоліпідів, жирних кислот, полі- і гетерополісахаридів, білків [9]. Близькі до фітопатогенів представники сапротрофного виду *Pseudomonas fluorescens*, які за певних умов самі можуть викликати захворювання рослин [2], синтезують сурфактанти (ПАР) типу глікопротеїнів, ліпопептидів, гліколіпідів [8].

Вивчення ПАР у бактерій спрямовані в основному на виявлення продуцентів цих сполук [6]. ПАР фітопатогенних бактерій не досліджені. За властивостями, якими володіють біоПАР, важко теоретично визначити їх роль у патогенезі бактерій на всіх його етапах – прикріплення до рослин, проникнення, розповсюдження в рослині і, нарешті, чи здатні вони конкурувати за цією ознакою з сапротрофами. Метою нашої роботи було вивчення ролі в патогенності позаклітинних ПАР, які синтезують деякі патовари *P. syringae*, їх зв'язку з пато- і сероварами та екологічною нішею штаму.

Матеріали і методи. ПАР вивчали у штамів трьох патоварів *Pseudomonas syringae*: *P. syringae* pv. *coronafaciens* (Elliott 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 (10 штамів), *P. syringae* pv. *atrofaciens* (McCulloch 1920) Young, Dye & Wilkie 1978 (14 штамів), типового для виду *P. syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 штаму 8511 (УКМ В-1027) та у *Pseudomonas fluorescens* 8573 (контроль). Штами *P. syringae* pv. *coronafaciens* та *P. syringae* pv. *atrofaciens* ізолювані нами з уражених і здорових рослин вівса, пшениці, жита та бур'янів. Синтез штамми ПАР вивчали на рідкому поживному середовищі наступного складу (г/л): NaNO_3 – 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; Na цитрат – 5,0; дріжджовий екстракт – 0,5; пептон – 0,5; гліцерол – 1 %; гексадекан – 1 %; вода дистильована – до 1 л, на 6-у добу культивування при температурі 28°C. Поживне середовище засівали однодобовою культурою в кількості 5 % від об'єму середовища.

Антигенний склад бактерій вивчали в реакціях преципітації в агарі за Оухтерлоні. Антигени отримували за модифікованим методом Грассе [3], антисироватку – до живих культур (ОН-антисироватка) [3]. Патогенні властивості перевіряли на рослинах пшениці [4] та на листях тютюну [7].

Клітини бактерій із культуральної рідини видаляли центрифугуванням при 5000 об/хв, 20 хв. Емульгуючу активність (індекс емульгування, E_{24}) супернатанту визначали за методикою [10]: 10 мл центрифугату перемішували з 10 мл рідких парафінів упродовж 2 хв. у гомогенізаторі Ми-2, переносили в градуйовану пробірку № 5–14 із внутрішнім діаметром 12 мм і витримували при температурі 24°C. Індекс емульгування (E_{24}) визначали через 24 годин як величину відношення висоти емульсійного шару до загальної висоти рідини в пробірці.

Визначення поверхневого натягу проводили за методом Вільгельмі за допомогою платинової пластинки [1] за формулою

$$\sigma = (P + \rho \times h \times l \times d \times g) / \Pi \times \cos \theta,$$

де σ – поверхневий натяг; Π – периметр змочування; θ – кут змочування; P – сила втягування, яка вимірюється на вазі; ρ – густина досліджуваної рідини; h , l , d – висота, довжина і товщина зануреної у рідину частини пластинки; g – прискорення вільного падіння. Після статистичної обробки експериментальних даних, отриманих для різних розчинників, була розрахована формула поверхневого натягу рідини, яка враховує розміри платинової пластинки:

$$\sigma = P \times 0,256 + 2,59.$$

Результати та їх обговорення. Всі 25 досліджені штами трьох патоварів *P. syringae*, а саме 10 штамів – pv. *coronafaciens*, 14 – pv. *atrofaciens*, та 1 – pv. *syringae* патогенні для пшениці і відрізняються між собою за агресивністю, антигенним складом та екологічною нішею (табл. 1). Штами *P. syringae* pv. *coronafaciens* П143 та П137 – ізолювані з листя бур'янів, які росли в посівах вівса, П173 і П198 – із поверхні зовні здорового листа вівса,

та *P. syringae* pv. *atrofaciens* П204 – із поверхні пшениці. Всі інші штами виділені з уражених тканин вівса (pv. *coronafaciens*), пшениці (pv. *atrofaciens*) та бузку (pv. *syringae*).

Враховуючи здатність ПАР сприяти проникненню речовин через мембрани, теоретично можна було б допустити високу активність їх у фітопатогенних бактерій як знаряддя патогенності. Одержані нами дані не підтверджують цієї думки.

При культивуванні на штучному середовищі штами бактерій відрізняються між собою за поверхневим натягом та індексом емульгування супернатанту культуральної рідини.

Таблиця 1

Поверхнево-активні речовини, агресивність, антигенний склад штамів патоварів *P. syringae*

№ п/п	Патовари та штами <i>P. syringae</i>	Серовар	Агресивність	Поверхневий натяг δ , мН/м	Індекс емульгування E_{24} , %	δ/E_{24}	
1	pv. <i>syringae</i> 8511	I	4	53,80	0,9	59,8	
2	pv. <i>coronafaciens</i> П173	I	2	43,02	3,2	13,5	
3	– “ – 9060	I	4	52,93	2,4	22,0	
4	– “ – 9033	V	3	44,91	3,5	12,8	
5	– “ – П143	II	3	50,57	1,5	33,7	
6	– “ – 9235	V	4	49,63	2,7	18,4	
7	– “ – 9030	I	4	47,74	3,0	15,9	
8	– “ – 9185	V	4	51,52	1,2	42,9	
9	– “ – 9223	V	2	54,35	0,9	60,4	
10	– “ – П137	I	3	51,52	1,0	51,5	
11	– “ – П198	V	3	44,43	2,0	22,2	
12	pv. <i>atrofaciens</i> 912	II	3-4	53,88	2,1	25,7	
13	– “ – П204	II	3-4	53,88	2,0	26,9	
14	– “ – 7959	IV	2	52,93	2,3	23,0	
15	– “ – 9010	VI	4	47,74	2,6	18,4	
16	– “ – 8116	V	4	50,57	1,2	42,4	
17	– “ – 7194	VI	4	52,46	1,0	52,5	
18	– “ – 7118	II	4	50,57	1,0	50,6	
19	– “ – 7864	II	3	53,40	0,9	59,3	
20	– “ – 8122	II	2	54,35	0,8	67,9	
21	– “ – 8241	VI	0	46,80	1,3	36,0	
22	– “ – 8317	I	0	53,88	0,9	59,3	
23	– “ – 8281	I	4	55,29	0,9	61,4	
24	– “ – 8150	I	2	48,68	1,1	44,2	
25	– “ – 7910	I	3	62,37	0,9	69,2	
26	<i>P. fluorescens</i> 8573 (контроль)	8573	–	0	27,00	50,0	0,54

Дані табл. 1 вказують на значно меншу активність утворення ПАР фітопатогенними псевдомонасами порівняно з сапротрофом *P. fluorescens* 8573. В 1,6–2,3 рази нижчий поверхневий натяг супернатанту культуральної рідини (КР) всіх фітопатогенних патоварів *P. syringae* порівняно з *P. fluorescens* 8573 ($\delta=27$ $\mu\text{H}/\text{m}$). За поверхневим натягом супернатанту КР штами патоварів *P. syringae* розмістились у межах 43–62 $\mu\text{H}/\text{m}$. Найбільша скупченість їх (62 %) у межах 50–54 $\mu\text{H}/\text{m}$. У цю групу входять штами різної агресивності – від 0 до 4 балів, а саме: 9 із всіх 11 штамів з агресивністю 4 бали, 3 із 6 – з агресивністю 3 бали, 3 із 5 – з агресивністю 2 бали, і один із двох авірулентних штамів. Сім штамів, поверхневий натяг супернатанту КР яких був нижчий за $\delta=50$ $\mu\text{H}/\text{m}$, теж за агресивністю були різними – від 0 до 4 балів. Тобто, синтез штамками *P. syringae* ПАР на рідкому поживному середовищі не корелює з їх агресивністю.

Не відрізняються між собою за здатністю синтезувати ПАР штами патоварів pv. *coronafaciens* та pv. *atrofaciens*. До основної групи із синтезу ПАР ($\delta=50$ –54 $\mu\text{H}/\text{m}$) належали 70 % штамів pv. *coronafaciens* та 64 % – pv. *atrofaciens*.

Деяко інша залежність синтезу штамками ПАР та належність їх до серогруп. Із 16 штамів, поверхневий натяг супернатанту яких $\delta=50$ –4 $\mu\text{H}/\text{m}$, входять штами всіх п'яти серогруп. Але якщо серогрупа I представлена 50 % штамками, V – 67 %, то II – всіма штамками

(6). Як відомо, серогрупування штамів *P. syringae* базується на О-антигенах, у яких, можливо, поверхнева активність різна. Це питання вимагає додаткового вивчення.

Два штами *P. syringae* рв. *coronafaciens*, виділені із поверхні бур'янів вівсяного агроценозу, значно менше синтезували ПАР (51 $\mu\text{H}/\text{м}$) порівняно з ізолюваними з поверхні зовні здорового листя вівса (43 $\mu\text{H}/\text{м}$).

Другою важливою характеристикою ПАР КР є індекс емульгування (E_{24}). E_{24} супернатанту КР патогенів дуже низький – $E_{24}=0,8-3,5\%$, тоді як для сапротрофа *P. fluorescens* 8573 – $E_{24}=50\%$. Тобто у сапротрофа індекс емульгування вищий, ніж у патогенів у 17–62 рази. Найбільша кількість штамів *P. syringae* (52 %) з активністю $E_{24}=0,8-1,3\%$, при цьому з явною перевагою кількості штамів рв. *atrofaciens* над рв. *coronafaciens*. Індекс емульгування не корелює з агресивністю, антигенним складом та екологічною нішею штамів *P. syringae*. Так, в основну групу $E_{24}=0,8-1,3\%$ входять майже по 50 % штамів з кожної групи за агресивністю (2–4 бали). У більшості випадків це ті самі штами, які за поверхневим натягом входили до основної групи ($\delta=50-54 \mu\text{H}/\text{м}$), що вказує на можливу детермінацію їх одними і тими ж речовинами. Але деякі штами синтезують речовини з середнім для патогенів поверхневим натягом при «високій» (штами 9033, 9235, 7950) емульгуючій здатності супернатантів КР. При цьому це не залежить від агресивності штамів та належності їх до патоварів.

Не встановлена залежність індексу емульгування супернатанту КР від належності штаму до серогрупи – приблизно 50 % штамів кожної серогрупи мали E_{24} в межах від 0,8 до 1,3 %.

Для окремих речовин за стаціонарних умов показники δ та E_{24} є стабільними. Очевидно стабільними (постійними) повинні бути їхні суміші. Виходячи з цього, якщо штами синтезували ПАР однакові за хімічною природою та за молярним співвідношенням між ними, то повинні б бути однакові співвідношення $\delta : E_{24}$ для всіх штамів. У нашому випадку всі досліджені штами патогенів відрізнялись між собою за співвідношенням $\delta : E_{24}$. Якщо навіть умовно прийняти близькість штамів за значенням $\delta : E_{24} < 1$, то тільки чотири пари штамів синтезують однакові ПАР, а саме: 9033 та П 173, 9060 та 7959, 9185 та 8116 і 7864 та 8317. Таке групування виявлено між штамами різних патоварів, незалежно від їх агресивності (навіть вірулентності) та антигенної спорідненості, тільки одна пара штамів належала до однієї серогрупи (V – 9185 та 8116).

Різноманітність даних $\delta : E_{24}$ може бути обумовлена як зміною співвідношення хімічних сполук, так і новим компонентом ПАР, який синтезує штам бактерій. Тобто по природі ПАР штами рв. *coronafaciens* та рв. *atrofaciens* гетерогенні.

Не дивлячись на таку гетерогенність штамів за вмістом ПАР культури рв. *coronafaciens* більше тяжіють до нижнього значення $\delta : E_{24}$, а рв. *atrofaciens* – до верхнього значення. Частіше агресивність більша у штамів, у яких співвідношення $\delta : E_{24}$ вище.

Отже, штами *P. syringae* рв. *coronafaciens*, *P. syringae* рв. *atrofaciens* та *P. syringae* рв. *syringae* дуже слабо, порівняно з *P. fluorescens* 8573, синтезують поверхнево-активні речовини. Синтез ПАР штамами *P. syringae* не корелює з їх належністю до патоварів, агресивністю, антигенним складом та екологічним походженням. Синтез слабоактивних ПАР є видовою ознакою *P. syringae*.

Р.И. Гвоздяк¹, Л.А. Пасичник¹, Л.Н. Ващенко¹, Т.Я. Покинсьброда², Е.В. Карпенко²

¹Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

²Отделение физико-химии горючих ископаемых Института физико-органической химии и углекислоты им. Л.М. Литвиненка НАН Украины

СИНТЕЗ СУРФАКТАНТОВ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* РВ. *CORONAFACIENS* ТА *PSEUDOMONAS SYRINGAE* РВ. *ATROFACIENS*

Резюме

Штаммы *Pseudomonas syringae* рв. *coronafaciens*, *P. syringae* рв. *atrofaciens* и типовой штамм *P. syringae* рв. *syringae* очень слабо синтезируют сурфактанты в сравнении с *P. fluorescens* 8573 – сапрофитным штаммом, продуцентом поверхностно-активных веществ. Выявлено, что поверхностное натяжение супернатанта культуральной жидкости *P. fluorescens* равняется 27 $\mu\text{H}/\text{м}$, а индекс эмульгирования

– 50 %; для фитопатогенных псевдомонад эти показатели составляют 50–54 мНм и 0,8–1,3 % соответственно. Штаммы патоваров *coronafaciens* и *atrofaciens* не отличаются между собой по способности синтезировать поверхностно-активные вещества. Синтез ПАВ штаммами патоваров *P. syringae* не коррелирует с принадлежностью их до патоваров, агрессивностью, антигенным составом и экологическим происхождением.

Ключевые слова: фитопатогенные бактерии, сурфактанты, патогенность, антигенный состав.

R.I. Gvozdnyak¹, L.A. Pasichnyk¹, L.M. Vaschenko¹, T.Ya. Pokynbroda², O.V. Karpenko²

¹Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Department of Physical Chemistry of Combustible Minerals, Litvinenko Institute of Physical-Organic and Coal Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv

SYNTHESIS OF SURFACTANTS BY *PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. CORONAFACIENS* AND *PSEUDOMONAS SYRINGAE PV. ATROFACIENS* STRAINS

Summary

Pseudomonas syringae pv. coronafaciens, *P. syringae pv. atrofaciens* and *P. syringae pv. syringae* strains produce very weakly biosurfactants in comparison with *P. fluorescens 8573*. It is detected, that supernatant of cultural fluid of *P. fluorescens* has a surface-tension 27 мN/m and emulsification index – 50 %; for phytopathogenic pseudomonads these parameters are 50-54 мN/m and 0.8-1.3%, accordingly. The *coronafaciens* and *atrofaciens* pathovars strains do not differ between themselves in ability to synthesize the surfactants. The surfactant synthesis by *P. syringae* strains does not correlate with their belonging to pathovars, their aggressiveness, antigenic composition and ecological origin.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: plant pathogenic bacteria, surfactants, pathogenicity, antigenic composition.

The authors address: R.I. Gvozdnyak, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Абрамзон А.А., Зайченко Л.П., Файнгольд С.И. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение // Л.: Химия, 1988. – 200 с.
2. Пасичник Л.А. *Pseudomonas fluorescens* – новый возбудитель заболевания ржи // Микробиол. журн. – 1996. – 57, № 2. – С. 3–7.
3. Пастушенко Л.Т., Симонович І.Д. Вивчення методів одержання антигенів фітопатогенних бактерій роду *Pseudomonas* // Микробиол. журн. – 1971. – 33, № 3. – С. 289.
4. Пересыпкин В.Ф., Королева И.Б., Минько Н.Д. Устойчивость сортов яровой пшеницы к базальному бактериозу // Докл. ВАСХНИЛ. – 1978. – № 6. – С. 11.
5. Eliora Z. Ron and Eugene Rosenberg – Natural roles of biosurfactants // Env. Microbiol. – 2001. – 3(4). – P. 229–236.
6. Karpenko E.V., Martynyuk N.B., Shulga A.N. Surface active biopreparation. 2004, Patent of Ukraine, N 71222, Bull. N 12.
7. Methods in phytobacteriology / Eds Z. Klement, K. Rudolf, D. Sands. – Budapest: Academia Kiado, 1990. – 568 p.
8. Persson A., Osterberg E., Dostalek M. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1988. – 29. – P. 1–4.
9. Vasileva-Tonkova E., Galabova D., Stoimenova E., Lalchev Z. Production and properties of biosurfactants from a newly isolated *Pseudomonas fluorescens* HW-6 growing on hexadecane // Z. Naturforsch [C]. – 2006. – 61, N 7–8. – P. 553–559.
10. Zajic L.E., Seffens W. Biosurfactants // CRC Crit. Rev. Biotech. – 1984. – V. 1. – P. 87–107.

Отримано 11.03.2008