

Буценко Л.М., Савенко О.А., Пасічник Л.А., Щербина Т.М., Патица В.П.

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ 03143, Україна*

ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД КЛІТИННИХ ЛІПІДІВ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ІЗОЛЬОВАНИХ З АГРОФІТОЦЕНОЗУ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР

Ідентифікація фітопатогенних бактерій дає можливість не лише встановити причину хвороби рослин, а й визначити шляхи розповсюдження збудника, вивчити його біологічні особливості та організувати проведення заходів захисту рослин. Дослідження жирнокислотного складу клітинних ліпідів бактерій роду *Pseudomonas*, проведені багатьма авторами, показали важливість цієї ознаки для ідентифікації вказаної групи бактерій. **Мета.** Вивчити склад клітинних ліпідів штамів *Pseudomonas syringae*, які було ізольовано з уражених бактеріозами рослин жита і пшениці та з сегетальної рослинності пшеничного поля. **Матеріали.** Роботу виконано за використання класичних мікробіологічних та біохімічних методів. Для одержання метилових ефірів жирних кислот бактеріальні клітини, які виростили на КА (картопляний агар) суспендували в метанолі, що містив 1,5% сірчаної кислоти. Аналіз складу жирних кислот здійснено за використання хромато-мас-спектрометричної системи Agilent 6890N/5973 inert. **Результати.** Досліджено жирнокислотні профілі 33 штамів фітопатогенних бактерій виду *P. syringae*, які було ізольовано з рослин жита, пшениці і бур'янів, що росли в посівах пшениці. Встановлено, що всі штами бактерій мають схожі профілі жирних кислот. В якості домінантних виявлено жирні кислоти з парним числом вуглецевих атомів – гексадеканова (C16:0), гексадеценнова (C16:1) і октадеценнова (C18:1). В якості мінорних компонентів виявляли додеканову, тетрадеканову, октадеканову кислоти. В усіх досліджених нами штаммах ідентифікували гідроксизаміщені жирні кислоти: 3-гідроксидеканову (3-OH C10:0), 2-гідроксидодеканову (2-OH C12:0), 3-гідроксидодеканову (3-OH C12:0) кислоти. **Висновки.** Склад жирних кислот загальних клітинних ліпідів штамів *P. syringae*, які було ізольовано з уражених бактеріозами рослин жита і пшениці та з сегетальної рослинності пшеничного поля, є подібним і відповідає складу жирних кислот виду *P. syringae*. Встановлено, що відмінності в спектрі жирних кислот є особливістю кожного штаму і не корелюють з розділенням на патовари та серогрупуванням.

Ключові слова: *Pseudomonas syringae*, жирні кислоти, агроценоз пшениці, сегетальна рослинність.

Точна ідентифікація фітопатогенних бактерій є важливим завданням, оскільки дозволяє правильно діагностувати хворобу, встановити межі поширення та вивчити циркуляцію збудників в природі, запропонувати заходи для обмеження розвитку бактеріальних хвороб рослин. Визначення метилових ефірів жирних кислот – це ефективний, швидкий і точний хемотаксономічний метод, який використовують для характеристики та ідентифікації бактерій [1]. Для деяких груп бактерій аналіз метилових ефірів жирних кислот дозволяє диференціювати та ідентифікувати окремі види і навіть патовари [2, 3, 4], у той час як для інших видів це не є можливим, оскільки вони мають однакові профілі жирних кислот [5]. На сьогодні цей метод успішно застосовують для вивчення фітопатоген-

них бактерій [6, 7], особливо представників таких родів як *Pseudomonas* і *Xanthomonas* [8]. Гідроксикислоти цієї групи бактерій є значущими хемотаксономічними маркерами. Наприклад, роди *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* та *Ralstonia* можуть бути розділені на основі цих кислот, не зважаючи на те, що раніше були віднесені до роду *Pseudomonas* [9].

Склад жирних кислот був використаний багатьма вченими для вивчення спорідненості видів *Pseudomonas* [10, 11]. Дослідження складу жирних кислот 50 штамів різних видів *Pseudomonas* виявило у них наявність нерозгалужених насичених кислот C16:0 і нерозгалужених ненасичених кислот C16:1 і C18:1 [10]. Розподіл у штамів бактерій оксикислот, циклопропанових кислот і жирних кислот з розгалуженим ланцюгом співвідносився з розподілом видів *Pseudomonas* на РНК групи [12].

Н. Оуаїзу та К. Комагата при дослідженні 75 штамів різних видів псевдомонад, серед яких були 14 фітопатогенних штамів бактерій роду *Pseudomonas*, виявили неоднорідність у жирнокислотному складі, на основі чого штами були розподілені на дев'ять груп з урахуванням наявності 3-ОН жирних кислот [11]. При цьому групи з 1 по 5 збігалися з групуванням цих бактерій за РНК гомологією [12].

Аналіз великої кількості профілів жирних кислот штамів роду *Pseudomonas*, в які включено і види рослинних патогенів, був опублікований D. Stead [7]. У своєму дослідженні він показав таксономічне значення 2- і 3-гідроксикислот для диференціації рослинних патогенів і інших видів бактерій, що належать до роду *Pseudomonas*. Більшість з цих кислот присутні на рівні меншому, ніж 5 % від загальної площі піків та, не зважаючи на це, три або чотири оксикислоти найчастіше присутні в загальних профілях. Результати розподілу тих чи інших оксикислот слугували однією з підстав для розподілу штамів на 6 груп. Між групами, утвореними за профілями жирних кислот, та групами, сформованими на основі рРНК, прослідковується досить чітка кореляція [7].

Метою нашої роботи стало вивчення складу клітинних ліпідів штамів *P. syringae*, які було ізольовано з уражених бактеріозами рослин жита і пшениці та з сегетальної рослинності пшеничного поля.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були штами бактерій виду *P. syringae*, які було ізольовано з уражених бактеріозами рослин жита, уражених і зовні здорових рослин пшениці, а також штами, ізольовані з сегетальної рослинності пшеничного поля. Характеристику досліджуваних штамів наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика штамів *P. syringae*

| Вид, патовар | Номери штамів | Джерело виділення |
|---|--|--------------------------------------|
| <i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> | 7194, 7836, 7959, 8099, 8116, 8274, 8281, 8317, 8462, 8904, 9010, | Жито, уражені бактеріозом рослини |
| | 912, 2399, 9400, 9417, 9748, 9819, 9771, 9785 | Пшениця, уражені бактеріозом рослини |
| | П204, П203 | Пшениця, зовні здорові рослини |
| <i>P. syringae</i> | 650б, 684б, 682а, 650в, 646а, 645з, 564а, 643д, 566б, 663б, 689б, 670с, 915а, 516а, 916а, 913б | Бур'яни |

Штами *P. syringae* pv. *atrofaciens*, ізольовані з пшениці, належать до чотирьох серологічних груп (II, IV, V, VI), із жита – до п'яти (I, II, IV, V, VI). *P. syringae*, виділені із сеgetальної рослинності агрофітоценозу пшениці, відносяться до п'яти серологічних груп - I, II, IV, V, VI за схемою серогрупування фітопатогенних бактерій групи *P. syringae*, розробленою Л. Пастушенко та І. Симонович.

Бактерії культивували на картопляному агарі (КА) 24 год при температурі 28°C. Бактеріальні клітини змивали 0,85 %-ним розчином NaCl і осаджували центрифугуванням (5000 об/хв, 15 хв).

Жиринокислотний склад загальних клітинних ліпідів *P. syringae* визначали методом хромато-мас-спектрометрії метилових ефірів жирних кислот [13, 14].

Для одержання метилових ефірів жирних кислот бактеріальні клітини, які виростили на КА, суспендували в метанолі, що містив 1,5% сірчаної кислоти. Метаноліз здійснювали при 80°C протягом 1 год. Метилові ефіри жирних кислот екстрагували 3 мл суміші ефір-гексан (1:1). Проби перемішували 3 хв та після їхнього розшарування відбирали верхню фракцію, яка містить метилові ефіри жирних кислот. Екстракцію здійснювали тричі. Одержані екстракти об'єднували і упарювали до повного висихання.

Розділення метилових ефірів жирних кислот здійснювали на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert, колонка HP-5MS 30 м × 0,25 мм × 0,25 мм, температурний режим – 150-270°C з градієнтом у 4°C, газ-носії – гелій. Піки ідентифікували шляхом порівняння часу їх утримання з часом утримання стандартних зразків метилових ефірів жирних кислот фірми “Serva”, а також за інтегрованою базою даних мас-спектрів NIST 02. Вміст окремих жирних кислот визначали у відсотках від загальної площі піків.

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали у програмі Statistica 5.0.

Результати та їх обговорення. У клітинах досліджуваних штамів бактерій *P. syringae* хромато-мас-спектрометричним методом були виявлені жирні кислоти з кількістю атомів вуглецю від 10 до 19: насичені (додеканова (C12:0), тетрадеканова (C14:0), гексадеканова (C16:0), октадеканова (C18:0); ненасичені (*цис*-9-гексадеценева (C16:1), *цис*-11-октадеценева (C18:1)); циклічні кислоти – *цис*-9,10-метиленгексадеканова (C17:0 *сусло*), *цис*-9,10-метиленоктадеканова (C19:0 *сусло*). За інтегрованою базою даних мас-спектрів NIST 02 також ідентифіковано гідрокси кислоти – 3-гідроксидеканову (3-ОН C10:0), 2-гідроксидодеканову (2-ОН C12:0) і 3-гідроксидодеканову (3-ОН C12:0) (табл. 1 – 3).

У клітинах всіх досліджених штамів бактерій переважали жирні кислоти з парним числом вуглецевих атомів: гексадеканова, *цис*-9-гексадеценева і *цис*-11-октадеценева. При цьому сумарний вміст цих кислот становив більше, ніж 80 % від усіх виявлених жирних кислот. З них 51 – 60 % становили ненасичені жирні кислоти (C 16:1, C 18:1) (табл. 1 – 3).

Таблиця 2
Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених з жита

| Штами | Кількість жирних кислот (% від загальної площі піків) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|-----------|------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|-------|-------|------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|
| | 3-ОН C10:0 | C12:0 | 2-ОН C12:0 | 3-ОН C12:0 | C14:0 | C16:1 | C16:0 | C17:0 | C18:1 | C18:0 | C19:0 | C10:0 | C12:0 | 2-ОН C12:0 | 3-ОН C12:0 | C14:0 | C16:1 | C16:0 | C17:0 | C18:1 | C18:0 | C19:0 | | |
| 8281 | 1,47±0,07 | 5,25±0,26 | 4,41±0,22 | 2,94±0,15 | 0,84±0,04 | 32,77±1,64 | 31,51±1,57 | Сл. | 18,90±0,94 | 1,89±0,09 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 8116 | 2,03±0,10 | 6,74±0,34 | 2,41±0,12 | 2,54±0,12 | Сл. | 27,98±1,39 | 28,24±1,41 | 1,74±0,08 | 24,68±1,23 | 3,56±0,17 | 0,25±0,01 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 8317 | 2,61±0,13 | 5,69±0,28 | 2,30±0,11 | 2,15±0,11 | 0,61±0,03 | 32,31±1,61 | 29,84±1,49 | 0,25±0,01 | 25,84±1,29 | 1,85±0,09 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 9010 | 1,86±0,09 | 2,34±0,12 | 3,79±0,18 | 2,27±0,11 | 0,44±0,02 | 29,65±1,48 | 30,40±1,52 | 0,25±0,01 | 25,78±1,28 | 3,18±0,16 | 0,25±0,01 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 8462 | 0,89±0,04 | 2,07±0,10 | 1,92±0,09 | 1,90±0,09 | 0,88±0,04 | 28,65±1,43 | 31,52±1,55 | 0,74±0,03 | 28,65±1,43 | 3,24±0,16 | 0,25±0,01 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 7194 | Сл. | 1,09±0,05 | 1,75±0,09 | 1,10±0,05 | 0,54±0,02 | 33,18±1,65 | 32,53±1,62 | 1,75±0,08 | 25,11±1,25 | 3,49±0,17 | 0,30±0,01 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 7836 | Сл. | 0,76±0,03 | 0,5±0,02 | 0,40±0,02 | 0,40±0,02 | 37,21±1,86 | 34,93±1,74 | Сл. | 23,29±1,16 | 2,78±0,14 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 8904 | 0,89±0,04 | 2,38±0,12 | 0,74±0,04 | 0,89±0,04 | 0,89±0,04 | 31,25±1,56 | 29,17±1,45 | 0,89±0,04 | 29,01±1,45 | 3,27±0,16 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 8274 | 1,57±0,08 | 6,62±0,33 | 1,74±0,09 | 1,39±0,07 | 0,35±0,01 | 30,48±1,52 | 31,36±1,56 | Сл. | 23,52±1,17 | 2,96±0,14 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 8099 | 1,03±0,05 | 5,32±0,27 | 1,63±0,08 | 0,25±0,01 | 0,59±0,03 | 28,10±1,40 | 32,53±1,62 | 1,03±0,05 | 27,07±1,35 | 2,65±0,13 | 0,20±0,01 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 7959 | 1,50±0,07 | 3,90±0,19 | 2,52±0,12 | 2,55±0,12 | 0,75±0,03 | 29,57±1,47 | 31,53±1,57 | 1,05±0,05 | 24,62±1,23 | 2,25±0,11 | 0,20±0,01 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |

Примітка. Тут і в таблицях 3 і 4. Сл. – на хроматограмі було ідентифіковано жирну кислоту, але кількість не перевищувала 0,2% від загальної площі піків.

Таблиця 3
Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів штамів *P. syringae* pv. *atrofaciens*, виділених з пшениці

| Штами | Кількість жирних кислот (% від загальної площі піків) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|---|-----------|------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|------------|-----------|-----------|-------|-------|------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|
| | 3-ОН C10:0 | C12:0 | 2-ОН C12:0 | 3-ОН C12:0 | C14:0 | C16:1 | C16:0 | C17:0 | C18:1 | C18:0 | C19:0 | C10:0 | C12:0 | 2-ОН C12:0 | 3-ОН C12:0 | C14:0 | C16:1 | C16:0 | C17:0 | C18:1 | C18:0 | C19:0 | | |
| 912 | 0,55±0,03 | 2,21±0,11 | 2,35±0,11 | 1,66±0,08 | 0,55±0,03 | 31,16±1,56 | 31,16±1,55 | 2,35±0,11 | 24,30±1,21 | 2,90±0,15 | 0,20±0,03 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 2399 | 0,64±0,03 | 1,77±0,08 | 4,50±0,22 | 2,09±0,10 | 0,80±0,04 | 31,83±1,59 | 34,88±1,74 | 0,64±0,03 | 21,78±1,08 | 2,96±0,14 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 9400 | 0,40±0,02 | 5,00±0,02 | 1,30±0,10 | 0,35±0,02 | 0,20±0,01 | 30,60±1,51 | 36,00±1,80 | 6,30±0,30 | 19,50±1,00 | 0,80±0,10 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 9417 | 0,30±0,01 | 4,70±0,21 | 1,00±0,10 | 0,30±0,01 | Сл. | 29,40±1,52 | 35,50±1,81 | 1,30±0,10 | 26,50±1,30 | 1,30±0,70 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| П204 | 0,40±0,02 | 0,38±0,02 | 1,98±1,00 | 1,38±0,07 | 0,59±0,03 | 32,07±1,60 | 37,02±1,85 | 0,41±0,02 | 21,78±1,09 | 2,96±0,15 | 0,25±0,01 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| П203 | 0,39±0,02 | 1,59±0,08 | 1,79±0,09 | 1,20±0,06 | 0,59±0,03 | 32,73±1,63 | 36,51±1,82 | 0,59±0,03 | 21,80±1,09 | 2,77±0,13 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 9748 | 0,29±0,01 | 3,78±0,18 | 1,45±0,06 | Сл. | Сл. | 38,96±1,82 | 28,78±1,40 | 0,29±0,01 | 25,29±1,25 | 1,16±0,05 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 9771 | 0,31±0,01 | 3,08±0,15 | 0,92±0,04 | Сл. | Сл. | 40,92±2,04 | 30,15±1,51 | 0,31±0,01 | 23,39±1,16 | 0,92±0,04 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 9785 | 0,29±0,01 | 4,67±0,23 | 1,75±0,08 | Сл. | Сл. | 38,78±1,92 | 28,28±1,41 | 0,87±0,04 | 24,49±1,22 | 0,20±0,01 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |
| 9819 | Сл. | 2,95±0,14 | 0,98±0,04 | Сл. | Сл. | 44,92±2,24 | 32,46±1,62 | Сл. | 18,03±0,91 | 0,66±0,03 | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. | Сл. |

Таблиця 4
Жирнокислотний склад загальних клітинних ліпідів штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з бур'янів

| Штами <i>P. syringae</i> | Кількість жирних кислот (% від загальної площі піків) | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|------------|------------|-------------|--|--|--|--|
| | 3-ОН С10:0 | С12:0 | 2-ОН С12:0 | 3-ОН С12:0 | С16:1 | С16:0 | С17: 0 cyclo | С18:1 | С18:0 | С19:0 cyclo | | | | |
| 6506 | 1,51±0,05 | 6,35±0,21 | 1,21±0,02 | 0,24±0,01 | 41,23±1,82 | 27,18±1,23 | 0,15±0,003 | 21,38±0,04 | 0,30±0,005 | 0,45±0,01 | | | | |
| 6846 | 0,98±0,03 | 6,87±0,25 | 1,54±0,05 | 0,24±0,01 | 40,58±1,72 | 27,16±1,25 | 1,01±0,03 | 20,76±1,01 | 0,33±0,01 | 0,53±0,01 | | | | |
| 682a | 2,62±0,11 | 4,79±0,18 | 1,81±0,04 | 1,04±0,03 | 32,65±1,36 | 25,65±1,21 | 1,48±0,04 | 17,52±0,73 | 11,66±0,36 | 0,78±0,02 | | | | |
| 650в | 1,31±0,03 | 7,92±0,23 | 1,91±0,04 | 0,27±0,01 | 37,22±1,26 | 25,85±1,19 | 4,24±0,19 | 19,86±0,85 | 0,33±0,003 | 1,09±0,04 | | | | |
| 646a | 1,65±0,05 | 9,80±0,42 | 2,03±0,03 | 0,34±0,002 | 46,22±1,9 | 25,98±1,19 | 0,51±0,01 | 12,63±0,43 | 0,17±0,006 | 0,67±0,02 | | | | |
| 645з | 1,91±0,07 | 8,79±0,34 | 2,35±0,08 | 0,69±0,02 | 42,85±1,84 | 25,98±1,22 | 0,84±0,03 | 15,34±0,67 | 0,31±0,003 | 0,94±0,03 | | | | |
| 564a | 1,43±0,04 | 8,87±0,28 | 1,95±0,06 | 0,28±0,008 | 47,98±1,18 | 26,11±1,18 | 0,17±0,005 | 12,87±0,56 | 0,10±0,003 | 0,24±0,009 | | | | |
| 643д | 2,55±0,08 | 10,85±0,44 | 2,30±0,08 | 0,67±0,02 | 43,63±2,14 | 26,81±1,24 | 0,58±0,01 | 12,13±0,40 | 0,16±0,006 | 0,32±0,008 | | | | |
| 5666 | 1,13±0,03 | 8,52±0,21 | 0,99±0,02 | 0,18±0,007 | 48,37±2,11 | 27,51±1,26 | 0,18±0,006 | 12,73±0,54 | 0,18±0,007 | 0,21±0,008 | | | | |
| 6636 | 2,20±0,80 | 4,84±0,18 | 1,55±0,03 | 1,13±0,03 | 35,54±1,63 | 25,77±1,21 | 0,56±0,01 | 17,12±0,76 | 10,39±0,44 | 0,90±0,03 | | | | |
| 6896 | 3,4±0,14 | 4,05±0,15 | 1,60±0,03 | 1,05±0,04 | 32,64±1,52 | 28,75±1,33 | Сл. | 15,17±0,64 | 13,34±0,52 | Сл. | | | | |
| 670є | 3,10±0,12 | 7,87±0,23 | 2,65±0,09 | 1,97±0,03 | 29,17±1,12 | 26,54±1,19 | Сл. | 16,10±0,67 | 12,60±0,52 | Сл. | | | | |
| 915a | 3,43±0,11 | 5,53±0,21 | 4,14±0,16 | 2,33±0,07 | 29,06±1,31 | 26,73±1,12 | 6,90±0,28 | 16,67±0,72 | 4,57±0,18 | 0,64±0,02 | | | | |
| 516a | 1,72±0,05 | 4,12±0,15 | 1,24±0,04 | 0,64±0,02 | 35,15±1,53 | 27,07±1,21 | 0,58±0,01 | 19,24±0,91 | 9,69±0,37 | 0,55±0,01 | | | | |
| 916a | 2,53±0,11 | 4,31±0,19 | 1,32±0,04 | 0,76±0,01 | 32,05±1,32 | 29,26±1,27 | 0,89±0,02 | 16,72±0,53 | 11,40±0,47 | 0,76±0,02 | | | | |
| 9136 | 2,79±0,11 | 6,27±0,18 | 1,67±0,07 | 1,67±0,05 | 29,17±1,38 | 29,51±1,32 | 2,55±0,09 | 19,98±0,67 | 5,46±0,13 | 0,93±0,03 | | | | |

В усіх досліджених штамів *P. syringae* ідентифіковано додеканову кислоту. Вміст її становив від 1 до 10% у різних штамів. В якості мінорних компонентів (вміст яких становив від 0,1 до 5%) виявлені октадеканова та циклопропанові (C17:0 cyclo і C19:0 cyclo) жирні кислоти. Необхідно зазначити, що у деяких штамів було ідентифіковано не всі мінорні жирні кислоти. На нашу думку це пов'язано з особливостями підготовки проб і чутливістю методу аналізу. Якщо на хроматограмі пік жирної кислоти мав висоту менше одного мм, його ідентифікацію не здійснювали.

Як відомо, найбільше значення для систематики бактерій *P. syringae* мають оксизаміщені жирні кислоти [7]. В усіх досліджених нами штамів ми ідентифікували 3-гідроксидеканову (3-ОН 10:0), 2-гідроксидеканову (2-ОН 12:0), 3-гідроксидеканову (3-ОН 12:0) жирні кислоти (табл. 1-3). Зазначені жирні кислоти в досліджуваних штамів містилися в кількості від 0,24 до 4,50%.

Одержані нами результати щодо жирнокислотного складу клітинних ліпідів *P. syringae*, ізольованих із зернових культур та сеgetальної рослинності пшеничного поля, узгоджуються з даними літератури. За твердженням D. Stead [7] більшість з оксикислот у бактерій роду *Pseudomonas* присутні на рівні меншому, ніж 5% від загальної площі піків та, не зважаючи на це, три або чотири оксикислоти найчастіше присутні в загальних профілях. Для D. Stead [7] результати розподілу тих чи інших оксикислот слугували однією з підстав для розподілу проаналізованої колекції на 6 груп. Патовари *P. syringae* входять до групи 1 підгрупи 1a, всі члени якої містять 3-ОН C10:0, 2-ОН C12:0 і 3-ОН C12:0 оксикислоти в кількостях, менших ніж 5 – 6 %.

Раніше встановлено, що за морфолого-культуральними і фізіолого-біохімічними властивостями досліджені штами фітопатогенних бактерій, виділені із різних джерел, не відрізнялися [15-17].

Отже, всі досліджені штами *P. syringae* рв. *atrofaciens* і *P. syringae* мають подібний якісний склад жирних кислот та містять важливі для ідентифікації оксизаміщені жирні кислоти, що підтверджує їх приналежність до виду *P. syringae*. Наявність відмінностей в спектрі жирних кислот є особливістю кожного штаму і не корелює з розділенням на патовари та серогрупуванням. Нами не було виявлено закономірностей у складі жирних кислот клітинних ліпідів досліджуваних штамів, які б дозволили розділити штами на групи, приурочені до джерела ізоляції штаму та (або) підтвердити приналежність ізольованих із сеgetальної рослинності штамів до патовару *P. syringae* рв. *atrofaciens*.

Stead D. E. із співавторами [18] встановили можливість використання аналізу складу жирних кислот для ідентифікації фітопатогенних бактерій на видовому рівні, а методів, заснованих на полімеразній ланцюговій реакції, – для диференціювання на підвиди, патовари, біовари і, можливо, навіть раси патогенних для рослин бактерій. Підтвердження приналежності штамів *Pseudomonas syringae*, виділених з бур'янів на пшеничному полі, до патовару *P. syringae* рв. *atrofaciens*, який є збудником базального бактеріозу пшениці, потребує проведення подальших досліджень.

Отримані результати підтверджують висунуте багатьма науковцями твердження про можливість використання інформації щодо складу жирних кислот для ідентифікації бактерій на видовому рівні.

**Л.Н. Буценко, Е.А. Савенко, Л.А. Пасичник, Т.Н. Щербина,
В.Ф. Патыка**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев 03143, Украина*

**ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ КЛЕТОЧНЫХ ЛИПИДОВ
PSEUDOMONAS SYRINGAE, ИЗОЛИРОВАННЫХ
ИЗ АГРОФИТОЦЕНОЗА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР**

Резюме

Идентификация фитопатогенных бактерий дает возможность не только установить причину заболевания, но и определить пути распространения возбудителя, изучить его биологические особенности и организовать проведение мероприятий по защите растений. Исследования жирнокислотного состава клеточных липидов бактерий рода *Pseudomonas*, проведенные многими авторами, показали важность этого признака для идентификации данной группы бактерий. **Цель.** Изучить состав клеточных липидов штаммов *Pseudomonas syringae*, которые были изолированы из пораженных бактериозом растений ржи, пшеницы и сеgetальной растительности в посевах пшеницы. **Материалы.** Работа выполнена с использованием классических микробиологических и биохимических методов. Для получения метиловых эфиров жирных кислот бактериальные клетки, выращенные на КА (картофельный агар), суспендировали в метаноле, который содержал 1,5% серной кислоты. Анализ состава жирных кислот проведен с использованием хромато-масс-спектрометрической системы Agilent 6890N/5973 inert. **Результаты.** Исследованы жирнокислотные профили 33 штаммов фитопатогенных бактерий вида *P. syringae*, которые были изолированы из растений ржи, пшеницы и сорняков на пшеничном поле. Установлено, что все штаммы имеют похожие профили жирных кислот. В качестве доминантных выявлены жирные кислоты с парным числом углеродных атомов - гексадекановая (C16:0), гексадеценная (C16:1) и октадеценная (C18:1). В качестве минорных компонентов выявляли додекановую, тетрадекановую, октадекановую кислоты. У всех исследованных нами штаммов идентифицировали гидроксизамещенные жирные кислоты: 3-гидроксидекановую (3-ОН C10:0), 2- гидроксидодекановую (2-ОН C12:0), 3-гидроксидодекановую (3-ОН C12:0) кислоты. **Выводы.** Состав жирных кислот клеточных липидов штаммов *P. syringae*, которые были изолированы из пораженных бактериозом растений ржи, пшеницы и сеgetальной растительности пшеничного поля, является подобным и отвечает составу жирных кислот вида *P. syringae*. Установлено, что наличие отличий в спектре жирных кислот, является особенностью каждого штамма и не коррелирует с разделением на патовары и серогруппированием.

Ключевые слова: *P. syringae*, жирные кислоты, агроценоз пшеницы, сеgetальная растительность.

FATTY ACID COMPOSITION OF CELLULAR LIPIDS *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ISOLATED FROM CEREAL AGROPHYTOCENOSIS

Summary

Identification of pathogenic bacteria makes it possible not only to establish the cause of the disease, but also to determine the ways of distribution of the pathogen, to study its biological characteristics and to undertake measures for protection of plants. Studies of cellular fatty acid composition of bacterial lipids of *Pseudomonas* genus, carried out by many authors, have shown the importance of this feature for the identification of this group of bacteria. **Aim.** To study composition of cellular lipids of *Pseudomonas syringae* strains, which were isolated from affected bacteriosis plant rye, wheat and segetal vegetation in crops of wheat. **Methods.** Work performed by classical microbiological and biochemical methods. To obtain fatty acid methyl esters bacterial cells, which grew on the PA (potato agar), was suspended in methanol, which contained 1.5% of sulfuric acid. Analysis of fatty acid composition performed using gas chromatography-mass spectrometry system Agilent 6890N / 5973 inert. **Results.** Investigated fatty acid profiles of the 33 strains of pathogenic bacteria *P. syringae* species, which have been isolated from rye, wheat and weeds in wheats field. It is found that all the strains have similar fatty acid profiles. As identified dominant fatty acids with pair number of carbon atoms - hexadecanoic (C16: 0), hexadecenoic (C16: 1) and octadecenoic (C18: 1). As minor components detected dodecanoic, tetradecanoic, octadecanoic acids. All strains have identified a hydroxy fatty acids: 3-hydroxydecanoic (3-OH C10: 0), 2-hydroxydodecanoic (2-OH C12: 0), 3-hydroxydodecanoic (3-OH C12: 0) acids. **Conclusions.** Fatty acid composition of cellular lipids of *P. syringae* strains, which were isolated from the affected bacteriosis plant rye, wheat and segetal plants in wheat field, is similar to the form corresponds to the composition of fatty acids *P. syringae*. It was found that the existence of differences in the fatty acid spectrum is characteristic of each strain and no correlates with the division on pathovars and serogroup.

Keywords: *P. syringae*, fatty acids, wheat agrocenosis, segetal plants.

1. Baird RE, Gitaitis RD, Carling DE, Mullinix BG. Determination of whole-cell fatty acid profiles for the characterization and differentiation of isolates of *Rhizoctonia solani* AG-4 and AG-7. Plant Disease. 2000; 84(7): 785–788.
2. Stead DE, Sellwood JE, Wilson J. Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. J. Appl. Microbiol. 1992; 72: 315 – 321.
3. Weller SA, Aspin A, Stead DE. Classification and identification of plant-associated bacteria by fatty acid profiling. Bulletin EPPO. 2000; 30 (3-4): 375-380.
4. Nischwitz C, Gitaitis R, Sanders H, Langston D, Mullinix B, et al. Use of fatty acid methyl ester profiles to compare copper-tolerant and copper-sensitive strains of *Pantoea ananatis*. Phytopathology. 2007; 97(10): 1298-1304.
5. Welch DF. Applications of cellular fatty acid analysis. Clin. Microbiol. Rev. 1991; 4(4): 422-438.

6. Janse JD. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains using whole cell fatty acids analysis. Syst. Appl. Microbiol. 1991; 14(4): 335-345.
7. Stead DE. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. Int. J. Syst. Bacteriol. 1992; 42(2): 281-295.
8. Vauterin L, Yang P, Swings J. Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of the *Xanthomonas* species. Int. J. Syst. Bacteriol. 1995; 46(1): 298-304.
9. Kaneda T. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. Microbiological reviews. 1991; 55(2): 288-302.
10. Ikemoto S, Kuraishi H, Komagata K, Azuma R, Suto T, Murooka H. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. Journal Gen. Appl. Microbiol. 1978; 24: 199-213.
11. Oyaizu H, Komagata K. Groupings of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid compositions and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. Journal Gen. Appl. Microbiol. 1983; 29: 17-40.
12. Palleroni NJ, Kunisawa R, Contopoulou R, Doudoroff M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1973; 23(4): 333-339.
13. Zherebilo OE, Vishtalyuk NM. [The fatty acids of total lipids of some representatives of the genus *Erwinia* and other enterobacteria]. Microbiol. Z. 1987; 49(6): 83–85. Russian.
14. Brian BL, Gardner EW. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas–liquid chromatography. Appl. Microbiol. 1967; 15(6): 1499-1500.
15. Pasichnik LA, Savenko EA, Butsenko LN., Scherbina TN, Patyka VF. [*Pseudomonas syringae* – the agent of bacterial diseases weeds]. Microbiol. Z. 2013; 75(4): 41–46. Russian.
16. Dvorak K, Sabluk V, Kalinichenko A, Butsenko L, Pasichnyk L, Patyka V. Biological properties of phytopathogenic bacteria *Pseudomonas syringae*, isolated from sugar beet. Journal of Pure and Applied Microbiology. 2014; 8 (6): 4345–4349.
17. Patyka VP, Pasichnyk LA. Phytopathogenic bacteria in the system of modern agriculture. Microbiol. Z. 2014; 76(1): 21–26.
18. Stead DE, Hennessy J, Elphinstone JG, Wilson JK. Modern methods for classification of plant pathogenic bacteria including *Pseudomonas syringae*. Developments Plant Pathology. 1998; 9: 427-434.

Отримано 27.10.2016