



Т. В. Іванова,
кандидат с.-г. наук,
доцент, доцент кафедри екобіотехнології та біорізноманіття,
Національний університет біоресурсів та
природокористування України (м. Київ), Україна



М. В. Пати́ка,
доктор с.-г. наук, член-кореспондент НААН,
завідувач кафедри екобіотехнології та біорізноманіття,
Національний університет біоресурсів та
природокористування України (м. Київ), Україна



К. Р. Туліветрова,
студент магістратури кафедри екобіотехнології та біорізноманіття,
Національний університет біоресурсів та природокористування України
(м. Київ), Україна
E-mail: tivanova1@ukr.net

ОСОБЛИВОСТІ ВИЯВЛЕННЯ ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ ТА КОНТРОЛЬ ЇХ ПОШИРЕННЯ У БІОТЕХНОЛОГІЧНОМУ ПРОЦЕСІ КУЛЬТИВУВАННЯ ПЕЧЕРИЦЬ

Стаття присвячена всебічному дослідженню фізіолого-біохімічних, мікробіологічних, морфолого-культуральних особливостей ізолятів патогенних бактерій за культивування печериці двоспорової. Предметом дослідження слугували ізоляти патогенних бактерій, виділені з грибів, які проявлялися як первинні інфекції на стадії активного росту гриба. У роботі використали біотехнологічні методи досліджень. За допомогою біохімічних методів визначали трофічні особливості патогенних бактерій з метою розробки біотехнологій щодо контролю їх поширення. Вивчено фізіолого-біохімічні властивості бактерій, реакції на розщеплення вуглеводів на синтетичному середовищі, оксидазну активність бактерій за методом Ковача та каталазну активність. У роботі науково обґрунтовано та доведено можливість розпізнавання отриманих ізолятів. На основі проведених досліджень ідентифіковано збудники бактеріозів даного гриба, які були типовими лише для печериці двоспорової. З'ясовано та проведено порівняльну характеристику властивостей бактерій з описаними раніше патогенами.

Ключові слова: патогенні бактерії, печериці, діагностика, фізіолого-біохімічні властивості, ідентифікація.

T. V. Ivanova,

PhD of Agricultural Sciences, Associate Professor, Department of Ecobiotechnology and Biodiversity, National University of Life and Environmental Science of Ukraine (Kyiv), Ukraine

N. V. Palyka,

Doctor of Agricultural Sciences, Corresponding Member of NAAS, Head of the Department of Ecobiotechnology and Biodiversity, National University of Life and Environmental Science of Ukraine (Kyiv), Ukraine

K. R. Tulivetrova,

Student of the Master's Degree of the Department of Ecobiotechnology and Biodiversity of National University of Life and Environmental Science of Ukraine (Kyiv), Ukraine

E-mail: tivanova1@ukr.net

PECULIARITIES OF DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA AND CONTROL OF THE DISTRIBUTION IN THE BIOTECHNOLOGICAL PROCESS OF MUSHROOM CULTIVATION

The article is devoted to a comprehensive study of physiological, biochemical, microbiological, morphological, and cultural features of isolates of pathogenic bacteria during the cultivation of mushrooms. Increasing the production of mushrooms is one of the important issues in the mushroom industry. Industry progress isn't possible without successfully resolving this issue. At the same time, the practice of the last two years has shown that due to a few economic reasons, the level of industrial mushrooming in our country has decreased. This has led to the accumulation of spent substrates of mushrooming, which causes the infection of pathogens of young mushrooms. The bacterial infections of the mushroom lead to great losses in cultivation.

The material of this study was the fruiting body of the mushroom (strain Sylvan 130). Isolated pathogens isolated from mushrooms were the subject of the study. They appeared as primary infections at the stage of active growth of the mushrooms. We used biotechnological research methods in the experiment. Using biochemical methods, we determined the

trophic features of pathogenic bacteria. This was done to develop biotechnologies to control their spread. We have studied the physiological and biochemical properties of bacteria, the reaction to the cleavage of carbohydrates on a synthetic medium. The study of the biochemical properties of pathogenic bacteria is necessary to determine their generic and species identity. To detect and study these properties, we cultured the bacteria on nutrient media containing carbon. We also investigated the oxidase activity of bacteria by the Kovacs method and catalase activity. We have scientifically substantiated and proved the ability to recognize the obtained isolates. Based on our research, we have identified the pathogens of this fungus. They were typical only of two-spore mushrooms. We have identified and compared the bacterial properties described above.

Key words: pathogenic bacteria, mushrooms, diagnostics, physiological and biochemical properties, identification.

Постановка проблеми. Збільшення обсягів виробництва печериці є одним із важливих питань індустрії грибівництва. Без успішного розв'язання якого неможливий прогрес галузі в Україні. Разом з тим, практика останніх двох років показує, що через ряд економічних причин рівень ведення промислового грибівництва у нашій країні знизився. Це призвело до накопичення відпрацьованих субстратів грибівництва, котре зумовлює зараження патогенами молодих грибів.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Гриби – це єдине джерело харчування, яке містить вітамін D, вони є єдиними природними компонентами вітаміну D. Печериці вважають джерелом вітамінів з високим рівнем рибофлавіну (вітаміну B₂), ніацину, фолатів та слідів вітаміну C, B₁, B₁₂, E. Культивовані гриби зазвичай вирощують за слабого освітлення, оскільки ультрафіолетове світло потрібне для отримання вітаміну D₂ [3,4].

Печериця двоспорова, як один з найпоширеніших грибів, дуже вибаглива до умов вирощування. Як зазначають вчені, температурний режим залежить від фази розвитку печериці [1]. Для проростання міцелію температура субстрату має становити 24–28 °C, а в період плодоношення – 18–22 °C. За температури 33°C міцелій може загинути, а за температури 3 °C її ріст припиняється, хоча життєздатність зберігається навіть за температури нижче як 0° C. Оптимальна температура повітря для розвитку плодового тіла гриба – 16 °C. У живленні гриба найбільшого значення мають азотовмісні сполуки, з яких він використовує протеїни, пептони, амінокислоти та амонійні солі, також вуглеводи у вигляді целюлози, геміцелюлози і лігніну. Оптимальним рН для росту гриба є показник 6,5–7,5 [1,2].

До великих втрат при вирощуванні печериці призводять бактеріальні інфекції.

Мета статті є розкриття фізіолого-біохімічних, анатомо-морфологічних, мікробіологічних особливостей ізолятів патогенних бактерій при вирощуванні печериці двоспорової.

Методика дослідження. Матеріалом для даного дослідження були плодіві тіла печериці двоспорової (*Agaricus bisporus*) (штам Silvan 130). Для експерименту відбирали зразки із вираженими ознаками ураження і розвитку патогенів та без них. В якості контролю слугували плодіві тіла печериці, які відбирали згідно результатів візуального огляду на симптоми пошкодження в умовах грибних господарств Києво-Святошинського, Броварського районів Київської області. Досліди виконували у триразовому повторенні упродовж 2018–2020 рр. на кафедрі екобіотехнології і біорізноманіття Національного університету біоресурсів і природокористування України та Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Для виділення та ідентифікації патогенів з печериць мікробіологічним методом відбирались зразки із явними ознаками (жовтуваті плями круглої чи неправильної форми, які з часом стають темнішими, набували коричневого кольору, з деформацією плодівих тіл, уражені поверхні покриті шаром коричневого слизу та сухими плямами). Необхідним кроком для проведення досліджень з оцінки видової належності мікроорганізмів, було виділення чистих культур для визначення належності ізолятів та окремих їх колоній до біологічних видів, типів та родів.

Вивчення біохімічних властивостей патогенних бактерій необхідне для визначення їх родової і видової

належності. Для виявлення і вивчення цих властивостей культуру бактерій висівають на поживні середовища, що містять у своєму складі різноманітні джерела вуглецю. [5-9]. Оксидазну активність (наявність цитохром-с-оксидази) визначають методом N. Kovacs. Бактеріальну масу однододової культури платинову петлею наносять на фільтрувальний папір, попередньо змочений 1 % розчином NN-диметил-п-фенілен-діамін сульфату. Позитивна оксидазна реакція (темно-червоного забарвлення бактеріальної маси) з'являється за 5 – 10 секунд. Мікроорганізми являються оксидазнегативними, якщо колір бактеріальної маси не змінюється [11-13]. Каталазну активність у ізолятів бактерій виявляють за допомогою 10 % розчину перекису водню. Дводобову культуру бактерій розтирають на скельці й додають по краплі розчин перекису водню. Поява бульбашок газу свідчить про наявність каталази [11-13].

Морфолого-культуральні особливості колоній патогенних бактерій, вивчали за допомогою малого збільшення мікроскопа. Визначали їх колір, кількість, характер росту, структуру, форму, вимірювали діаметр колоній. Консистенцію визначали тоді, коли пересівали їх на скошений агар за допомогою петлі – в'язкі колонії тягнулися за петлею.

Визначення патогенних властивостей на досліджуваному об'єкті. Пробірки з ізолятами поміщали в термостат на 2-3 доби, утримували за температури 20 °C. Після інкубації спостерігали контамінованість ізолятів. Далі готують бактеріальні суспензії щільністю за стандартом помутніння 500 млн. або 1 млрд. КУО в 1 мл стерильної водогінної води. Результати штучного зараження обраховують за 4-бальною шкалою.

Для дослідження фізіолого-біохімічних проводились реакції на розщеплення вуглеводів на синтетичному середовищі Омелянського з внесенням відповідних вуглеводів, та спостерігали на 2-й, 4, 7 і 10-й день результати ферментації. Склад середовища Омелянського: вода дистильована 1 л, K₂HPO₄ 1 г, (NH₄)₂HPO₄ 1 г, MgSO₄ 0,5 г, CaCl₂ 0,1 г, NaCl 0,3 г, FeSO₄ 0,2 г [15]

Для статистичної обробки отриманих даних використовували програмне забезпечення Microsoft Office Excel.

Основні результати дослідження. Для вивчення бактеріальних хвороб ми використовували як свіжозібраний матеріал, так і засушені зразки. Однак живі уражені бактеріозами печериці являють собою найкращий матеріал для досліджень, особливо для екстракції збудника бактеріозу. Встановлено, що певні види патогенних бактерій можуть бути з успіхом екстарговані лише з свіжих зразків гриба.

На п'яту добу після висівання на живильних середовищах утворились видимі колонії бактерій. У кожного виду бактерій властивості колоній визначаються внутрішніми особливостями мікроорганізму, їх зовнішній вигляд, структура і консистенція мають особливе значення для діагностування. Нами визначено колір, структуру і форму, характер росту та діаметр отриманих колоній. Консистенцію визначили, коли проводили пасаж на скошений агар – в'язкі колонії тягнулися за петлею. Два зразки характеризувалися правильною формою, великим розміром 3 і 5 мм відповідно, блискучою вологою поверхнею, були непрозорі і рівні, мали однорідну структуру та в'язку консистенцію. Зразки 1.3, 1.4 та 1.6 мали неправильну форму, середній розмір – 2 мм, матову, а 1.6 блискучу, волога поверхні, підвищені, консистенцію

пастоподібну. Варіант 1.5 правильної форми з нерівними краями, розмір точковий (менше 1 мм), блискуча підвищена поверхня, консистенція пастоподібна.

Результати проведеної інокуляції показали, що культури мікроорганізмів проявили патогенність для печериці. На місці ін'єкцій на плодкових тілах спостерігали симптоми в'янення, псування, зміни кольору тканини з світло- на коричневий та темно-коричневий. Дані щодо штучного зараження обраховували за 4-бальною шкалою, на двох з восьми зразків печериці були слабо виражені вірулентні властивості ізолятів і становили 2 і 3 бали відповідно, всі інші мали бал 4. Для проведення подальшої ідентифікації та після детального дослідження штучно інфікованих грибів, було відібрано шість зразків з найбільш вираженими симптомами бактеріальних уражень (рис.1, 2).

Після того, як було доведено патогенність ізолятів, досліджували забарвлення за Грамом. Бактерії набули світло-рожевого та рожевого кольору, це свідчить, що вони є грамнегативними.

Вони рухаються за допомогою джгутиків, паличками, не утворюють спор. Ними встановлено, що отримані ізоляти однорідні за морфологічними ознаками. (табл.1, рис. 3).

Вивчення біохімічних властивостей мікроорганізмів необхідне для визначення їх родової та видової належності. Для ідентифікації виділених культур мікроорганізмів проводили реакції на розщеплення вуглеводів на синтетичному середовищі Омелянського з внесенням відповідних вуглеводів, та спостерігали на 2-й, 4, 7 і 10-й день результати ферментації. Результати представлені в таблиці 2.

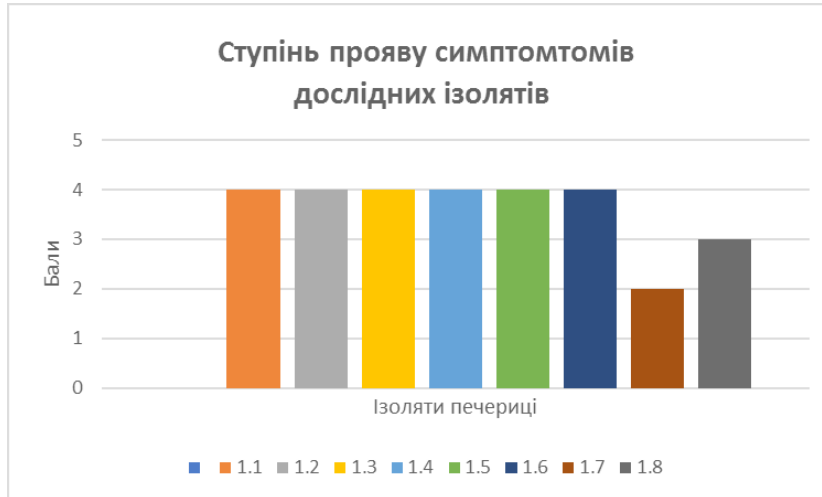


Рис. 1 Дослідні ізоляти з урахуванням ступеня прояву симптомів захворювання.

1. Морфологічна та фізіологічна характеристика обраних ізолятів

Таблиця 1

Характеристика	Номер ізоляту					
	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5	1.6
Забарвлення за Грамом	-	-	-	-	-	-
Рухливість	+	+	+	+	+	+
Форма клітин	П	П	П	П	П	П
Джгутики	+	+	+	+	+	+

Примітки: «+» – наявність ознаки; «-» – відсутність ознаки; «П» – палички.

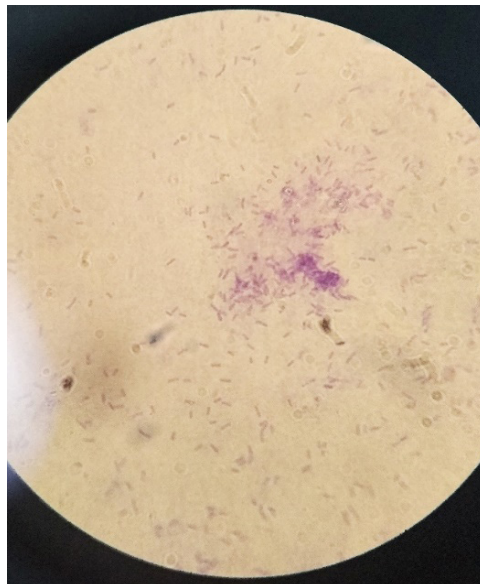


Рис. 3 Грамнегативні ізоляти бактерій, отримані з плодкових тіл

2. Біохімічні властивості бактеріальних штамів, ізольованих із уражених тканин печериці

Номер ізоляту	Оксидаза за Ковачем	Каталаза	Метаболізм глюкози
1.1	+/-	+	О
1.2	+	+	О
1.3	+	-	О
1.4	-	+	О
1.5	+/-	+	О
6	-	+	О

Примітки: «+» – наявність ознаки; «-» – відсутність ознаки; «П» – палички; «О» – окисний.

Як видно з таблиці, ізолят № 1.3 має негативний результат на каталазу. Позитивну реакцію на оксидазу показали ізоляти № 1.4 та 1.6. Слабку реакцію мали ізоляти № 1.1 та 1.5. За отриманими даними всі ізоляти мали окисний тип метаболізму.

Висновки. Нами виділено ізольовані колонії мікроорганізмів з плодкових тіл печериці. Після інкубації отримали колонії, різні за культурально-морфологічними властивостями. Це дало змогу провести дослідження з визначення належності ізолятів до біологічних видів, типів та родів.

Доведено патогенність ізолятів спричиняти захворювання печериці. Після штучного зараження грибів було встановлено, що 6 зразків ізолятів за 4-бальною шкалою, з урахуванням ступеня і характеру появи симптомів хвороби на шапинці та ніжці, а також при діагностиці внутрішніх проявів захворювання, показали найвищі бали. Вивчивши морфологічні та біохімічні властивості, ми з'ясували, що всі отримані нами ізоляти, виявились грам-негативними паличкоподібними бактеріями, які рухаються за допомогою джгутиків, не утворюють спор.

Виявлено, що позитивну реакцію на оксидазу показали ізоляти № 1.4 та 1.6. Слабку реакцію мали ізоляти № 1.1 та 1.5. За отриманими даними всі ізоляти мали окисний тип метаболізму. Зразок № 1.2 мав світло-червоний пігмент, який проявлявся через 7 діб після посіву, який є характерним для представників хромобактерій роду *Pseudomonas* та містять птерини. Особливістю ізоляту №2 є те, що він фарбує середовище в салатовий колір, котре властиве *Pseudomonas fluorescens*. Проведена нами ідентифікація ізолятів щодо грамнегативності ізолятів, позитивного результату у тесті на оксидазу, форми (паличкоподібна), флуоресцентний жовто-зелений сидерофор дають можливість припустити, що досліджувані пагонени відповідає властивостям бактерій роду *Pseudomonas*. Лише зразок 1.3 екстрагований з плодкових тіл не відповідає властивостям бактерій цього роду.

Література

1. Kalac P. A. Review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013;93(2): C.209–218. doi: 10.1002/jsfa.5960.
2. Иванова Т.В. Биотехнология їстівних грибів. *Комринт*. 2018 (2). – 165 с.
3. Sanguinetti M. Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*. 2015; 2015: 376387. doi: 10.1155/2015/376387.
4. Pereira, I. V., Ivanova, T. V. Stimulation of growth of species of the fungus of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. at a glucose nutrition. *Biotechnologia Acta*. 2017, 10(6), С. 45–52. doi: org/10.15407 / biotech10.06.045
5. Патица В.П., Пасічник Л. А., Данкевич Л.А. Діагностика фітопатогенних бактерій: Методичні рекомендації. Київ, 2014. – 57 с.
6. Ivanova T. Effects of membranotropic microfertilizers to grow the mycelium of *Lentinula Edodes* /T. V. Ivanova// *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. Vol. 9 № 3, 2019.–605-609 <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.605-609>
7. Ivanova, T.V. et al. New approaches extraction of viral RNA from edible mushrooms. *Scientific Journal «ScienceRise»*, 2015,1 (15), P. 44-46.
8. Радченко О. С. Фізіолого-біохімічні властивості мікроорганізмів та методи їх визначення: Навчальний посібник. ТОВ «Аграр Медіа Груп», 2012. – 211 с.

9. Патица В.П., Пасічник Л. А., Гвоздяк Р. І., Петриченко В.Ф., Корнійчук О. В., Калініченко А. В., Буценко Л. М., Житкевич Н.В. Фітопатогенні бактерії. Методи досліджень. ТОВ Віндрок, 2017. – 432 с.
10. Гадзало Я.М., Патица М.В., Заришняк А.С. Агробіологія ризосфери рослин. Аграрна наука; 2015.– 368 с.
11. Патица Н.В., Колодяжний А.Ю., Ібатулін І.І. Оцінка метаболізму та виявлення функціонально значущих поліморфізмів прокаріотів ґрунту методом піросекціонування. *Мікробіологічний журнал*. 2016, 78 (2): С.43–51.
12. Патица Т.І., Патица М.В., Патица В.П. Філогенетичні взаємозв'язки між серологічними варіантами *Bacillus thuringiensis*. *Біополімери та клітини*. 2009. 25 (3):С. 240–244.
13. Орлова О.В., Воробйова Н.І., Свиридова О.В., Андронов Е.Е., Колодяжний А.Ю., Москалевська Ю.П., Патица М.В. Склад та функціонування мікробних угруповань при розкладанні соломи злаків у дерново-підзолистому ґрунті. *Сільськогосподарська біологія*. 2015,50 (3). С 305–314.
14. Патица М.В., Круглов Ю.В., Бердников А.М., Патица В.Ф. Роль *Linum usitatissimum* L. у формуванні мікробних угруповань підзолистих ґрунтів. *Мікробіологічний журнал*. 2008. 70 (1). С 59–70.

References

1. Kalac P. A. (2013). Review of chemical composition and nutritional value of wild-growing and cultivated mushrooms. *Journal of the Science of Food and Agriculture*;93(2): P.209–218. doi: 10.1002/jsfa.5960 [in English].
2. Ivanova T.V. (2018). *Biotechnologiya hrybiv*. [Biotechnology of mushrooms]. V.2. Komprynt. 165 p. [in Ukrainian].
3. Sanguinetti M. (2015) Edible Mushrooms: Improving Human Health and Promoting Quality Life. *International Journal of Microbiology*. 2015: 376387. doi: 10.1155/2015/376387. [in English].
4. Pereira, I. V., Ivanova, T. V. (2017). Stimulation of growth of species of the fungus of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. at a glucose nutrition. *Biotechnologia Acta*, 10(6), P. 45–52. doi: org/10.15407 / biotech10.06.045. [in English].
5. Palyka V.P., Pasichnyk L.A., Dankevych L.A. (2014) Diagnostyka fytopatogenykh bakterii: Metodichni rekomendatsii. [Diagnostic of phytopathogenic bacteria: Guidelines]. Kyiv. 57 p. [in Ukrainian].
6. Ivanova T. Effects of membranotropic microfertilizers to grow the mycelium of *Lentinula Edodes* /T. V. Ivanova// *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. Vol. 9 № 3, 2019.–605-609 <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019/20.9.3.605-609>
7. Radchenko O. S. (2012). Fiziologo-biokhimichni vlastyivosti mikroorganizmiv ta metody yih vyznachennya: Navchalniy posibnyk. [Physiological and biochemical properties of microorganisms and methods their determination: Tutorial]. «Agrar media group». 211 p. [in Ukrainian].
8. Palyka V.P., Pasichnyk L.A., Gvozdyak R. I., Petrychenko V.F., Korniychuk O. V., Kalinichenko A.V., Butsenko L.M., Zhytkevych N.V. (2017). Phytopatogeni bakterii. Metody doslidzhen. [Phytopathogenic bacteria. Research methods]. Vindruk. 432 p. [in Ukrainian].
9. Gadzalo Ya. M., Palyka M.V., Zaryshnyak A.S. (2015). Agrobiologiya ryzosfery roslin. [Agrobiology of the rhizosphere of plants]. Agrarna nauka.368 p. [in Ukrainian].
10. Palyka M.V., Kolodyazhnyi A.Yu., Ibatullin I.I. (2016). Otsinka metagenomu ta vyyavlennya funktsionalno znachushykh polimorfizmiv prokariotiv ґрунту metodom piroseksionuvannya. [Metagenome evaluation and detection of functionally significant polymorphisms of soil prokaryotes by pyrosequencing]. *Microbiologichnyi zhurnal*, 78 (2). P.43–51. [in Ukrainian].
11. Palyka M.V., Palyka V.P., Palyka T.I., (2009). Filohenetichni vzyayemoz'yazky mizh serolohichnyimi variantamy Bacillus thuringiensis. [Phylogenetic relationships between serological variants of *Bacillus thuringiensis*]. *Biopolimery ta klityny*. 25 (3):C. 240–244. [in Ukrainian].
12. Orlova O.V., Vorobyova N.I., Svyrydova O.V., Andronov E.YE., Kolodyazhnyy A.YU., Moskalevs'ka YU.P., Palyka M.V. (2015). Sklad ta Funktsionuvannya mikrobnikh uhrupovan' pry rozkladanni solomy zlakiv u dernovo-pidzolistomu hruntі. [The composition and functioning of microbial communities in the decomposition of cereal straw in sod-podzolic soil]. *Sil's'kohospodars'ka biologiya*. 50 (3). P 305–314.
13. Palyka M.V., Kruhlov YU.V., Berdnykov A.M., Palyka V.F. (2008). Rol' *Linum usitatissimum* L. u formuvanni mikrobnikh uhrupovan' pidzolyistykh hruntiv. *Mikrobiologichnyy zhurnal*. 70 (1). P 59–70.