

## Цукролітичні функції та молекулярно-біологічна діагностика патогенних бактерій печериці двоспорової

Іванова Т. В., кандидат сільськогосподарських наук  
Ваніна О. Ю.

Національний університет біоресурсів і природокористування України  
Україна, 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15  
e-mail: tivanova1@ukr.net

**Мета.** Провести молекулярно-біологічну діагностику та визначити цукролітичні функції патогенних бактерій *Agaricus bisporus* для точної ідентифікації їх родової та видової приналежності. **Методи.** Об'єкт досліджень – шість ізолятів бактеріальних культур печериці двоспорової, виділених із плодкових тіл грибів з різних грибівничих господарств України. Позитивний контроль – еталонний штам CFBP 2068T *Pseudomonas tolaasii*. Виконували такі мікробіологічні тести: на оксидазну та каталазну активність, здатність до гідролізу желатину та до згортання або пептонізації молока, на цукролітичні властивості за допомогою методу “кольорових рядів”. Тести проводили у триразовій повторності. Екстракцію ДНК з відібраних ізолятів патогенних бактерій здійснювали за модифікованим методом Мармура. **Результати.** Усі виділені ізоляти є грамнегативними бактеріями, які флуоресціюють на МПА та МПБ +  $\text{KNO}_3$ , не гідролізують желатин, не проявляють оксидазної активності (окрім 4.1), але показують каталазну активність. Дослідження цукролітичних властивостей показало, що ізолят 1.1 використовує мальтозу, лактозу, маніт, галактозу, фруктозу та арабінозу з утворенням кислоти як єдиного джерела живлення; ізолят 2.1 утилізує мальтозу, глюкозу (аеробно), ксилозу, лактозу, маніт, сахарозу, фруктозу, галактозу, арабінозу; ізолят 3.2 – мальтозу, глюкозу (аеробно), ксилозу, лактозу, сахарозу, фруктозу, галактозу, арабінозу; ізолят 4.1 – мальтозу, глюкозу (аеробно), ксилозу, лактозу, маніт, сахарозу, фруктозу, галактозу, арабінозу; ізолят 5.1 – глюкозу, ксилозу, маніт, фруктозу, галактозу, арабінозу; ізолят 6.1 – лактозу, маніт, фруктозу, галактозу, арабінозу. Підібрано спеціальні праймери для ПЛР-аналізу. **Висновки.** Проведені експерименти дають підстави припустити, що досліджені ізоляти є патогенними, і за морфологічними ознаками їх можна віднести до роду *Pseudomonas*, оскільки вони мають такі ж морфологічні та біохімічні властивості, що й еталонний штам. Ідентифікація екстрагованих сумарної і геномної ДНК підтверджується методом ПЛР-аналізу. Результати досліджень допоможуть у пошуку ефективних шляхів ідентифікації патогенів та в попередженні поширення хвороби на ранніх стадіях розвитку грибного організму.

**Ключові слова:** печериця двоспорова, патогенні бактерії, цукролітичні функції, молекулярно-біологічна діагностика

**Вступ.** Гриб *Agaricus bisporus* має давню історію і нині широко культивується у багатьох країнах світу. Україна посідає 11-е місце у світі за обсягами виробництва печериці. На сьогоднішній день існує близько 300 ферм, загальні виробничі потужності яких становлять близько 52 тис. тонн у рік [1].

Печериці – дуже цінний продукт харчування. Але на його виробництво особливо згубно впливають бактеріальні інфекції, що вражають плодове тіла гриба, унаслідок чого знижуються врожайність та якість продукції [2]. Вивчення бактеріозів печериці необхідно для розробки методів боротьби з ними, створення нових стійких та конкурентоспроможних штамів, прогнозування розповсюдження хвороб. Дослідження ж фізіології самих

патогенів дає можливість підійти до моніторингу на клітинному рівні та вивчення ряду загальних біофізичних питань, проведення хімічного і біологічного контролю. За нинішнього високого антропогенного навантаження на сільське господарство розширюється та змінюється коло постійних збудників. Це відкриває можливості щодо використання нових агресивних штамів збудників бактеріозів печериці з метою визначення стійкості нових сортів проти захворювань.

**Аналіз літературних джерел, постановка проблеми.** Провівши моніторинг досліджень як українських, так і зарубіжних науковців, можна дійти висновку, що сьогодні в дослідженнях учених-мікологів широко використовується метод молеку-

лярно-біологічної діагностики патогенних бактерій, зокрема на печериці двоспоровій.

Ідентифікація ізолятів *Pseudomonas tolaasii* методом ПЛР (полімеразно-ланцюгова реакція), описаним Н. І. Lee зі співавторами [3], проводиться з допомогою набору праймерів (Pt-1A, Pt-1D1), що є специфічними для виявлення цих бактерій. Опорний штам *P. tolaasii* CFBP 2068T використовують як позитивний контроль. Отримані послідовності збирають за допомогою Pregar4 від програмного пакета Staden.

У 2000 р. корейськими вченими був розроблений метод мультиплексного ПЛР-аналізу для виявлення *Pseudomonas tolaasii* та *Pseudomonas agarici* за допомогою наборів праймерів PTOF/PTOR і PAGF/R23-1R [4].

Варто підкреслити, що названий метод успішно використовується у світовій практиці. Наприклад, у 2015 р. за використання вищезгаданої методики іранськими науковцями [5] було проведено ідентифікацію штамів *P. tolaasii* та *P. reactans* у різних центрах вирощування грибів. Схожі тести проводились також у Фінляндії [6]. Було виділено 16 патогенних ізолятів *P. tolaasii* та визначено їх генотипову різноманітність шляхом REP, ERIC-PCR аналізу та методом Саузерн-блоттингу. Це допомогло виявити серед досліджених фінських ізолятів такі, котрі спричиняють бурий колір плямистої хвороби печериці та різняться як фенотипово, так і генотипово.

В Україні молекулярно-біологічною діагностикою хвороб печериці займаються такі вчені, як Т. В. Іванова, О. А. Бойко, Н. А. Бісько, І. О. Дудка, Н. Л. Поединок, використовуючи у своїх дослідженнях методи ІФА, ПЛР та електронної мікроскопії [7]. Учені підкреслюють, що однією з причин поширення хвороб є низькоякісний посівний матеріал (міцелій) грибів, часто інфікований патогенами. З огляду на поширення хвороб печериці науковці розробили систему їх діагностики, що дає змогу відібрати здоровий продуктивний посівний матеріал грибів.

Слід відмітити, що в Україні більш поширена діагностика вірусних, а не бактеріальних інфекцій. Розробляються високоточні ефективні тест-системи для ідентифікації вірусів печериці, що дає можливість забезпечити експрес-діагностику і вдале закладання безвірусного матеріалу грибів [8].

Виконані дослідження сприяють своєчасному проведенню заходів щодо запобігання та боротьби з інфекціями, що дає виробникам змогу досягти високих результатів при вирощуванні печериці.

**Мета досліджень** – провести молекулярно-біологічну діагностику та визначити цукролітичні функції патогенних бактерій *Agaricus bisporus* для точної ідентифікації їх родової та видової приналежності.

**Матеріал і методика.** Дослідження виконували на кафедрі екобіотехнології та біорізноманіття Національного університету біоресурсів та природокористування України та у відділі фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Об'єкт дослідження – шість ізолятів бактеріальних культур печериці двоспорової, що було виділено з грибів декількох грибівничих ферм: ТОВ «ЕкоМашПрод», ТОВ «Гриби – Україна», ЗАТ «Укршампіньон», ТОВ «Лексма», ТОВ «Українські печериці» та ТОВ «ДінБо». Позитивний контроль – еталонний штам CFBP 2068T *Pseudomonas tolaasii*.

Цукролітичні властивості, тобто здатність мікроорганізмів розщеплювати за допомогою ферментів вуглеводи, перевіряли з використанням спеціальних «кольорових рядів», що готувалися таким чином: до 100 мл дистильованої води додали 1 г пептону, 0,5 г кухонної солі. Пептон і сіль розчинили, нагріваючи воду декілька хвилин, і профільтрували через паперовий фільтр до абсолютної прозорості розчину, потім додали по 0,5 г застосовуваних вуглеводів: мальтоза, глюкоза (аеробно), глюкоза (анаеробно), ксилітоза, лактоза, дульцин, маніт, галактоза, сахароза, фруктоза, арабіноза, – а також відповідну кількість індикатора (лакмусова настоянка).

Ці середовища засіяли однодобовою культурою зразків, на 14-й день провели оцінку кислотності та відзначили утворення кислоти (К) та луку (Л).

Тест на оксидазну активність проводили шляхом нанесення однодобової бактеріальної маси на фільтрувальний папір, попередньо змочений 1 % розчином N-диметил-п-фенілен-діамін сульфату.

Тест на каталазну активність проводили за допомогою розтирання дводобової культури зразків на скельці з додаванням розчину пероксиду водню.

Перевірка здатності до гідролізу желатину здійснювали таким чином: інокулювали патогенами середовище, що містить 0,4 % желатину, та додавали реактив, що осаджує желатин: 15 %  $HgCl_2$  у 20 % (за об'ємом) концентрованої  $HCl$ . Через три дні визначали наявність висвітленої зони.

Першочерговим завданням була молекулярно-біологічна діагностика, для якої потрібно було провести екстракцію ДНК з відібраних ізолятів патогенних бактерій, що виконували за допомогою модифікованого методу Мармура [9]. Перенесли повністю завантажену петлю бактеріальної біомаси у пробірку об'ємом 2 мл з 800 мкл ЕДТА, змішували її на вортексі, після чого додали 10 мкл лізоциму та 7 мкл РНКазі А. Інкубували за температури 37 °C протягом 30 хв, центрифугуючи на вортексі кожні 15 хв та додаючи 80 мкл SDS.

Після цього матеріал інкубували за температури 65 °C протягом 10 хв з додаванням 250 мкл хлориду натрію 5 М. Потім пробірку струшували на максимальній швидкості протягом кількох секунд, додаючи 400 мкл суміші хлороформ-ізоамілового спирту (24:1). Знову струшували протягом 15 хв при 1400 об/хв на орбітальному шейкері. Далі центрифугували при 13 тис. обертів/хв протягом 15 хв. Супернатант переносили у стерильну пробірку об'ємом 2 мл, уникаючи білкового шару. Додавали 400 мкл хлороформ-ізоамілового спирту, енергійно струшували вручну і знову центри-

Таблиця 1. Властивості досліджених ізолятів бактеріальних культур печериці

Фізіолого-біохімічні тести	Ізолят					
	1.1	2.1	3.2	4.1	5.1	6.1
Оксидазна активність	-	-	-	+	-	-
Каталазна активність	+	+/-	+/-	+/-	+	+
Лакмусова сироватка	Л	-	-	-	Л	Л
Молоко	-	1/3 пептонізація	3/4 згортання	слабке згортання	-	-
Гідроліз желатину	-	-	-	-	-	-
Ріст на МПА	Ф	Ф	Ф	Ф	Ф	Ф
Ріст на МПБ +KNO <sub>3</sub>	Ф	Ф	Ф	Ф	Ф	Ф
Використання:						
Мальтоза	К	К	К	К	К	-
Глюкоза (аеробно)	-	К	К	К	К	-
Глюкоза (анаеробно)	-	-	-	-	-	-
Ксилоза	-	К	К	К	К	-
Лактоза	К	К	К	К	К	К
Дульцит	-	-	-	-	-	-
Маніт	К	К	-	К	К	К
Галактоза	К	К	К	К	К	К
Сахароза	-	К	К	К	-	-
Фруктоза	К	К	К	К	К	К
Арабіноза	К	К	К	К	К	К
Колір колоній	молочні	молочно-білі	молочні	молочно-білі	молочні	кремові

Примітки: “-” – відсутність ознаки; “+” – наявність ознаки; К – утворення кислоти; Л – луг; Ф – флюоресценція.

фугували. До 1 мл отриманого зразка додавали 90 мкл ацетату натрію 3 М та 600 мкл холодного ізопропанолу (4 °С). Осаджували ДНК, перевернувши пробірку кілька разів вручну, потім струшували сильніше, щоб зв'язати нитки ДНК. Осаджували ДНК за допомогою скляної палички, яку залишили до повного висихання на 5 хв за кімнатної температури. Суспензували заморожену ДНК в 100 мкл «Tris» (Tris 1 мМ та EDTA 0,1 мМ; рН = 7,0–8,0). Інкубували ДНК протягом 12 год за 4 °С для повної ресуспензії.

Після екстракції для кращого збереження ДНК розчиняли в буфері SSC (0,15 М NaCl, 0,015 М тринатрійцитрат, рН 7,0 – 80 мкл) і поміщали в морозильну камеру за температури мінус 20 °С.

**Обговорення результатів.** У таблиці 1 надано виявлені за допомогою фізіолого-біохімічних тестів властивості досліджуваних ізолятів, виділених із *Agaricus bisporus*.

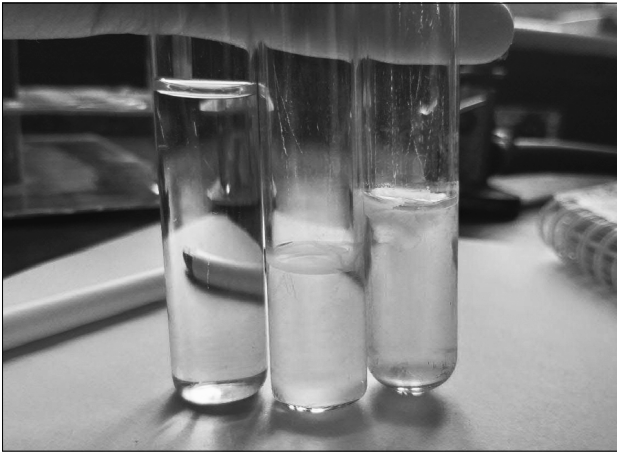
Проведені дослідження свідчать, що вивчені ізоляти є грамнегативними бактеріями, які флюоресціюють на м'ясо-пептонному агарі та м'ясо-пептонному бульйоні + KNO<sub>3</sub>, не гідролізують желатин, не проявляють оксидазної активності (окрім 4.1), але показують каталазну активність.

За допомогою методу «кольорових рядів» було виявлено такі цукролітичні властивості (рис. 1): ізолят 1.1 використовує мальтозу, лактозу, маніт, галактозу, фруктозу та арабінозу з утворенням кислоти як єдиного джерела живлення; ізолят 2.1 утилізує мальтозу, глюкозу (аеробно), ксилозу, лактозу, маніт, сахарозу, фруктозу, галактозу, арабінозу; ізолят 3.2 – мальтозу, глюкозу (аеробно), ксилозу, лактозу, сахарозу, фруктозу, галактозу, арабінозу; ізолят 4.1 – мальтозу, глюкозу (аеробно), ксилозу, лактозу, маніт, сахарозу, фруктозу, галактозу, арабінозу; ізолят 5.1 – глюкозу, ксилозу, маніт, фруктозу, галактозу, арабінозу; ізолят 6.1 – лактозу, маніт, фруктозу, галактозу, арабінозу.



Рис. 1. Перевірка цукролітичних властивостей ізолятів бактеріальних культур *Agaricus bisporus* за допомогою методу «кольорових рядів»

В існуючих і перспективних методах мікробіологічного контролю можуть бути закладені фізичні, хімічні та біологічні принципи виявлення біологічних агентів. Для тестування наявності мікроорганізмів можна застосовувати ряд різних барвників, зокрема таких, як бенз[ед]індол і бенз[д]індол, які у присутності мікроорганізмів змінюють свій колір. Як відомо, самі мікроорганізми, продукти їх розпаду і життєдіяльності (ендо- і екзотоксини) мають властивість поглинати світло і власну флюоресценцію в ультрафіолетовій ділянці за рахунок триптофанових і тирозинових залишків протеїнів токсинів. На підставі цього було запропоновано використовувати зазначену властивість для виявлення мікроорганізмів – патогенів печериці двоспорової. Жовтий колір за флюоресценції свідчить про те, що клітини містили однакову кількість мРНК, отже рівень експресії цього гену в даних зразках був однаковий (рис. 2).



**Рис. 2.** Приклад флюоресценції на зразках бактеріальних культур печериці двоспорової. Зліва направо: негативний контроль, ізолят 1.1, ізолят 5.1

Ріст і тип ізолятів на діагностичних середовищах було порівняно з такими у колекційних еталонних штамів, а також перевірено їхню ідентичність згідно з літературними джерелами [10, 11].

Оскільки популярною нині є молекулярно-біологічна діагностика, основним методом якої є ПЛР, з метою детальної ідентифікації ізолятів нами підібрано спеціальні праймери для ПЛР-аналізу (табл. 2).

**Висновки.** Проведені дослідження дають підстави стверджувати, що вивчені патогенні ізоляти за морфологічними ознаками можуть бути віднесені до роду *Pseudomonas*, оскільки мають

**Таблиця 2. Праймери для ідентифікації патогенних бактерій**

Бактерія	Праймер
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (за методом Lee et al., 2002 [3])	Pt-1A (5'-ATCCCTTCGGCGTTTACCTG-3') Pt-1D1 (5'-CAAAGTAACCCCTG CTTCTGC-3') Pt-PM (5'-TGCCTTACGCGCTGATTGGC-3') Pt-QM (5'-TGATCAAACCTCCAGCAATAG-3')
<i>Pseudomonas tolaasii</i> (за методом Kwon et al., 2000 [4])	PTOF (5'-GAACACACAGAGCAGGAGTG-3') PTOR (5'-CGTCGTTGATAGTTCCGCTGG-3')
<i>Pseudomonas agarici</i> (за методом Kwon et al., 2000 [4])	PAGF (5'-CT TGACACACCGCCCGTCA-3') R23-1R (5'-GGTACTTAGATGTTTCAGTTC-3')
<i>Pseudomonas reactans</i> (за методом Tajalipour et al., 2015 [12])	LAPS (5'-TGGCCGAGAACCAGTTCGCGT-3') LAPS27 (5'-CGGCTTCGTCCAG CTTGTTCCAG-3')

такі ж морфологічні та біохімічні властивості, що й еталонний штам. Підібрано спеціальні праймери для ПЛР-аналізу. Подальші дослідження мають бути спрямовані на вискоєфективну ідентифікацію ізолятів методом ПЛР-аналізу. Це допоможе в пошуку дієвих заходів з експрес-визначення хвороб та контролю зараженості на ранніх стадіях розвитку грибного організму. Своєчасне планування та проведення експертизи, зокрема із застосуванням ДНК-технологій, сприятиме одержанню високого врожаю, а відтак і підвищенню прибутку.

### Список використаних джерел

- Дубініна А., Тимофєєва О. Розвиток грибівництва в Україні. *Харчова і переробна промисловість*. 2009. № 7–8. С. 8–9.
- Бойко О. А., Мельничук М. Д., Іванова Т. В. Распространение, диагностика и профилактика болезней шампиньона двухспорового. *Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук*. 2009. № 2. С. 23–24.
- Lee H. I., Jeong K. S., Cha J. S. PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. *Letters in Applied Microbiology*. 2002. Vol. 35, Iss. 4. P. 276–280. doi: 10.1046/j.1472-765x.2002.01178.x
- Kwon S. W., Kim S. H., Go S. J. PCR assays for detection of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas agarici*. *Mycobiology*. 2000. Vol. 28, Iss. 2. P. 89–92. doi: 10.1080/12298093.2000.12015729
- Iacobellis N. S. Recent advances on bacterial diseases of cultivated mushrooms. *Proceedings of the Seventh International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP)* / ed. by Savoie, J. M., Foulongne-Oriol, M., Large-teau, M., & Barroso, G. (Arcachon, France, 4–7 October 2011). INRA, Bordeaux, 2011. Vol. 1. P. 457–465.
- Munsch P., Johnstone K., Alatosava T. Evidence for genotypic differences between the two siderovars of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiological Research*. 2002. Vol. 157, Iss. 2. P. 93–102. doi: 10.1078/0944-5013-00141
- Іванова Т. В., Бойко О. А., Мельничук М. Д. Оценка разных видов болезней шампиньона двоспорового (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach). *Живые и биокосные системы*. 2014. № 8. URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-8/article-2>
- Іванова Т. В. Виявлення вірусних хвороб у плодів тілах печериці двоспорової (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach). *Наукові доповіді НУБіП*. 2011. № 7(23). 12 с. URL: <http://nd.nubip.edu.ua/2011-1/11tvibsm.pdf>
- Salva-Serra F., Svensson-Stadler L., Busquets A., Jaen-Luchoro D., Karlsson R., Moore E. R. B., Gomila M. A protocol for extraction and purification of high-quality and quantity bacterial DNA applicable for genome sequencing: a modified version of the Marmur procedure. *Protocol Exchange*. 2018. doi: 10.1038/protex.2018.084
- Билай В. И., Гвоздяк Р. И., Скрипаль И. Г., Краев В. Г., Элланская И. А., Зирка Т. А., Мурач В. А. Микроорганизмы – возбудители болезней растений / под ред. В. И. Билай. Киев: Наукова думка, 1988. 550 с.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria / ed. by Boone D. R.; Castenholz R. W. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 2001. 721 p.
- Tajalipour Sh., Hassanzadeh N., Heydari A., Jolfaee H. K. Study on genetic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas reactans* bacteria associated with mushroom brown blotch disease employing ERIC and BOX-PCR techniques. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*. 2015. Vol. 8, Iss. 3. P. 398–405.

## References

- Dubinina, A., & Tymofieieva, O. (2009). Development of mushroom growing in Ukraine. *Food and Processing Industry*, 7–8, 8–9. [in Ukrainian]
- Boyko, O. A., Melnichuk, M. D., & Ivanova, T. V. (2009). Propagation, diagnostics and prophylaxis of diseases in common double-spore mushroom. *Reports of RAAS*, 2, 23–24. [in Russian]
- Lee, H. I., Jeong, K. S., & Cha, J. S. (2002). PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35(4), 276–280.
- Kwon, S. W., Kim, S. H., & Go, S. J. (2000). PCR assays for detection of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas agarici*. *Mycobiology*, 28(2), 89–92. doi: 10.1080/12298093.2000.12015729
- Iacobellis, N. S. (2011). Recent advances on bacterial diseases of cultivated mushrooms. In: Savoie, J. M., Foulongne-Oriol, M., Largeteau, M., & Barroso, G. (Eds.). *Proceedings of the Seventh International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMB)*. Vol. 1 (pp. 457–465). October 4–7, 2011, Arcachon, France.
- Munsch, P., Johnstone, K., & Alatosava, T. (2002). Evidence for genotypic differences between the two siderovars of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiol. Res.*, 157(2), 93–102.
- Ivanova, T. V., Boyko, O. A., & Melnichuk, M. D. (2014). Monitoring of mushrooms *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach: diagnostics and prevention of diseases. *Living and Nonliving Systems*, 8. Retrieved from <http://www.jbks.ru/archive/issue-8/article-2> [in Russian]
- Ivanova, T. V. (2011). Identification of virus diseases in fruit bodies of cultivated mushrooms. *Scientific reports of NULES*, 7. URL: <http://nd.nubip.edu.ua/2011-1/11tvibsm.pdf>
- Salva-Serra, F., Svensson-Stadler, L., Busquets, A., Jaen-Luchoro, D., Karlsson, R., Moore, E. R. B., & Gomila, M. (2018). A protocol for extraction and purification of high-quality and quantity bacterial DNA applicable for genome sequencing: a modified version of the Marmur procedure. *Protocol Exchange*. doi: 10.1038/protex.2018.084
- Bilay, V. I., Gvozdyak, R. I., Skripal, I. G., Krayev, V. G., Ellanskaya, I. A., Zirka, T. A., & Muras, V. A. (1988). Microorganisms as Pathogens of Plants. V. I. Bilay (Ed.). Kiev: Naukova dumka. [in Russian]
- Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (Eds.). (2001). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria). (2<sup>nd</sup> ed.). New York: Springer-Verlag.
- Tajalipour, Sh., Hassanzadeh, N., Heydari, A., & Jolfaee, H. K. (2015). Study on genetic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas reactans* bacteria associated with mushroom brown blotch disease employing ERIC and BOX-PCR techniques. *Intl. J. Agri. Crop Sci.*, 8(3), 398-405.

### Сахаролитические функции и молекулярно-биологическая диагностика патогенных бактерий шампиньона двуспорового

Иванова Т. В., кандидат сельскохозяйственных наук  
Ванина О. Ю.

Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины  
Украина, 03041, г. Киев, ул. Героев Оборона, 15  
e-mail: [tivanova1@ukr.net](mailto:tivanova1@ukr.net)

**Цель.** Провести молекулярно-биологическую диагностику и определить сахаролитические функции патогенных бактерий *Agaricus bisporus* для точной идентификации их родовой и видовой принадлежности. **Методы.** Объект исследований – шесть изолятов бактериальных культур шампиньона двуспорового, выделенных из плодовых тел грибов из разных грибоводческих хозяйств Украины. Позитивный контроль – эталонный штамм *Pseudomonas tolaasii* CFBP 2068T. Выполняли следующие микробиологические тесты: на оксидазную и каталазную активность, способность к гидролизу желатина и свертываемости или пептонизации молока, на сахаролитические свойства с помощью метода «цветных рядов». Тесты проводили в трехразовой повторности. Экстракцию ДНК из выделенных изолятов патогенных бактерий проводили модифицированным методом Мармура. **Результаты.** Все выделенные изоляты являются граммотрицательными бактериями, которые флуоресцируют на МПА и МПБ + KNO<sub>3</sub>, не гидролизуют желатин, не проявляют оксидазной активности (кроме 4.1), но показывают каталазную активность. Исследования сахаролитических свойств показали, что изолят 1.1 использует мальтозу, лактозу, маннит, галактозу, фруктозу и арабинозу с образованием кислоты в качестве единственного источника питания;

изолят 2.1 утилизирует мальтозу, глюкозу (аэробно), ксилозу, лактозу, маннит, сахарозу, фруктозу, галактозу, арабинозу; изолят 3.2 – мальтозу, глюкозу (аэробно), ксилозу, лактозу, сахарозу, фруктозу, галактозу, арабинозу; изолят 4.1 – мальтозу, глюкозу (аэробно), ксилозу, лактозу, маннит, сахарозу, фруктозу, галактозу, арабинозу; изолят 5.1. – глюкозу, ксилозу, маннит, фруктозу, галактозу, арабинозу; изолят 6.1 – лактозу, маннит, фруктозу, галактозу, арабинозу. Подобраны специальные праймеры для ПЦР-анализа. **Выводы.** Проведенные эксперименты дают основания предположить, что исследованные изоляты являются патогенными, и по морфологическим признакам их можно отнести к роду *Pseudomonas*, поскольку они имеют такие же морфологические и биохимические свойства, как и эталонный штамм. Идентификация экстрагированных суммарной и геномной ДНК подтверждается методом ПЦР-анализа. Результаты исследований помогут в поиске эффективных путей идентификации патогенов и в предупреждении распространения болезни на ранних стадиях развития грибного организма.

**Ключевые слова:** шампиньон двуспоровый, патогенные бактерии, сахаролитические функции, молекулярно-биологическая диагностика

### Sugarolytic functions and molecular-biological diagnostics of pathogenic bacteria of white button mushroom *Agaricus bisporus*

Ivanova T. V., Candidate of Agricultural Sciences  
Vanina O. Yu.

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine  
15, Heroiv Oborony St., Kyiv, 03041, Ukraine  
e-mail: [tivanova1@ukr.net](mailto:tivanova1@ukr.net)

**Purpose.** To carry out molecular and biological diagnostics and to determine sugarolytic functions of pathogenic bacteria of *Agaricus bisporus* for accurate identification of their genus and species. **Methods.** Six bacterial cultures isolated from fruit bodies of white button mushroom produced by some farms in Ukraine were tested vs. reference strain CFBP 2068T *Pseu-*

*domonas tolaasii* as a positive control. There were performed such microbiological tests: for oxidase and catalase activity, for ability to hydrolyze gelatin and to coagulate or peptonize milk, for sugarolytic properties using method of “color series”. The tests were carried out with three replications. DNA were extracted from selected isolates of pathogenic bacteria was performed

with the Marmur's modified method. **Results.** All isolates are gram-negative bacteria that fluoresce on beef-extract agar and beef-extract broth + KNO<sub>3</sub>, do not hydrolyze gelatin, do not show oxidase activity (except for 4.1), but show catalase activity. The results on sugarolytic properties are as follows: isolate 1.1 uses maltose, lactose, mannitol, galactose, fructose and arabinose with acid formation as the only nutrition source; isolate 2.1 utilizes maltose, glucose (aerobically), xylose, lactose, mannitol, sucrose, fructose, galactose, arabinose; isolate 3.2 does maltose, glucose (aerobically), xylose, lactose, sucrose, fructose, galactose, arabinose; isolate 4.1 does maltose, glucose (aerobically), xylose, lactose, mannitol, sucrose, fructose, galactose, arabinose; isolate 5.1. does glucose, xylose, mannitol, fructose,

galactose, arabinose; isolate 6.1 does lactose, mannitol, fructose, galactose, arabinose. There have been were chosen special primers for PCR analysis. **Conclusions.** The experiments suggest that the isolates studied are pathogenic and morphologically may be attributed to the genus *Pseudomonas* because they possessive the same morphological and biochemical properties as the reference strain. Identification of total and genomic DNA extracted is confirmed by PCR analysis. The results of the research would help to find effective ways of identifying the pathogens and to prevent spread of the disease during the early stages of the mushroom growth.

**Key words:** *Agaricus bisporus*, pathogenic bacteria, sugarolytic functions, molecular and biological diagnostics