

УДК 581.2:58.057

Бактеріальне ураження огірків в умовах космічного польоту

Р. І. Гвоздяк, О. П. Коробко, О. Г. Азімцев

Інститут мікробіології та віросології ім. Акад. Д. К. Заболотного НАН України, Київ

Надійшла до редакції 25.03.97

Із загиблих сіянців огірків в умовах космічного польоту станції «Салют-6» виділені фітопатогенні бактерії родів *Bacillus*, *Pseudomonas* і *Erwinia*. Найбільш агресивним виявився ідентифікований вид *Bacillus polymyxa* Cohn 1872.

Для забезпечення життєдіяльності космонавтів при довготривалих космічних польотах необхідне надійне функціонування регенеруючої системи. В такій системі використовуються вищі рослини, які виділяють кисень, поглинають вуглекислий газ і являють собою продукти харчування. Тому безперервне вирощування рослин є одним із основних критеріїв надійності забезпечення життєвих умов космонавтів.

В багатьох експериментах по вирощуванню рослин на орбітальних станціях «Салют» спостерігали низьку схожість насіння та загибель значної кількості молодих рослин. При аналізах результатів польотних експериментів, а також спеціальних лабораторних дослідів називались дві причини, які привели до відмиріння рослин, а саме:

- недосконалість технології культивування рослин у невагомості, внаслідок якої відбувається повне насичення субстрату водою і поява анаеробних умов в зоні кореневих систем;
- токсична дія на рослини, особливо на їх генеративні органи, мікродомішок атмосфери космічних апаратів (Парфенов, 1988).

Такі висновки, можливо, і справедливі, але вони не враховують можливості ураження рослин збудниками бактеріальних, грибних або вірусних захворювань. Взагалі хворобам рослин в космічних умовах не приділяється належної уваги. Окрім вивчення пухлиноутворення на зразках корнеплодів моркви, що спричиняється бактерією *Agrobacterium tumefaciens* в умовах польотів біосупутників «Космос-782» та «Космос-1129» (Рубін та ін., 1979; Парфенов, 1988), дані про захворювання рослин в

науковій літературі відсутні.

Метою нашого дослідження було встановлення причини ураження сіянців огірків, які вирощувались в умовах космічного польоту станції «Салют-6», керованої космонавтами В. А. Ляховим та В. В. Рюміним. Зразки отримані від В. А. Кордюма, за що висловлюємо йому ширу подяку.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Проведено бактеріологічне дослідження уражених тканин стебел, сім'ядоль і коріння сіянців огірків та насіння, що не проросло. Уражені рослини мали такі симптоми: стебла мацеровані або некротизовані, сім'ядолі — скарлючені, коріння — бурого, коричневого або чорного кольору, коренева шийка некротизована з ознаками гнилі. Непроросле насіння наповнене білою м'якою гомогенною масою, а його оболонка мала сіре або темно-сіре забарвлення. Бактерії ізолявали на четверту добу після приземлення корабля із уражених тканин та субстрату, на якому вирощували рослини, безпосередньо та з попереднім ретельним відмиванням зразків стерильною водою. Зразки гомогенізували і висівали на тверді картопляне та м'ясо-пептонне середовища (Бельтюкова та ін., 1968).

Вивчення фітопатогенних властивостей виділених ізолятів проводили шляхом замочування насіння у водній суспензії клітин бактерій (титр 10^8 кл/мл) на протязі 3 годин з наступним пророщуванням спочатку в термостаті (27°C , 3 доби), а потім при кімнатній температурі. Проростки іноку-

лювали методом уколів через краплю суспензії та шляхом внесення 5–10 мл суспензії бактерій у кореневу систему. Морфологічні та фізіологічні ознаки ізолятів вивчали загальноприйнятими в мікробіології методами (Cowan, Steel, 1965; Бельтюкова та ін., 1968; Когобко, 1988), ідентифікацію штамів зроблено згідно з визначником бактерій (Bergery's, 1986).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всього проаналізовано 16 зразків і виділено 83 штами бактерій. Виділені ізоляти відрізнялися між собою патогенними властивостями. За симптомами та ступенем ураження при штучній інокуляції насіння та сіянців огірків ізоляти розподілено на чотири групи, а саме:

- 1) сильно агресивні, що спричиняли інтенсивну гниль насіння, стебел, коріння та плямистість сім'ядолей;
- 2) помірно агресивні, що викликали тільки плямистість на сім'ядолях;
- 3) слабо агресивні, що спричиняли незначне загнивання насіння та некротизацію кореневої системи;
- 4) непатогенні ізоляти.

За морфологічними, культуральними, фізіологічно-хімічними властивостями виділені штами віднесені до родів *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Escherichia* і *Aeromonas*. Найбільш вірulentними виявилися штами роду *Bacillus*, які ідентифікували як *B. polymyxa* Cohn 1872. Основні їх характеристики: бактерії спороносні, спори еліпсоподібні, які розташовані в основному в центрі клітини і рідше

— на її кінці. Розмір спор становив (0.9—1.1)×(1.8—3.0) мкм. Вегетативні клітини являють собою тонкі палички із загостреними кінцями розміром (0.3—0.5)×(1.9—3.1) мкм. При спороутворенні клітини роздувались; за Грамом фарбувалися негативно в молодому віці (18—20 год росту на твердому середовищі) і позитивно — в старій культурі (48 год росту). Колонії на картопляному середовищі непрозорі, близькучі, круглі, бурого або коричневого кольору після семи діб вирощування при 27 °C з ущільненим центром та вираженою борізdkою навколо нього (рис. 1). Діаметр колонії досягав 7—9 мм.

Бактерії продукували пектиназу, зсідали і пептонізували молоко, підкислювали лактусову сироватку, не утворювали оксидазу, тирозиназу, індол, сірководень, кислоту на середовищі з метил червоним (MR), не утилізували ацетат та цитрат натрію на середовищі Симонса, не росли на глюкозі в аеробних та анаеробних умовах на середовищі Хьюг—Лейфсона. На рекомендованому для спорових бактерій середовищі № 1 (Gibson, Gordon, 1974) виділені штами утилізували маніт, арабінозу, ксилозу та глюкозу з виділенням кислоти, а на середовищі № 2 — кислоти та газу.

На мінеральному середовищі Омелянського із 16 вуглеводами шість цукрів (лактозу, мальтозу, сахарозу, дульцит, саліцин, рамнозу) ці бактерії зовсім не утилізували, а інші споживали повільно і slabko.

Порівнюючи ознаки виділених спорових бактерій з видами роду *Bacillus*, які мають, як і ізольовані нами, пектолітичні ферменти (табл. 1), встановлена їх ідентичність з видом *Bacillus polymyxa* Cohn 1872.

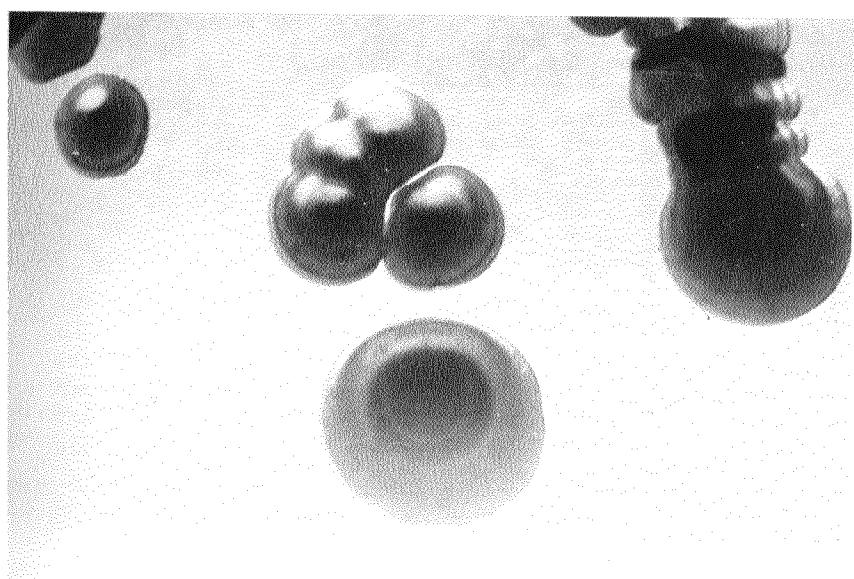


Рис. 1. Колонії *Bacillus polymyxa* на твердому картопляному середовищі на сьому добу інкубації при 27 °C (4.3^X)

При штучному зараженні штами *B. polymyxa* спричиняли гниль насіння огірків в залежності від штаму в межах 33.3—83.3 % (табл. 2); збільшували кількість деформованих проростків в 5—19 раз, які відставали в рості в 1.5—4 рази (рис. 2),

Таблиця 1. Порівняльна характеристика ізольованих із огірків бактерій *B. polymyxa* із близькими видами роду *Bacillus*

Властивості бактерій	Cowan, Steel, 1965; Bergey's, 1986			Виділені на-ми шта-ми
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. polymyxa</i>	<i>B. macerans</i>	
Забарвлення клітин за Грамом	+	-/+	-/+	-/+
Вегетативна клітина слабо випукла або пряма. Спори овальні або циліндричні, стінка спори тонка	+	-	-	-
Вегетативна клітина виражено випукла. Спори овальні, рідше — циліндричні. Стінка спори товста	-	+	+	+
Наявність перитрихальних джгутиків	+	+	+	+
Утилізація глукози	+	+	+	+ г
Утилізація арабінози, маніту	+	+	+	+
Утилізація цитрату	+	-	-	-
Гідроліз желатину	+	+	+	+
Гідроліз казеїну	+	+	-	+
Гідроліз крохмалю	+	+	+	+
Продукування індолового, лецитинази	-	-	-	-
Продукування ацетоїну	+	+	-	+
Продукування уреази	-/+	-	-	-
Редукція нітратів	+	+	+	+

Примітка. «+» — позитивний результат, «-» — негативний результат, «-/+» — варіабельний результат, «г» — продукування газу.

а їх корінці загнивали. На сім'ядолях утворювались світло-коричневі, часто дірчасті, або сірі з коричневим центром та дифузним хлорозним обідком плями, які розповсюджувались з часом на всю поверхню сім'ядолей. При внесені сусpenзії бактерій у кореневу систему корені ставали бурими, некротизувалися і відпадали, що призводило до загибелі рослин.

Оскільки на станції «Салют-6» проводились експерименти з пшеницею, проростки якої теж загинули, ми дослідили вплив ізольованих штамів *B. polymyxa* на насіння та проростки пшениці. Виявилось, що обробка насіння бактеріями викликає їх загнивання в межах 10—80 % в залежності від штамів, кількість деформованих рослин становила 10—20 % (табл. 3). Коренева система некротизувалась та загнивалась, а проростки відставали у рості (рис. 3).

Загнивання насіння і проростків огірків та пшениці під впливом бактерій *Bacillus polymyxa* вказувало на здатність їх утворювати пектолітичні ферменти, що було підтверджено у дослідах з іншими видами рослин. Нанесення бактеріальної маси клітин на соковиті тверді тканини плодів огірків, дині, кавунів, кабачків, патисонів, моркви, буряків та картоплі викликало їх мацерацію через 24—48 год після інокуляції.

Серед бактерій роду *Pseudomonas* виділені патогенні і непатогенні штами бактерій, які були грамнегативними, з полярними джгутиками, строгими аеробами, флуоресцентними на середовищі Кінга-Б та пептонному бульйоні. Вони пептонізували молоко, на лактусовій сироватці утворювали луг, продукували оксидазу або її не мали. Патогенні штами утворювали пектиназу, непатогенні — її не мали.

Штами роду *Erwinia*, які викликали при штучно-му зараженні насіння огірків плямистість на сім'ядолях

Таблиця 2. Результати інфікування насіння огірків сорту Неросимий-40 штамами *Bacillus polymyxa*

Номери штамів, якими інфікували насіння	Одержано проростків				Насіння, яке наклонулося, але загнило або покрилось плямами	
	всього		в тому числі деформованих		кількість	доля, %
	кількість	доля, %	кількість	доля, %		
Контроль (без обробки)	27	90.0	1	3.3	3*	10.0
1070б	16	53.3	8	26.7	14	46.7
1071а	5	16.7	5	16.7	25	83.3
1074г	13	43.3	13	43.3	17	56.7
1075б	20	66.7	5	16.7	10	33.3
1076а	17	56.7	17	56.7	13	43.3
1077г	19	63.3	19	63.3	11	36.7
1078д	16	53.3	8	26.7	14	46.7
1079д	9	30.0	9	30.0	21	70.0

* — насіння не проросло і не загнило.
Кожним штамом інфіковано 30 насінин.

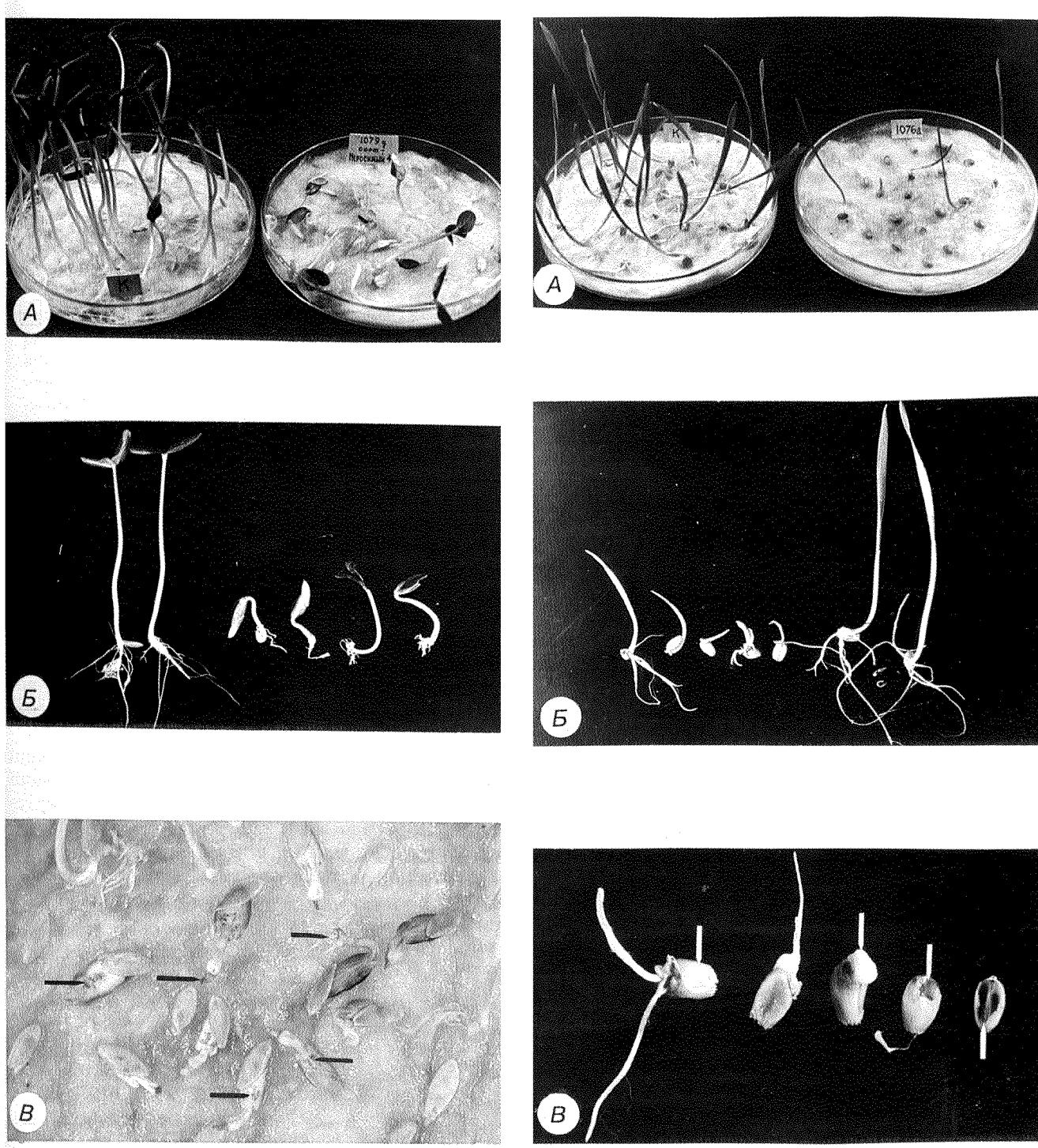


Рис. 2. Проростки огірків сорту Неросимий-40, одержані із штучно зараженої насіння *B. polyleuca*, 1079д: А — більшість насінин загнило, поодинокі проростки деформовані, карликіві; Б — деформовані проростки огірків з відмерлою кореневою системою. Зліва — контрольні неінфіковані рослини; В — уражені сім'ядолі огірків. Стрілками помічені відмерлі корінці, некротичні плями та виразки

Рис. 3. Проростки пшениці, одержані із інокульованих зерен *B. polyleuca*, 1076а: А — контрольні неінокульовані рослини (зліва), справа — більшість зерен не проросло і загнило; Б — недорозвинуті проростки з відмерлою кореневою системою (зліва) та контрольні рослини (справа); В — уражені зерна пшениці *B. polyleuca*. Стрілками помічені ексудат, що утворився, порожнини та виразки

Таблиця 3. Результати інфікування насіння пшениці штамами *Bacillus polymyxia*

Номери штамів, якими інфікували насіння	Одержано проростків				Гниле насіння	
	Всього		в тому числі деформованих			
	кількість	доля, %	кількість	доля, %	кількість	доля, %
Контроль (без обробки)	19	95	0	0	1*	5
1070б	4	20	1	5	16	80
1071а	8	40	4	20	12	60
1074г	18	90	1	5	2	10
1075б	13	65	2	10	7	35
1076а	4	20	2	10	16	80
1077г	15	75	2	10	5	25
1078д	17	85	0	0	3	15
1079д	7	35	1	5	13	65

* — зерно не загнило.

Кожним штамом інфіковано 20 зерен.

долях (рис. 4), та загнивання насіння були факультативно анаеробними, грамнегативними з перитрихальними жгутиками, пектиназо- та каталазопозитивними, оксидазонегативними, не редуктували нітрати, не виділяли індол, не гідролізували крохмаль і казеїн, не продукували уреазу, не розріджували желатин, утилізували нітрати та різні вуглеводи з виділенням кислоти, а на деяких цукрах і газу.

До роду *Escherichia* віднесені штами, які були непатогенними, або спричиняли незначний некроз кореневої системи огірків, за біохімічними властивостями близькі до бактерій роду *Erwinia*, але не утилізували сіль лимонної кислоти, редуктували нітрати, продукували індол, активно утилізували (через 20 год) 16 різних вуглеводів з виділенням великої кількості газу та кислоти.

Окрім названих вище бактерій, виділені непатогенні та слабо вірулентні штами, що спричиняли незначне ушкодження кореня та сім'ядолей (не-

кroz) і характеризувалися ознаками, які притаманні як ентеробактеріям, так і псевдомонадам. Штами продукували оксидазу, ацетоїн, уреазу, розріджували желатин, зсідали молоко, підкислювали з наступною редукцією лакмусову сироватку, редуктували нітрати, утилізували в аеробних та анаеробних умовах глюкозу та 15 інших вуглеводів з виділенням кислоти та великої кількості газу. Клітини грамнегативні, мали форму паличок з полярними джгутиками, спор не утворювали. За наведеними властивостями ці мікроорганізми подібні до бактерій роду *Aeromonas*. Вони не представляли загрози ураження рослин.

Таким чином, встановлено, що загиблі сіянці огірків в умовах космічного польоту на станції «Салют-6» були уражені фітопатогенними бактеріями. Найбільш агресивними являються штами, що продукують пектиназу і які за морфологічними та біохімічними властивостями віднесені до родів

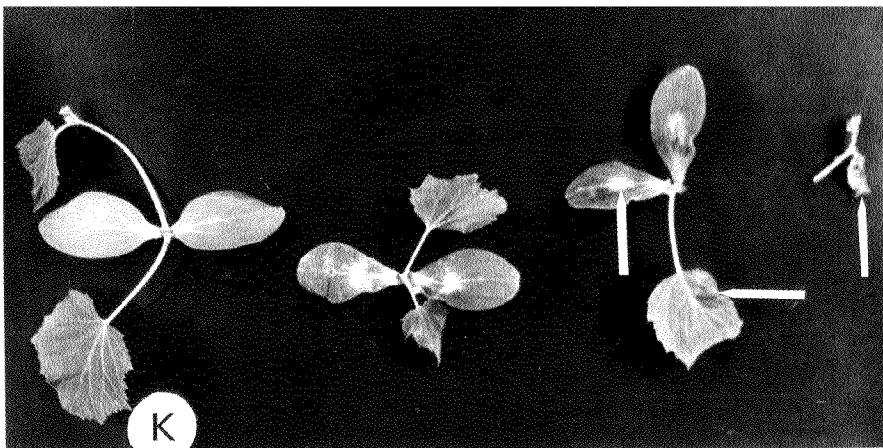


Рис. 4. Уражені плямистістю сім'ядолі та листя огірків внаслідок інокуляції насіння *Erwinia* sp. Зліва — неінфіковані контрольні рослини (К)

Bacillus, Pseudomonas та *Erwinia*.

Інші штами, умовно віднесені нами до родів *Escherichia* і *Aeromonas*, не причетні до загибелі рослин, хоч і спричиняли незначні ушкодження сіянців в експериментах.

Яким чином різноманітні бактерії, як патогенні, так і авірулентні, потрапили в систему вирощування огірків в умовах космосу, невідомо. Можливо, через насіння, оскільки ретельна дезинфекція не завжди знешкоджує інфекцію, яка може знаходитись під оболонкою насінини, або глибоко в її тканинах (Коробко, 1997).

Відомо, що збудники захворювань рослин потрапляють в космічні літаючі апарати з космічними кораблями, космонавтами, при доставці вантажу, через рослинну продукцію, а також насіння, попередня дезинфекція якого не гарантує звільнення від інфекції. Гіфальні гриби, дріжджі та бактерії різних таксономічних груп ізольовані із поверхні космічних кораблів, інструментів, води, повітря, харчів та від космонавтів. Більшість із цих мікроорганізмів притаманна людям в наземних умовах (Puleo et al., 1973; Nelson, 1987). Серед численних грибів та бактерій, виділених із поверхні космічних кораблів та від космонавтів є і фітопатогенні, а саме аскоміцети (рід *Leptosphaeria*), зигоміцети (роди *Mucor*, *Rhizopus*), дейтероміцети, (роди *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Phoma* та ін.) та бактерії родів *Pseudomonas*, *Bacillus* і *Corynebacterium* (Nelson, 1987). Оскільки космічні умови негативно не впливають на виживання, розмноження, морфологію, біохімічні ознаки, мутабельність досліджених енtero-бактерій, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. brevis* та збудника бактеріального раку рослин *A. tumefaciens* (Парфенов, 1988; Кордюм та ін., 1984), існує реальна можливість фітопатогенних мікроорганізмів спричинити ураження та загибель рослин, що і було показано нашими дослідженнями. Окрім встановлених джерел фітопатогенної інфекції, слід враховувати також те, що люди є носіями деяких бактерій, що спричиняють захворювання як людей, так і рослин (Starr, 1979; Гвоздяк, 1981). З іншого боку, існують фітопатогенні бактерії, зокрема роду *Erwinia*, спроможні уражувати теплокровні тварини (Коробко та ін., 1975), та продукувати ферменти патогенності (плазмоагулазу, гіалуронідазу, лецитиназу та гемолізувати еритроцити крові (Слабоспицька, Коробко, 1977). Наведені властивості мікроорганізмів повинні враховуватись в замкнених системах космічних польотів.

Таким чином, нами показана можливість ураження рослин в умовах космічних польотів бактеріями родів *Bacillus*, *Pseudomonas* і *Erwinia*.

Встановлений факт має бути врахованим при подальшій розробці технології вирощування рослин в регенеруючих системах довготривалих космічних польотах.

- Бельтюкова К. И., Матышевская М. С., Куликовская М. Д., Сидоренко С. С. Методы исследований возбудителей бактериальных болезней растений. — Киев: Наук. думка, 1968.—316 с.
- Гвоздяк Р. И. Полибиотрофия бактерий // Микробиол. журн.—1981.—43, № 2.—С. 256—262.
- Кордюм В. А., Нефедов Ю. Л., Кожариков В. И. и др. Особенности роста и строение клеток *Proteus vulgaris* при культивировании в невесомости в приборе «Питос» // Биологические исследования на орбитальных станциях «Салют» — М.: Наука, 1984.—С. 33—38.
- Коробко А. П. Обеззараживание семян капусты от возбудителей бактериозов // Микробиол. журн.—1997.—59, № 3.—С. 65—70.
- Коробко А. П., Гвоздяк Р. И., Лемещенко Г. П. Зоопатогенные свойства возбудителя сосудистого бактериоза огурцов // Фитопатогенные бактерии. — Киев: Наук. думка, 1975.—С. 88—95.
- Парфенов Г. П. Невесомость и элементарные биологические процессы // Проблемы космической биологии. — Л.: Наука, 1988.—Т. 57.—С. 12—169.
- Рубин Б. А., Ладыгина М. Е., Воронков Л. А. и др. Эксперименты с корончатыми галлами моркови. Физиологическое состояние опухолевой ткани, индуцированной *Agrobacterium tumefaciens* // Биологические исследования на биоспутниках «Космос». — М.: Наука, 1979.—С. 126—136.
- Слабоспицька А. Т., Коробко А. П. Изучение гемолитической, плазмоагулазной и гиалуронидазной активности бактерий рода *Erwinia* // Микробиол. журн.—1978.—40, № 6.—С. 727—730.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. — Baltimore, Hong-Kong, London, Sydney: Williams and Wilkins, 1986.—V. 2.—P. 1105—1139.
- Cowan S. T., Steel K. J. Manual for the identification of medical bacteria. — Cambridge, 1965.—217 p.
- Gibson T., Gordon R. E. Genus *Bacillus* // Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed. The Williams and Wilkins Company, 1974.—P. 529—550.
- Korobko A. P. Manual for study and identification of plant pathogenic bacteria. — Scientific Phytopathological Laboratory of the State Agro-Industrial Committe of the USSR. Ambo. Ethiopia, 1988.—200 p.
- Nelson B. The role of plant pathology in development of controlled ecological life support systems // Plant Disease.—1987.—71, N 7.—P. 580—584.
- Puleo J. R., Oxborrow G. S., Fields N. P., et al. Microbiological profiles of four Apollo spacecraft // Appl. Microbiol.—1973.—26, N 6.—P. 838—845.

BACTERIAL DISEASE OF CUCUMBERS IN SPACE-FLIGHT CONDITIONS

R. I. Gvozdiak, A. P. Korobko, and A. G. Azimtscev

Phytopathogenic bacteria of the *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Erwinia* genera have been isolated from the cucumber seedlings which perished in space-flight conditions. The species *Bacillus polymyxha* Cohn 1872 turned out to be the most virulent.