

**БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ИЗОЛЯТОВ РОДА AGROBACTERIUM,
ВЫДЕЛЕННЫХ В ТАДЖИКИСТАНЕ**

Х. И. БОБОДЖАНОВА, М. М. ДЖУРАЕВА

e-mail: hrustalnaia_maska@list.ru, bobojankh_7@bk.ru

Н. К. БИРКЕЛАНД

NO-5020, e-mail: nils.birkeland@uib.no

07.12.2023)

2022

19 2023

basic and applied microbiology)

CPEA-LT-2016/10095)

-based higher education in

biotechnology)

(Network for research-based higher education in microbial

Agrobacterium tumefaciens

CPEA-LT-2017/10061).

Agrobacterium (Rhizobium

Ключевые слова:

Research was carried out at the Biotechnology Center of the Tajik National University from 2018 to 2022 within the framework the creation of basic collections of healthy

2023 (state registration number 0119TJ00971); international projects: Network for improving research-based higher education in basic and applied microbiology for 2016–2019 (project number CPEA-LT-2016/10095) and Network for research-based higher education in microbial biotechnology for 2017–2021 (project number CPEA-LT-2017/10061).

Agrobacterium tumefaciens is the causative agent of rhizobiosis, characterized by the formation of growths and galls on the vine, necrotic changes in the leaves, and sometimes in the roots of grapes. As a result of epiphytic monitoring, we isolated the bacteria Agrobacterium spp. in the vineyards of the Gissar Valley of Tajikistan.

Bacterial canker of grapes is a dangerous disease that causes significant damage to agriculture. Regular phytosanitary inspection of vineyards, diagnosis and identification of the causative agent of bacterial cancer of grapes, development of preventive and control measures are the key to the successful development of industrial viticulture in the territory of the Republic of Tajikistan.

Analysis of material samples from grape seedlings from 15 regions of Tajikistan made it possible to isolate 104 isolates of different species and genera, of which 43 were selected for further characterization. As a result of biochemical differentiation of bacteria, seven isolates of Agrobacterium (Rhizobium) were isolated. The antibiotic sensitivity of the isolated isolates was assessed.

Key words: *bacterial cancer, grapes, isolates, antibiotics, sensitivity.*

Введение

Agrobacterium tumefaciens является возбудителем ризобииоза, характеризующегося, образованием наростов и галлов на виноградной лозе, некротическими изменениями листьев, а иногда корней винограда [1].

Вспышки ризобииоза в виноградарских хозяйствах регистрируются на территории Таджикистана с 2018 года [2, 3, 4, 5].

Для лечения и профилактики ризобииоза необходимо знать серовариантный состав циркулирующих штаммов и изолятов.

Цель работы: изучение биохимических свойств изолятов Agrobacterium spp., выделенных в неблагополучных по ризобииозу виноградарских хозяйствах на территории Таджикистана.

Основная часть

В работе использовали 104 изолята, среди которых идентифицированы семь изолятов, относящихся к роду Agrobacterium spp., выделенные в виноградарских хозяйствах Гиссарской долины Таджикистана.

Для культивирования использовали полуселективную питательную среду Рой и Сассера (RSM) [6], агар МакКонки, питательную среду Хью-Лейфсона, цитратный агар Симмонса; картофельный декстрозный агар, соевый агар с триптиказой, соевый агар с триптоном (TSA); соевый бульон с триптиказой, соевый бульон с триптоном (TSB) [7]. Морфологию бактерий изучали в фиксированных мазках, окрашенных по Граму [8].

Биохимические свойства изолятов определяли посредством высева на дифференциально-диагностические среды, содержащие соответствующие факторы роста и моносахара, с использованием микрообъемного анализатора API 20NE [9]. У выросших культур проводили тест на цитохромоксидазу, каталазу и способность к расщеплению глюкозы в анаэробных и аэробных условиях на среде Хью-Лейфсона (О/Ф тест) [7].

Для определения оксидазной активности в чашку Петри клали полоску фильтровальной бумаги, смоченную смесью реактивов на цитохромоксидазу, и платиновой петлей переносили часть испытуемой культуры на фильтровальную бумагу. В случае положительной реакции бактериальная масса становится синей, розовой или коричневой (в зависимости от используемого реактива).

Для проверки каталазной активности на поверхность чистого обезжиренного стекла наносили каплю 3%-ного раствора перекиси водорода и эмульгировали с небольшим количеством изучаемой культуры. При положительной реакции происходило вспенивание взвеси.

Для определения способности к расщеплению глюкозы в среде Хью-Лейфсона исследуемую культуру засеивали проколом до дна в пробирку с высоким столбиком среды (7–8 см), посевы инкубировали при температуре 25–26 °С в течение 24 часов. Ферментация начинается в нижних слоях среды, окисление – сверху.

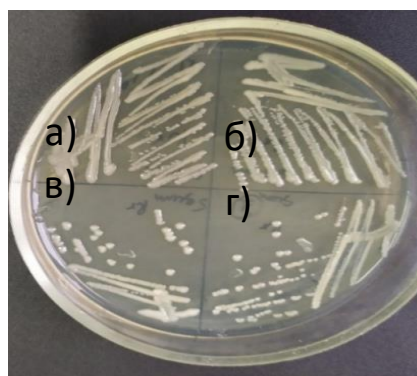
Ферментацию и газообразование учитывали на среде Хью-Лейфсона, подвижность – на среде TSA 0,5 % (неподвижные культуры растут строго по уколу, слабоподвижные – в виде основного стержня и боковых отростков, подвижные – вызывают помутнение всей среды). Окончательный учет результатов проводили на 4-й день. Чувствительность к антибиотикам проверяли с помощью теста диффузии диска Кирби-Бауэра [10].

Исследовали пробы патологического материала из виноградников Гиссарской долины Таджикистана. На основании дифференциальных сред и биохимического теста получено 104 изолята, из которых на среде Рой-Сассера отобрано 43 – для дальнейшей характеристики [5].

При дальнейшем бактериологическом анализе патматериала от растений разных возрастных групп, среди которых были здоровые, поражённые и погибшие экземпляры из неблагополучных виноградарских хозяйств Таджикистана – было выделено семь изолятов. Из которых один принадлежит к группе *Agrobacterium larrymoorei* и обозначен как *A. larrymoorei* LY1 [2]. Другие шесть изолятов принадлежат к *Agrobacterium tumefaciens* и обозначены – *A. tumefaciens* TUMOR 1, *A. tumefaciens* Soil 5, *A. tumefaciens* Soil 6, *A. tumefaciens* Fruit 8 [4, 5], *A. tumefaciens* Soil 22, *A. tumefaciens* Soil 23 [5]. Все изоляты по их потребностям к ростовым факторам отнесены к бактериям рода *Agrobacterium* (рис. 1).

На агаризованных питательных средах формируются выпуклые, круглые, гладкие непигментированные или слабо-бежевые колонии. На картофельном агаре – колонии приподнятые, влажно-блестящие, светло-бежевые. Край ровный, просвечивающий.

Выделенные микроорганизмы представляли собой мелкие грамтрицательные палочки в сочетании с кокковидными и единичными нитевидными формами.



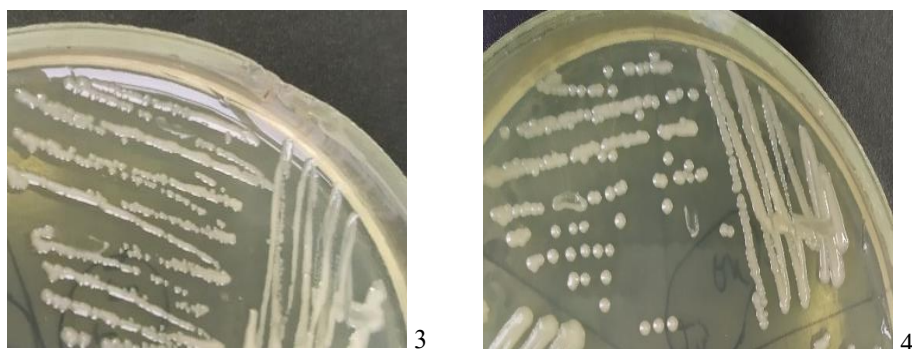


Рис. 1. Чашки Петри с выросшими колониями *Agrobacterium* spp. на соевом агаре с триптоном (TSA):
 1. *A. larrymoorei* LY1, 2. *Agrobacterium tumefaciens*: а) *A. tumefaciens* TUMOR 1, б) *A. tumefaciens* Soil 5,
 в) *A. tumefaciens* Soil 6, г) *A. tumefaciens* Fruit 8, 3. *A. tumefaciens* Soil 22, 4. *A. tumefaciens* Soil 23

Наиболее значимые биохимические свойства изолятов представлены в табл. 1. Видно, что по основным признакам выделенные изоляты соответствуют виду согласно определителю Берджи [11, 12] и определителю патогенных грамотрицательных бактерий [13].

Таблица 1. Биохимические свойства изолятов бактерий рода *Agrobacterium* spp.

Наименование теста	Биохимические свойства вида <i>Agrobacterium</i> по Берджи	Изоляты						
		LY1	TUMOR 1	Soil 5	Soil 6	Fruit 8	Soil 22	Soil 23
каталаза	+	+	+	+	+	+	+	+
оксидаза	+	+	+	+	+	+	+	+
3 % КОН	d	+	+	+	+	+	+	+
подвижность	–	–	–	–	–	–	–	–
восстановление нитратов до нитритов	+	–	–	–	–	–	–	–
восстановление нитратов до азота	–	d	+	–	–	+	+	+
L-триптофан	+	–	–	–	–	–	–	–
D-глюкоза	–	–	–	–	–	–	–	–
L-аргинин	–	–	–	–	–	–	–	–
мочевина	+	+	+	+	+	+	+	+
эскулин цитрат железа	+	+	+	+	+	+	+	+
желатин (бычьего происхождения)	–	–	–	–	–	–	–	–
4-нитрофенил-βD-галактопиранозид	+	+	+	+	+	+	+	+
D-глюкоза	+	+	+	+	+	+	+	+
L-арабиноза	+	+	+	+	+	+	+	+
D-манноза	+	+	+	+	+	+	+	+
D-маннит	+	+	+	+	+	+	+	+
N-ацетилглюкозамин	+	+	+	+	+	+	+	+
D-мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+
глюконат калия	+	+	+	+	+	+	+	+
каприновая кислота	–	–	–	–	–	–	–	–
адипиновая кислота	–	–	–	–	–	–	–	–
яблочная кислота	+	+	+	+	+	+	+	+
тринатрия цитрат	–	+	–	–	–	–	–	–
фенилуксусная кислота	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: «+» – положительная реакция, «–» – отрицательная реакция, «d» – варибельная реакция

В результате проведенного бактериологического анализа образцов почвы, растительного материала (плоды, листья, опухоли) выделены изоляты, которые по биохимическим свойствам идентичны и относятся к роду *Agrobacterium* spp.

Отмечено, что болезнетворный микроорганизм длительное время (в течение нескольких лет) находится и размножается (персистентный патоген) в растении винограда, не вызывая опухолей, пока не появятся условия, способствующие развитию заболевания. Болезнь развивается на многолетней и однолетней древесине виноградного куста, как правило, в местах повреждений (механические, морозобоины) (рис. 2).



Рис. 2. Растение винограда, пораженное бактериальным раком [3]

В табл. 2 представлены результаты определения чувствительности изолятов *Agrobacterium* spp. к антибиотикам.

Таблица 2. Результаты определения чувствительности изолятов *Agrobacterium* spp. к антибиотикам

Антибиотики	Чувствительность, мм	Изоляты						
		1	2	3	4	5	6	7
Amoxicilin 25µg	R≤19 S≥20	S	S	R	S	S	R	S
Amoxicilin + Clavulanic acid 20/10	R≤18, I 14-17, S≥13	S	S	S	S	S	S	S
Piperacillin 30µg	R≤17, I 18-20, S≥21	S	R	S	I	S	R	I
Ticarcillin 75µg	R≤22, S≥23	S	S	S	S	S	S	R
Ticarcillin + Clavulanic acid 85µg	R≤22, S≥23	S	S	S	S	S	S	S
Apicilillin+ Sulbactam 10/10	R≤14, S≥15	S	S	S	S	S	S	S
Cefotaxim 30µg (III generation)	R≤23, I 24-29, S≥30	S	I	S	I	S	R	S
Cefazolin 30µg (I generation)	R≤14, I 15-17, S≥18	S	S	S	S	S	R	S
Cefepime 30µg (IV generation)	R≤26, I 27-31, S≥32	R	R	R	R	R	R	R
Cefoxitin 30µg (II generation)	R≤21, S≥23	S	S	R	R	S	R	S
Aztreonam 30µg	R≤22, I 23-27, S≥28	S	I	I	R	I	R	R
Imipenem 10µg	R≤16, I 17-20, S≥21	S	S	S	S	S	S	S
Doripenem 10µg	R≤18, I 19-23, S≥24	S	S	S	S	S	S	S
Gentamycin 30µg	R≤12, I 13-14, S≥15	S	S	S	S	S	S	S
Netilmicin 10µg	R≤13, S≥14	S	R	R	R	R	R	R
Tobramycin 10µg	R≤17, I 18-20, S≥21	S	R	R	R	R	R	R
Levofloxacin 5µg (III generation)	R≤15, I 16-18, S≥19	S	S	S	S	S	S	S
Doxycycline 30µg	R≤12, I 13-15, S≥16	S	S	S	S	S	S	S
Tetracycline	R≤4, I 15-18, S≥19	S	S	R	S	S	S	S
Colistine sulphate 10µg	R≤10, S≥11	S	S	S	S	S	S	S

Примечание: S – чувствительный; R – слабо чувствительный; I – устойчивый.
Изоляты: 1 - *A. larrymoorei* LY1; 2 - *A. tumefaciens* TUMOR 1; 3 - *A. tumefaciens* Soil 5; 4 - *A. tumefaciens* Soil 6; 5 - *A. tumefaciens* Fruit 8; 6 - *A. tumefaciens* Soil 22; 7 - *A. tumefaciens* Soil 23.

В результате проведённых исследований показано, что все полученные изоляты чувствительны к 10 из 20 исследованных антибиотиков, а именно: Amoxicilin + Clavulanic acid 20/10; Ticarcillin + Clavulanic acid 85µg; Apicilillin + Sulbactam 10/10; Imipenem 10µg; Doripenem 10µg; Gentamycin 30µg; Levofloxacin 5µg (III generation); Doxycycline 30µg; Tetracycline и Colistine sulphate 10µg.

На примере изолята *A. larrymoorei* LY1 выявлена чувствительность к 19 антибиотикам и слабая чувствительность к антибиотику Cefepime 30µg (IV generation) из 20 исследованных антибиотиков.

Из семи полученных изолятов четыре показали устойчивость к одному или другому антибиотику: *A. tumefaciens* TUMOR 1 (Cefotaxim 30µg (III generation), Aztreonam 30µg), *A. tumefaciens* Soil 5 (Aztreonam 30µg), *A. tumefaciens* Soil 6 (Piperacillin 30µg, Cefotaxim 30µg (III generation)) и *A. tumefaciens* Fruit 8 (Aztreonam 30µg).

На рис. 3 представлены тесты определения чувствительности к антибиотикам у выделенных изолятов *Agrobacterium*.

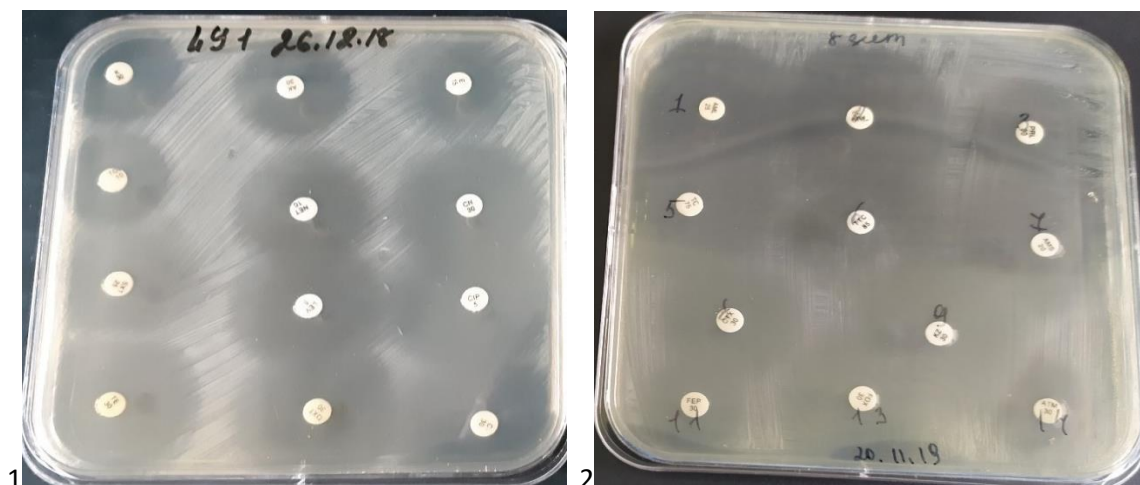


Рис. 3. Чувствительность к антибиотикам различных агробактерий, выделенных из саженцев винограда
1 – *A. larrymoorei* LY1; 2 – *A. tumefaciens* Fruit 8

Выявление чувствительности семи выделенных изолятов к антибиотикам с помощью теста диффузии диска Кирби-Бауэра показало, что исследуемые культуры в основном чувствительны к тестируемым антибиотикам, в тоже время отмечен ряд изолятов, характеризующихся слабой чувствительностью либо устойчивостью к отдельным антибиотикам.

Бактериальный рак винограда является опасным заболеванием, которое наносит существенный ущерб сельскому хозяйству. Регулярное фитосанитарное обследование виноградников, диагностика и идентификация возбудителя бактериального рака винограда, разработка профилактики и мер борьбы – залог успешного развития промышленного виноградарства на территории Республики Таджикистан.

Заключение

Таким образом, в результате проведенных исследований проб патматериала от саженцев винограда из 15 регионов Таджикистана выделено семь изолятов *Agrobacterium* (*Rhizobium*). Проведена биохимическая дифференциация исследованных изолятов *Agrobacterium* spp. Дана оценка чувствительности к антибиотикам выделенных изолятов, которая показала разный уровень чувствительности к используемым препаратам. В дальнейших исследованиях необходимо проверить антагонистическую активность выделенных изолятов по отношению к патогенным штаммам для предупреждения вторичного заражения здоровых растений винограда из почвы. Этот метод может быть включён в технологию посадки саженцев винограда на постоянное место для предупреждения развития ризобииоза. Наряду с термотерапией виноградной лозы в сочетании с вакуум инфильтрацией и без неё.

1. Burr TJ, Katz BH. 1983. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3 from grapevine galls and sap, and from vineyard soil. *Phytopathology* 73:163–165. <http://dx.doi.org/10.1094/Phyto-73-163>.

2. Dzhuraeva M. M., Bobodzhanova Kh. I., Tediashvili M., Bierkeland N-K., Jaiani E. G. Isolation and identification of *Agrobacterium* from the territory of Tajikistan. Материалы международной научно-практической конференции Биотехнология микроорганизмов, посвященной профессору Ю.К.Фомичеву (1929-2015). 27-29 ноября, 2019. Минск, Беларусь. С.236–329.

3. Бободжанова, Х. И. Биотехнологические основы создания ампелогографической коллекции и размножения сортов винограда в Таджикистане / Х. И. Бободжанова. – Душанбе: Эр-граф, 2022. – 240 с.

4. Dzhuraeva M., Bobodzhanova Kh., Javier-Lopez R., Tediashvili M., Jaiani E., Birkeland N-K. Draft Genome Sequence of *Agrobacterium radiobacter* Strain MD22b, Isolated from a Grape Plant in Tajikistan. *Microbiology Resource Announcements*. 2023. – Volum 12. Issue 4- P e01131-22. <https://journals.asm.org/journal/mra>

5. Dzhuraeva M. M., Birkeland N-K., Bobodzhanova K. I. Analysis of the pathogenic *Agrobacterium radiobacter* genome sequences isolated from grapes in Tajikistan. Вестник БГСХА Республики Беларусь, №1, 2023. – С. 64 – 67.

6. Roy M., Sasser M. 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biovar 3. *Phytopathology*. 73: 810.

7. Breed, R. S., Murray, E.G.D., Smith, N.R. 1957 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp., 288–294.

8. Нетрусов А. И. Общая микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, И. Б. Котова. – Москва: Академия, 2007. – 220 с.

9. Инструкция: API 20 NE – Набор для идентификации неприхотливых грамотрицательных аэробных/микроаэрофильных. https://omb.ru/products/api_20_ne_nabor_dlya_identifikatsii_neprikhotlivykh_gramotritsatelnykh_aerobnykh_mikroaerofilnykh_pa/

10. Kirby-bauer disk diffusion susceptibility test protocol archived 26 June 2011 at the wayback machine, Jan Hudzicki, ASM.

11. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта. - М.: Мир, 1997.-Т. 1. – 432 с.

12. Определитель бактерий Берджи: В 2 т. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта. - М.: Мир, 1997. – Т. 2. – 368 с.

13. Вейант Р., Мосс У., Холлис Д., Кук Э., Уивер Р., Джордан Дж., Дейншвар М. Определитель нетривиальных патогенных грамотрицательных бактерий. – М.: Мир, 1999. – 500 с.