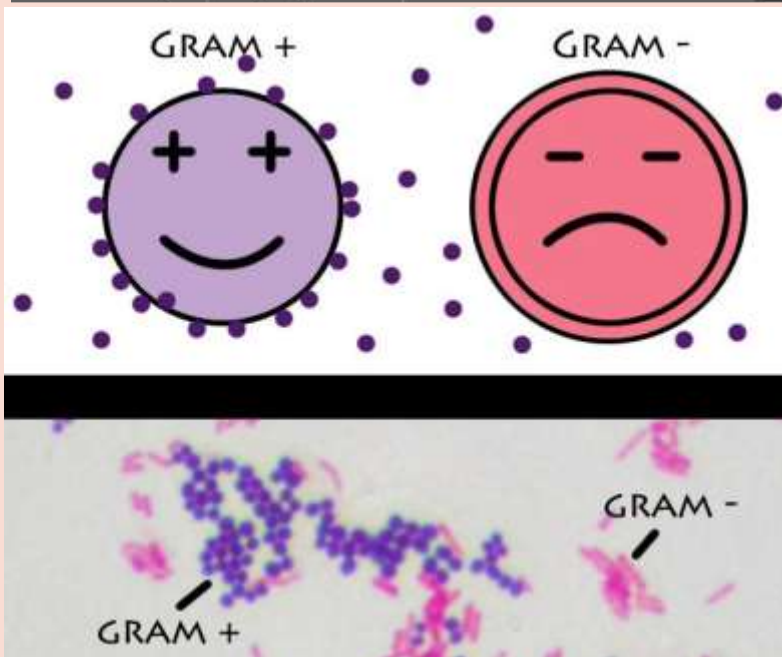
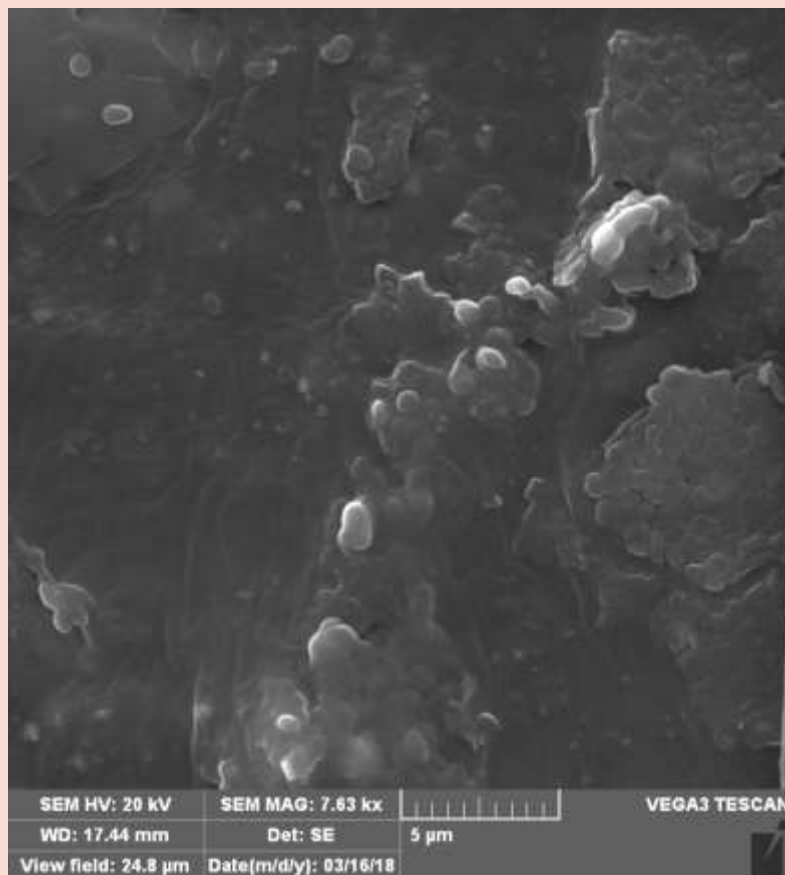


БАКТЕРИОЛОГИЈА - практикум -



Саша Митрев; Емилија Арсов

БАКТЕРИОЛОГИЈА
– практикум -

Автори:

проф. д-р Саша Митрев, доц. д-р Емилија Арсов

БАКТЕРИОЛОГИЈА

Рецензенти:

проф. д-р Душан Спасов, доц. д-р Билјана Ковачевиќ

Лектор:

Бисерка Токовска-Стевчевска

Уредник:

Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Техничко уредување:

Емилија Арсов

Издавач:

Универзитет „Гоце Делчев“ - Штип

Објавено во е-библиотека:

<https://e-lib.ugd.edu.mk>

CIP - Каталогизација во публикација
Национална и универзитетска библиотека "Св. Климент Охридски", Скопје

579(076)

МИТРЕВ, Саша

Бактериологија [Електронски извор] : практикум / Саша Митрев,
Емилија Арсов. - Штип : Универзитет "Гоце Делчев"-Штип, Земјоделски
факултет, 2018

Начин на пристап (URL): <https://e-lib.ugd.edu.mk/793>. - Текст во PDF
формат, содржи 69 стр., илустр. - Наслов преземен од екранот. - Опис на
изворот на ден 28.12.2018

ISBN 978-608-244-594-6

1. Арсов, Емилија [автор]

а) Бактериологија - Практикуми

COBISS.MK-ID 109276426

УНИВЕРЗИТЕТ „ГОЦЕ ДЕЛЧЕВ“ – ШТИП
ЗЕМЈОДЕЛСКИ ФАКУЛТЕТ



Саша Митрев, Емилија Арсов

БАКТЕРИОЛОГИЈА
– практикум -

Штип, 2018 година

ПРЕДГОВОР ОД АВТОРИТЕ

Почитувани студенти корисници на практичното помагало Бактериологија – практикум,

Практикумот по Бактериологија е наменет за делот од вежбите по предметот Бактериологија, за студентите од прв циклус на студии на Земјоделскиот факултет, како и за студентите на студиска програма Биологија, за да може практично со лабораториска работа и записи од истата, своето знаење да го продлабочат во областа на фитобактериологијата.

Значењето на фитопатогените бактерии во едно земјоделско производство е огромно, па затоа мора да се посвети посебно внимание на оваа група паразитни микроорганизми, кои особено се интересни за практична лабораториска работа.

Содржината во практичното помагало ја надополнува наставната содржина за предметот Бактериологија, но со многу теренски и практични лабораториски примери, кои се повторливи за студентите. Овој лабораториски прирачник е напишан за да им помогне на студентите во изолација на фитопатогените бактерии.

Од авторите

СОДРЖИНА

ВЕЖБА 1. Особини на фитопатогените бактерии	8
ВЕЖБА 2. Методи за изолација на фитопатогените бактерии	11
ВЕЖБА 3. Современо проучување на фитопатогените бактерии (нови методи)	17
ВЕЖБА 4. Биохемиско-физиолошки карактеристики за идентификација на фитопатогените бактерии	24
ВЕЖБА 5. Дијагностички подлоги и тестови за идентификација на бактериите	29
ВЕЖБА 6. Дијагностички тестови за идентификација на видот на фитопатогените бактерии	38
ВЕЖБА 7. Основни принципи за серолошка детерминација на фитопатогените бактерии	42
ВЕЖБА 8. Серолошки тестови за детерминација на бактериите	45
ВЕЖБА 9. Бактериофаги на фитопатогените бактерии	48
ВЕЖБА 10. Патогенеза на бактериозите (настанување на болестите)	55
ВЕЖБА 11. Влијание на еколошките фактори врз патогенезата	60
ВЕЖБА 12. Биотски фактори за настанување на болест кај растенијата	64
КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА	67

ВЕЖБА БР. 1

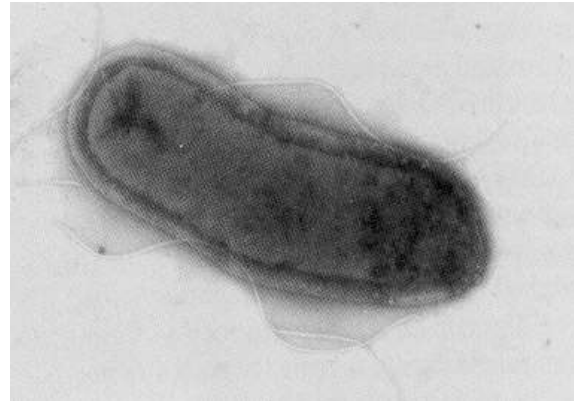
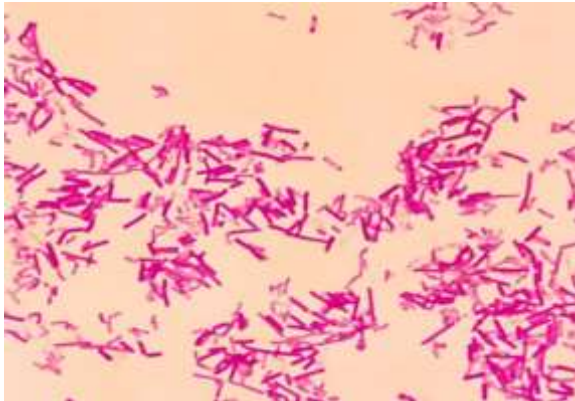
ОСОБИНИ НА ФИТОПАТОГЕНИТЕ БАКТЕРИИ

Фитопатогени бактерии - името го добиле од зборовите *phyton* - растение, *pathos* – болест, *genein* – предизвикува и *bacteria* – бактерија, што во превод би значело бактерии кои предизвикуваат болести кај растенијата.

Болестите кои фитопатогените бактерии ги предизвикуваат со својата активност ги нарекуваме **бактериози**.

Фитопатогените бактерии се состојат од една клетка која е видлива под обичен светлосен микроскоп со: а) микробиолошка техника на боене според Грам или б) електронски микроскоп (слика 1 а и б). Тоа се нижи растителни организми без хлорофил. Се исхрануваат хетеротрофно бидејќи немаат способност сами да синтетизираат органска материја, туку користат готова храна од други организми.

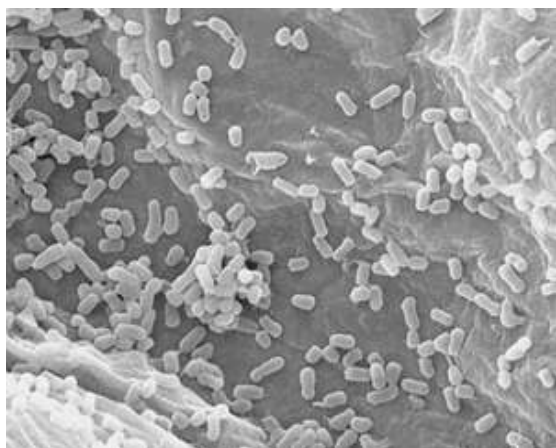
Сите фитопатогени бактерии имаат стапчест облик. Се размножуваат со проста делба, кога од една мајчинска клетка се добиваат две клетки ќерки.



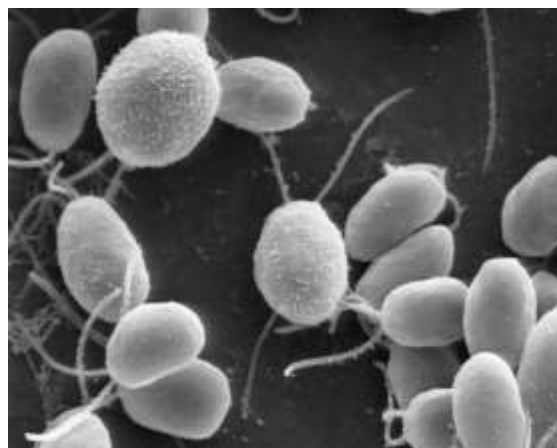
Слика 1. а) фотографија под светлосен микроскоп (*Agrobacterium tumefaciens*)
б) изглед на бактерија под електронски микроскоп (*Agrobacterium tumefaciens*)

Се смета дека во период од 24 часа, од една клетка може да се намножат околу 17 000 000 нови единици. Вака огромен паразитен потенцијал кој се создава за толку кратко време ја објаснува појавата на изненадните епифитоциии на бактериозите, кои понекогаш настануваат за неколку дена.

Големината на бактериите се движи во границите од 0,5 - 4,5 x 0,3 - 0,6 μm (микрометри). Поголем дел од бактериите се подвижни, додека мал дел се неподвижни (слика 2 а). Нивната подвижност ја овозможуваат цилиите чии распоред може да биде различен и има таксономско значење (2 б, в, г).



а)



б)



в)



г)

Слика 2. а) изглед на бактериски клетки без флагели за движење (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) - атрихи

б) монотрихи – со една флагела на едниот пол

в) лопотрихи – неколку цилии на едниот пол кај *Pseudomonas marginalis*

г) перитрих распоред на флагели (цилии) за движење пр. кај *Erwinia amylovora*

ПРАКТИЧНА ВЕЖБА:

1. Според распоредот на флагелите или цилиите на телото на бактериската клетка, шематизирај според зададеното:

А. Атрихи

Б. Монотрихи

В. Лофотрихи

Г. Амфитрихи

Д. Перитрихи

2. Нацртај бактериска клетка со нејзините составни компоненти

Изглед на бактериска клетка:	Легенда:
------------------------------	----------

Потпис на предметниот асистент за изработената вежба: _____

ВЕЖБА БР. 2

МЕТОДИ НА ИЗОЛАЦИЈА НА ФИТОПАТОГЕНИТЕ БАКТЕРИИ

ПРАКТИЧНА РАБОТА: ИЗОЛАЦИЈА НА БАКТЕРИИТЕ

Рецептура за подготовка на хранлив медиум - Одгледувачките одлики на добиените изолати се испитувани на неколку подлоги кои многу се користат во фитобактериологијата. Користените подлоги се разлеани по 150 - 200 ml во стаклени колби (ерленмаери) и се стерилизирани со влажен процес (автоклавирање). За оваа цел се користени следниве подлоги:

- 1) **Стандардна месопептонска (NA) подлога** (резултатите од изолацијата се прикажани на слика 3 а, б и в, и слика 4):

месен екстракт	1,0 g
екстракт од квасец	2,0 g
пептон (бактериски-1)	5,0 g
NaCl	5,0 g
агар	15,0 g
дестилирана вода	1 000 ml
pH 7.2 - 7.4	

- 2) **Модифицирана подлога со екстракт од квасец и декстроза (YDCA):**

екстракт од квасец	10,0 g
декстроза	20,0 g
CaCO ₃	20,0 g
агар	15,0 g
дестилирана вода	1 000 ml
pH 7.2	

- 3) **Месопептонска подлога обогатена со 5 % сахароза (NAS):**

месен екстракт	1,0 g
екстракт од квасец	2,0 g
пептон (бактериски-1)	5,0 g
сахароза	50,0 g
NaCl	5,0 g
агар	15,0 g
дестилирана вода	1 000 ml
pH 7.2 - 7.4	

4) **Кингова подлога Б (King B):**

протеаза пептон	20,0 g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	6,0 g
глицерол	15,0 g
агар	15,0 g
дестилирана вода	1 000 ml
pH 7.4	

5) **Месопептонска подлога со глицерин**

Се користи најмногу за идентификација на бактериите од родот *Pseudomonas*, главно за изолација и други лабораториски цели, како и за одржување на бактериите. Се состои од 0,8 % хранлив раствор, 2 % глицерин и 2 % агар.

6) **Изменета подлога со екстракти од квасец и декстроза**

Содржи екстракти од: 10 g квасец, 5 g декстроза, 20 g $CaCO_3$ и 15 g агар. Оваа подлога се применува за добар развој на видовите од родот *Erwinia*, како и за развојот на розов и син пигмент.

7) **Подлога од глюкоза, екстракти од квасец и $CaCO_3$**

Содржи 5 g глюкоза, 5 g екстракти од квасец, 40 g $CaCO_3$ и 15 g агар. Се користи за изолација на бактериите и за следење на нивниот успешен раст и развој.

8) **Подлога од екстракти од квасец, декстроза и $CaCO_3$**

Слична е со претходната подлога и содржи 10 g екстракти од квасец, 20 g декстроза, 20 g $CaCO_3$ и 15 g агар.

Сите подлоги се разливаат во стаклени петриеви кутии со пречник од 9 cm. Засејувањето се врши со помош на бактерииска еза, користејќи трократно разредување на колониите на предметно стакло.

За секој изолат се користат по три петриеви кутии од секоја подлога. Засеаните подлоги се чуваат во термостат во текот на три дена при температура од 27 °C.

9) **Подлога за изолација на бактериофагите**

За добивање на бактериофагите во лабораториски услови, потребна е комбинација од 1,5 % пептин, 0,3 % екстракти од квасец, 2 % глицерин и 0,8 % агар.

10) **Подлога од сахароза и казеин**

Содржи 10 g сахароза, 8 g казеин, 4 g екстракти од квасец, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и 15 g агар специфична подлога која се користи за изолација на бактерии од родот *Corynebacterium*.

11) Подлога од сахароза и пептин

Содржи 20 g сахароза, 5 g пептин, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g агар со подесување рН на подлогата 7,2. Се користи за изолација, како и за идентификација на различни колонии на бактериите од родот *Xanthomonas*.

12) Цврста и течна подлога со екстракти од квасец и неорганска сол

Содржи 5 g екстракти од квасец, 0,5 g $NH_4H_2PO_4$, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ и 5 g NaCl. Како течна подлога се користи како основна подлога за голем број биохемиски тестови и испитувања на толеранцијата на бактериите на NaCl. Со додавање на 15 g агар се добива цврста подлога која се користи за растење и развој на повеќе видови бактерии.

13) Логанова подлога за диференцијација на видови од родот *Erwinia*

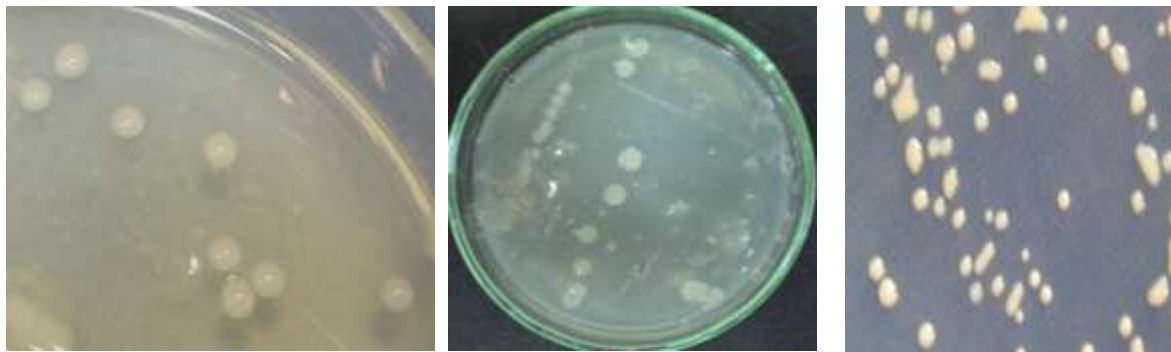
Содржи 28 g хранлива подлога, 5 g екстракти од квасец и 5 g глюкоза. По стерилизацијата, подлогата се лади на 60 °C и се додава 10 ml филтриран раствор 2,3, 5 три фенил тетразолиум хлорид. Засејувањето се врши на сува подлога во петриева кутија.

- Во случај на изолација и развој на бактеријата *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (по старата номенклатура позната како *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*), настанува редукција на тетразолиумот до нерастворен црвен формазан, а колониите имаат розов до црвено виолетов центар. Поединечни колонии *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* остануваат необоени и со помал пречник од 0,5 mm. Колониите на *Erwinia carotovora* subsp. *chrysanthem* се темно црвени до виолетови;
- Според јапонски автори на Логановата подлога, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* образува црвени и сини колонии по 48 часа од развојот, со што се разликува од *E. c. subsp. carotovora* и *E. c. subsp. chrysanthem*. При изолација на *E. c. subsp. carotovora* на оваа подлога се создаваат црвени крупни колонии, а *E. c. subsp. chrysanthem* секогаш создава крупни темни црвеновиолетови колонии.

Во фитобактериолошките лаборатории се користат и други подлоги наменети за развој, одржување или изолацијата на бактериите, како на пример подлога за одржување на *Pseudomonas* spp, за изолирање на *P. cichorii*, како и подлоги за развој на бактериите од родот *Xanthomonas*.

Селективните подлоги, како и подлогите кои служат за идентификациски цели, можат да се подготват и да се чуваат подолго време во фрижидер на одржување (4 °C). Првите овозможуваат успешна изолација на некои патогени форми на бактерии, а вторите служат за брзо одредување на таксономската припадност на поединечни бактерии.

Секоја подлога кога ќе се подготви, задолжително се стерилизира со процес на влажна стерилизација, на температура од 121 °C во времетраење од 20 мин.

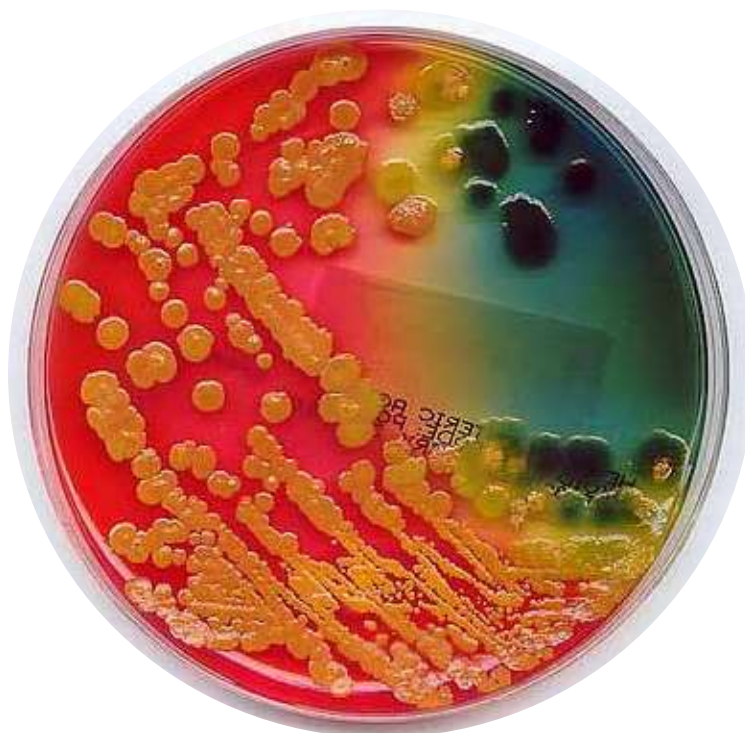


Слика 3. Изглед на бактериски колонии на хранлива подлога

Слика 3а. Изглед на колонии (мазни, сјајни, белузникави, топчести) од *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (причинител на влажно гниење кај пиперката) – на NaS-медиум

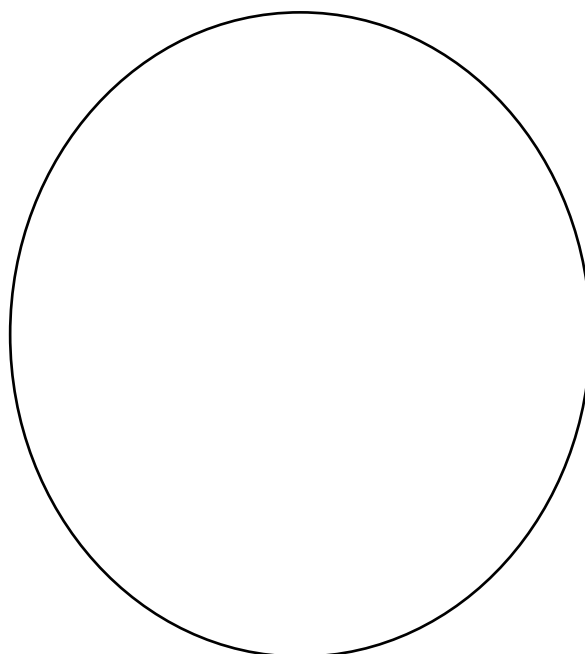
Слика 3б. Изглед на колонии (сјајни, бледо жолтеникави до крем, со рапави краеве на колонијата) од *Pseudomonas mediterranea* (бактериска некроза на срцевината на домати) – на Na-медиум

Слика 3в. Изглед на колонии (жолтеникави, разлиени, мазни, сјајни) од *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (бактериски рак кај доматиот) – на Na-медиум



Слика 4. Обоеност на колониите и на подлогата како резултат на пигментната активност на одредени видови патогени бактерии (изолација на стандардна месопептонска подлога Na – nutritient agar – хранлив агар)

3. Приготвување на микроскопски препарати, микроскопирање и запис на прегледот на видното поле



Потпис на предметниот асистент за изработената вежба: _____

ВЕЖБА БР. 3

СОВРЕМЕНО ПРОУЧУВАЊЕ НА ФИТОПАТОГЕНИТЕ БАКТЕРИИ
(НОВИ МЕТОДИ)

Морфолошки и одгледувачки карактеристики

Морфолошките карактеристики, покрај едноставната градба на бактеријата, имаат ограничено значење при идентификација на овие паразитни форми на микроорганизми. Но сепак, нивните својства како што се: поседување распоред на цилии или отсуство на овие флагели за движење, боење според Грам, присуство или отсуство на спори се важни карактеристики кои можат корисно да послужат за одредување на видот на патогенот.

Исто така, според основните одгледувачки карактеристики, изгледот и бојата на колониите, флуоресценција и др., може да се претпостави за кој вид се работи. Така, според литературни и наши сознанија од лабораториски услови, на вештачка подлога, родот *Xantomonas* создава колонии со жолта боја, а претставниците од родот *Pseudomonas* бело-сиви колонии. Родовите *Agrobacterium* и *Erwinia* формираат снежно бели колонии, а видот *Corynebacterium* пастално жолти колонии.

LOPAT-тестови

Биохемиско-физиолошките, како и другите лабораториски методи, денес се усовершени и модернизирани, и како такви се стандардизирани во сите светски лаборатории во кои се проучуваат бактериите на едно високо и квалитетно ниво.

Во употреба се т.н. LOPAT-тестови кои ги содржат следниве 5 реакции:

- **Levan production** (Производство на Леван);
- **Oxidase activity** (Активност на оксидаза);
- **Potato rot** (Гниење на компирот);
- **Arginine dihydrolase activity** (Метаболизам на аргининот);
- **Tobacco hypersensitivity reaction** (Хиперсензибилна реакција на тутунот).

Терминот „LOPAT“ претставува скратеница и потекнува од првите букви (акроним) што претставува реакција што е карактеристична за претставниците од родот *Pseudomonas*. Некои од овие тестови се користат и за проучување на бактериите од другите родови.

ПРАКТИЧНА ВЕЖБА:

- **Производство на Леван**



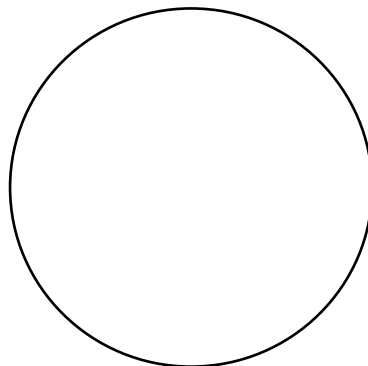
Легенда:

Слузесто буен развој на подлога со 5 % сахароза, каде што имаме пораст на испупчени бактериски колонии (слика 5).

Производството на Леван од страна на фитопатогените бактерии се следи во подлога на основен развој, односно изгледа како колонија на засејани бактерии. Изгледот на колониите се гледа по 2 до 3 дена од развојот во петриеви кутии на хранлива подлога со 5 % сахароза.

Слика 5. Развојот на бујна, бела и слузеста конвексна колонија, покажува позитивна реакција (Леван +)

**Изолација на бактерии на подготвениот хранлив медиум збогатен со сахароза /
опис на добиените резултати**



Изглед на добиените колонии

- Активност на оксидаза



Слика 6а. Стерилна филтерна хартија со проверка на тестот



Слика 6б. Оксидаза позитивна / негативна реакција

Начин на работа:

Се користи стерилна филтерна хартија во петриеви кутии и во центарот на таа хартијата се капнуваат неколку капки 1 % воден раствор

tetramethyl-p-phenylenediamine (тетраметил -пара - фенилендиамин) (целото име на соединението: NNN'N'-tetramethyl-p-phenylene-diamine-dihydrochloride (слика 6а).

Со помош на платинска еза се зема еден полн зафат од колониите стари 20 до 24 часа, развиени на коса подлога, и потоа се пренесуваат на филтер-хартијата во капката од водениот раствор.

Кога имаме позитивни реакции, во делот каде што сме ги ставиле колониите, добиваме темно виолетово обојување за време од 5 до 10 секунди. Лажно позитивна реакција може да настане доколку се употреби метална еза бидејќи Fe²⁺ јоните ќе изреагираат со оксидациониот реагенс (tetramethyl-p-phenylenediamine).

Истиот тест може да се повтори со стерилни стапчиња со вата на самиот врв, со потопување на врвот во 1 % воден раствор tetramethyl-p-phenylenediamine, а потоа следи допир на бактериската колонија за проверка на активноста на оксидазата (слика 6б).

Слабо позитивни реакции се појавуваат за време од 30 до 40 секунди.

Растворот од тетраметил парафенилен дианин дихлор хидрат треба да се чува во фрижидер, во затворен стаклен сад Тој треба да се чува во темно, а доколку е изложен на светло, реагенсот ја менува бојата и ја губи својата осетливост.

Практична вежба: Направете проверка на тестот за активност на оксидазата според горенаведениот пример од свежи (24 часовни) бактериски колонии

Краток опис на практичната постапка на работа

- Гниење на плочки од компир

Се користат чисти, излупени кртоли од компир што попречно се сечат на помали кругови, со дебелина од 7 до 8 mm. Вака подготвените плочки од компир се поставуваат во петриевии кутии во кои е поставена стерилна филтерна хартија натопена со дестилирана вода. На плочките од компир се прават неколку вдлабнувања кои се полнат со бактериска суспензија, со помош на пастерова пипетка.

Секогаш се поставуваат петриевии кутии со плочки компир кои служат како контрола, а тестот е позитивен ако површината на парчиња компир целосно омекне за време од 3 дена по инокулацијата со бактериска суспензија (слика 7).

За стерилните плочки компири (негативна контрола со дестилирана вода), гниењето / состојбата на плочките од компир се следи по 24 часа (плочките остануваат цврсти и здрави).



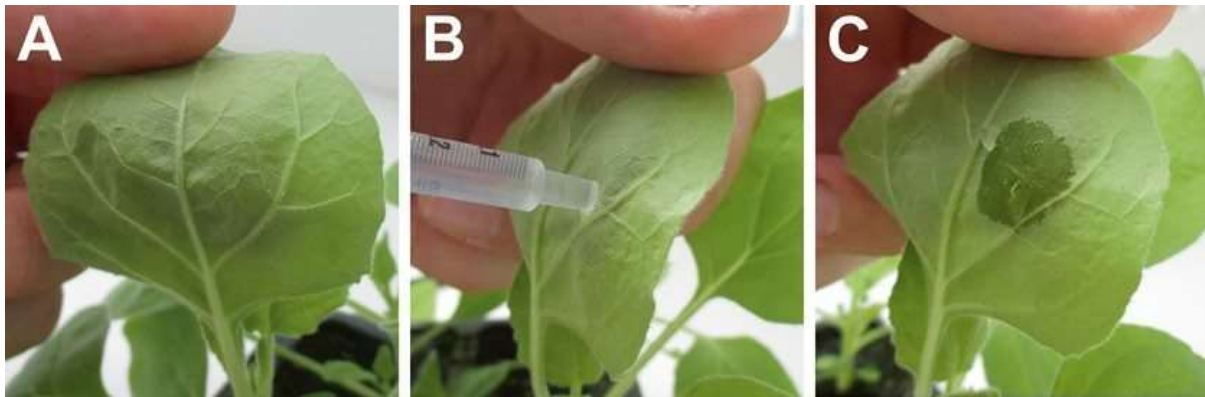
Слика 7. Гниење на плочки компир инокулирани со *E. c. subsp. carotovora*

Краток опис на практичната постапка на работа

- Хиперсензибилна реакција на тутунот

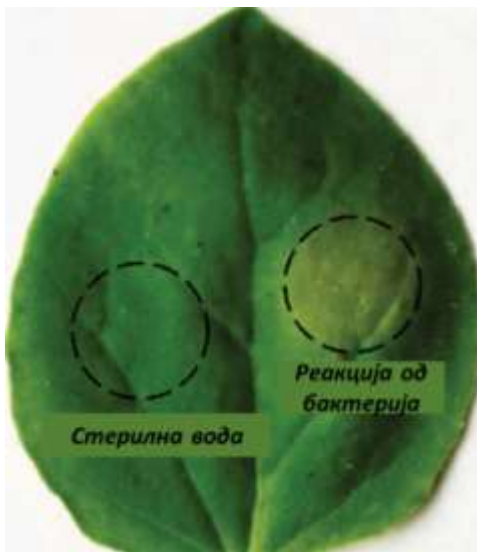
Најчесто тест-растение за проверка на хиперсензибилната реакција е тутунот (*Nicotiana tabacum* cv. *Samsun*). Се прави инокулација на листовите со помош на медицински шприц и игла, се инокуира бактеријата со концентрација од 10^7 клетки/ml (во зима) или 10^8 до 10^9 клетки/ml (во лето) (слика 8). Инокулираните растенија се одржуваат под стакленички (контролирани) услови.

Во случаите каде што се користи поголема концентрација од бактериската суспензија, тестот треба да се изврши најмалку во едно повторување.



Слика 8. Чекори на инокулација на листови од тутун со бактериска суспензија
А. Листот се поставува на дланката со опачината кон лицето на аналитичарот
В. Инокулација со медицински шприц и игла
С. Навлезена бактериска суспензија во листот

Добиените резултати од тестот се следниве: се разликуваат некрози од инокулирани ткива како знак на позитивна реакција и се појавува жолта боја која ја причинуваат некои сапрофити (слика 9). Сапрофитните бактерии тогаш причинуваат гниење и некои фитопатогени бактерии што не причинуваат хиперсензибилна реакција со употреба на концентрација 10^8 клетки/ml, повторно се тестираат со поголема концентрација од 10^{10} до 10^{12} клетки/ml.



Слика 9. Хиперсензибилна реакција на тутунот

Со повторување на тестот, по 24 – 48 часа се појавуваат резултатите од хиперсензибилната реакција кај листовите на тутунот. Жолти дамки како резултат на деградација на хлорофилот се знак за позитивна хиперсензибилна реакција. Секогаш како негативна контрола се користи стерилна вода, на кое место на инокулација нема појава на симптом на пожолтување (слика 9).

- Проверка на патогеност

Издвојување на бактериите во чиста култура и испитување на нивните морфолошки и одгледувачки особини, без проверка на патогеноста на добиените изолати, претставува само почетна фаза на следните постапки кои се неопходни за конечна идентификација на паразитот до видовото име на бактериите.

Патогеноста како основно својство ни докажува само на тоа дали културата е паразитна или сапрофитна, со тоа оваа проверка е посебно значајна затоа што позитивната оценка добиена во овој поглед може да ги оправда следните испитувања и карактеристики на паразитот. Патогеноста на изолираните бактерии од заболеното ткиво можеме да го провериме на повеќе начини.

Инокулацијата би требало да ја вршиме на домаќинот - видот од кој се добиени и бактериите, во рутинска работа. Кога се во прашање професионални лица, можно е да се користат други растителни видови за да се провери и да се очекува типична промена, симптоми и хиперсензибилна реакција, како што е типичната промена кај инокулираното ткиво.

Брзата проверка на патогеноста на издвоените бактерии може да се изврши и на поединечни делови на некои млади растенија, доколку се постават во влажна петриева кутија, пример котиледони од краставица и листови од праска, зелен плод од овошки. По 24 до 48 часа, доколку се инокулирани бактерии, се појавуваат патолошки промени како знак на патогеност. Младите растенија од домати или сончоглед, исто така можат да послужат како добар тест за патогеност, кога е во прашање предизвикувач на тумор *Agrobacterium tumefaciens*.

На слика 10 се претставени неколку реакции при проверка на патогеноста, на семе од сончоглед, пиперка и морков, при проверка на инфективниот статус на причинителот на влажно гниење (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*).



Слика 10. Проверка на патогеност на семе од сончоглед, пиперка и морков со соодветен бактериски изолат

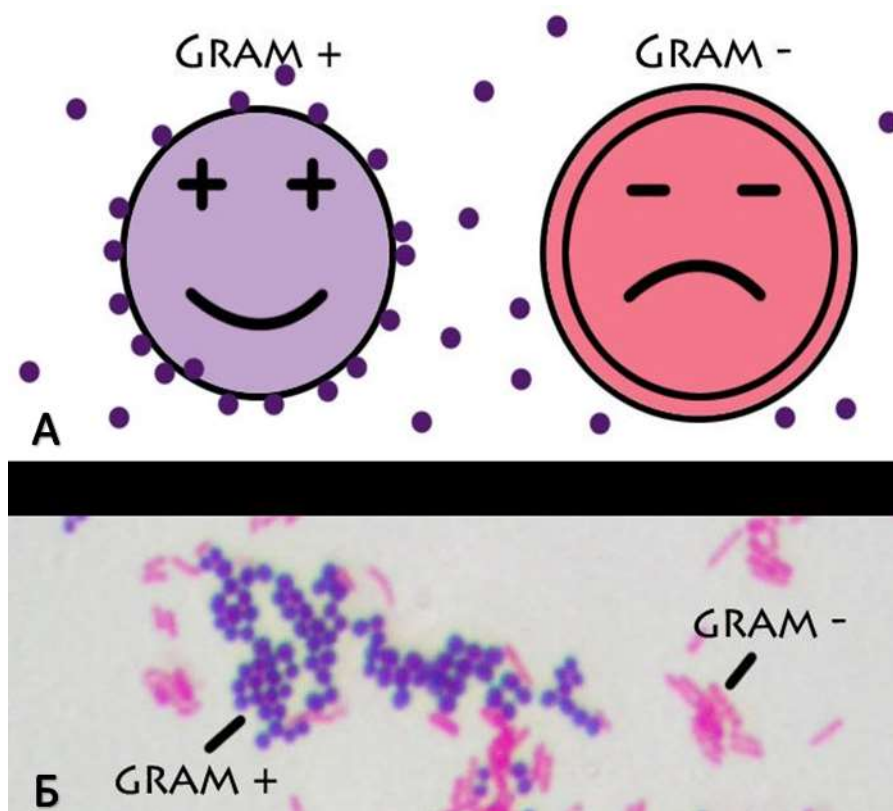
ВЕЖБА БР. 4

БИОХЕМИСКО-ФИЗИОЛОШКИ КАРАКТЕРИСТИКИ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА ФИТОПАТОГЕНИТЕ БАКТЕРИИ

Без да навлегуваме во повеќе детали и во специфичната примена, ќе спомнеме некои релативно софистицирани тестови кои денес се користат за идентификација на бактериите:

- **Разликување на бактериите според Грам**

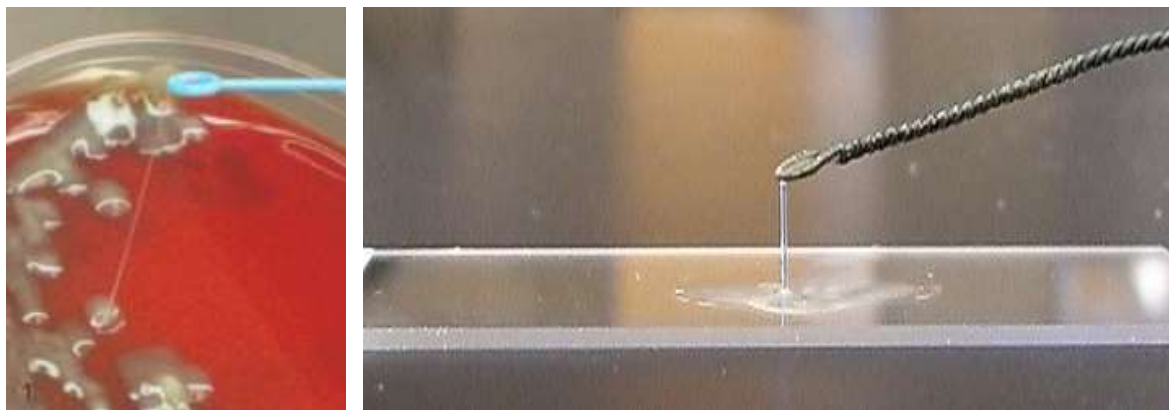
Микробиолошка техника на боење според Грам – (Gr+ виолетово обоени / Gr- црвено обоени)



Слика 11. Изглед на боење на бактериските клетки според Грам
А. Шематски приказ за Gr + виолетово обоени и Gr- црвено обојување
Б. Микроскопски преглед на боење на бактериските клетки

Најчесто користен метод на идентификација на грам-реакцијата во фитопатолошка лабораторија: се зема еден полн зафат од свежи бактериски колонии и се пренесуваат со помош на бактериолошка еза на микроскопско стакло и се мешаат со една капка 3 % KOH. Грам-негативните (грам-) бактерии стануваат слузести за разлика од грам-позитивните (грам+) кои не се слузени, и не се развлекуваат во вид на конци помешани во 3 % KOH (слика 12).

За примена на овој тест, потребни се свежи 24-часовни бактериски колонии од стандарден кос агар (стандарден хранлив медиум Na – nutritient agar).



Слика 12. Свежи бактериски колонии кои се пренесуваат со помош на бактериолошка еза на микроскопско стакло и се мешаат со една капка 3 % КОН

- Создавање зелен пигмент – флуоресценција

Флуоресценцијата е својство на некои бактериските клетки (пр. како што се бактериите од родот *Pseudomonas*) да создаваат флуоресцентен пигмент на специфичен хранлив медиум - се користи коса Кингова подлога В од 20 g пептин, 1,5 g K_2HPO_4 , 1,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g агар, 1 % глицерин и 1 000 ml вода со рН 7,2, на која се засејуваат бактериите.

Создавањето на флуоресцентен пигмент е позитивен кога во основата ќе има светкав сјај и ќе се гледа под ултравиолетова светлина. Реакцијата треба да се следи по 24 до 48 часа или по 5 до 7 дена (слика 13).



Слика 13. Специфичен флуоресцентен пигмент создаден на медиум Кинг В од *Pseudomonas fluorescens*

- Боја на колонијата и создавање слуз

Се користат 4 подлоги од кои во првата подлога има парчиња од глюкоза, екстракти од квасец и CaCO_3 , во втората подлога има парчиња од компир, а во третата и четвртата подлога има екстракт од компир и декстроза.

Со овие подлоги се проучуваат бактериите од родот *Xanthomonas* од кои повеќето создаваат жолтеникави и бели колонии. Жолтите каротеноидни пигменти не се раствораат во вода и бојата на колониите некогаш е повеќе изразена, а некогаш послабо, во зависност од бактериите, подлогата на која се одгледуваат и староста на културите (слика 14).

На цврста и течна подлога некои бактерии од овој род образуваат кафеави пигменти. Повеќето бактерии од родот *Xanthomonas*, за време на одгледувањето на подлога со глюкоза или други јаглехидрати, создаваат многу слуз. Најдобри подлоги за создавање слуз се оние од глюкоза, екстракт од квасец и CaCO_3 и екстракт од квасец, декстроза и CaCO_3 . Колониите на речиси сите бактерии од родот *Erwinia amylovora* се бели до кремави, освен *E. rubrifaciens* која создава розов пигмент на подлогата, а *E. herbicola* - жолт пигмент. Некои бактерии прават колонии по 3 до 6 дена од развојот на компирова подлога со pH 6,5.

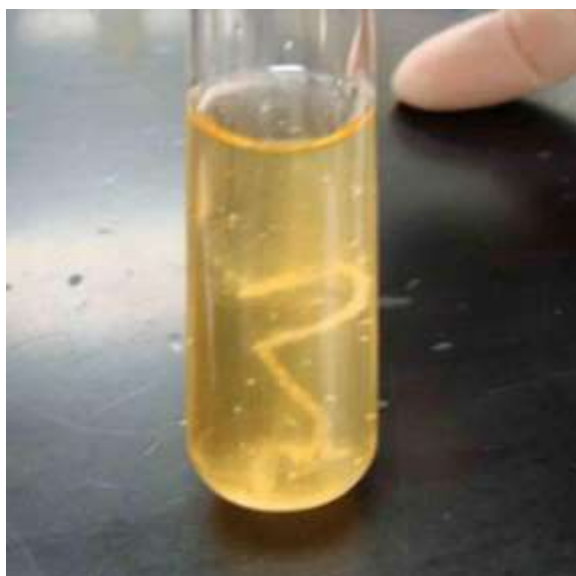


Слика 14. Специфична подлога со екстракт од квасец и CaCO_3 (YDCA), за изолација на видови од родот *Xanthomonas*

- **Максимален температурен развој**

Се користи течна подлога со екстракти од квасец и неорганска сол. Епруветките се поставуваат на влажни места на температура од 33 до 40 °C и нивниот развој се следи во периодот на 7 или 14 дена.

Развојот на бактериските колонии во течниот медиум се гледа како заматување на хранливиот медиум (слика 15). Кога ќе се остават епруветките на лабораториски сталак, ќе настане исталожување на бактериите на основата на епруветката во вид на бел талог (слика 16).



Слика 15. Течна подлога со развој на бактериски колонии за следење на развојот на температура од 35 °C



Слика 16. Таложување на бактериските колонии во течниот медиум

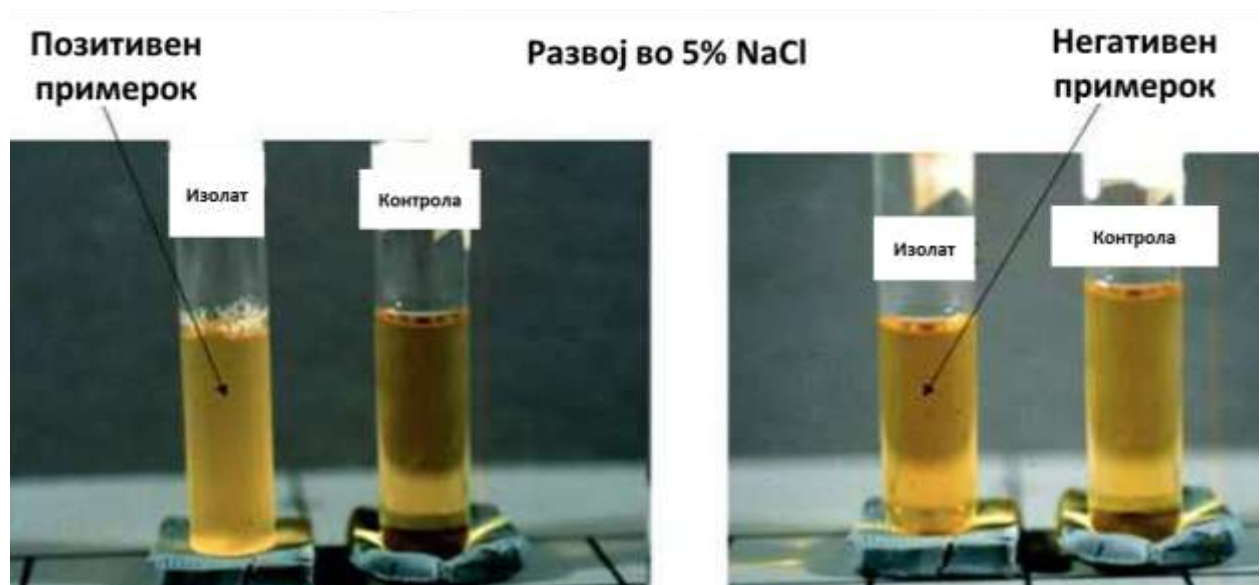
ВЕЖБА БР. 5

ДИЈАГНОСТИЧКИ ПОДЛОГИ И ТЕСТОВИ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА БАКТЕРИИТЕ

- Толеранција на NaCl

Примената на тестот се користи со инокулација на бактерски колонии на течна подлога, каде што има екстракти од квасец и неорганска сол со 5 % и 7 % концентрација NaCl, а резултатот се следи преку заматеноста на подлогата за време од 14 дена и развојот на бактериите на температура од 25 °C (слика 17).

Може да се користи и цврста хранлива подлога со глукоза, но најчесто се користи гореспоменатиот течен медиум.



Слика 17. Изглед на резултати од проверка на толерантноста на бактериски изолати во 5 % NaCl

- Карактеристики на развојот на бактериите во хранлив раствор од сахароза

Се проучуваат бактериите *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* и *P. s.* pv. *morsprunorum*. Хранливиот раствор се состои од 0,8 % и 5 % сахароза. Во епруветките се истура по 10 ml од течниот раствор, се стерилизира и епруветките се оставаат во период од 3 до 4 дена. По растот на *P. s.* pv. *syringae*, треба да се следи одбивање на светлината на темна заднина, при што се добива жолта боја на колониите, а *P. s.* pv. *morsprunorum* создава појава на бели колонии.

- Испитување на виталност на бактериите на подлога со сахароза

Испитаните изолирани бактерии *P. s.* pv. *syringae* и *P. s.* pv. *morsprunorum* се засејуваат во петриеве кутии на површината на подлога богата со сахароза и потоа во рок од 2 дена се врши пресејување во петриевите кутии на свежа подлога. Развојот на бактериите се следи за време од 24 до 48 часа од пресејувањето. Изолираните бактерии *P. s.* pv. *syringae* ја губат виталноста по 14 дена, а *P. s.* pv. *morsprunorum*

виталноста ја губи по 2 до 6 дена (ја губи способноста за пренамножување на подлогата).

- **Користење и разградување на јаглехидратите и другите соединенија**

За проучување на метаболизмот на глукозата се користат следниве постапки: **метаболизам на глукозата - Оксидативно–ферментивен тест (OF test)**

За одредување на оксидо-ферментативната активност на изолатите се користи подлога во следниов состав: 2,0 g бактериски пептон, 5,0 g NaCl, 0,3 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 3,0 g агар, бромметил сино (15 ml од 0,2 % воден раствор), дестилирана вода до 1 000 ml и подесување на рН на средината на 7,2.

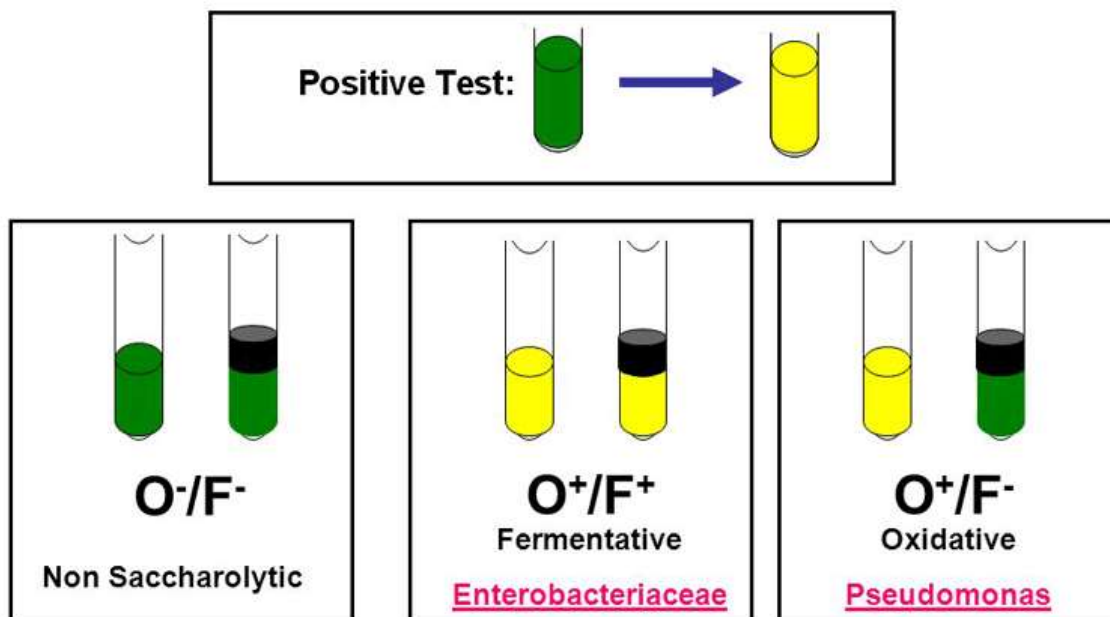
Подлогата се стерилизира под пареа (влажна стерилизација) за да се растопи агарот и да се разлие. На стерилизираната и оладена подлога до 50 °C се додаваат по 10 ml 10 % Д-гликоза, стерилизирана преку бактериолошки филтер, до крајна концентрација од 1 %. Со помош на стерилни пипети подлогата се разлива по 6 ml во стерилни епруветки, со големина од 16 x 160 mm.

Со помош на бактериолошки ези од разлиената подлога се засејуваат во 2 епрувети. Засејаните епрувети се ставаат во термостат на температура од 28 °C, а појавата на создавање киселина се следи секоја ден во текот на 14 дена.

Промената на бојата на подлогата во жолта, покажува позитивна реакција на ферментативна активност. Бактериите со оксидативен метаболизам на глукоза создаваат киселина само на врвот од епруветата, односно подлогата каде што има аеробни услови.

Ферментативниот тип на бактерии се развива во двете епрувети, како во аеробни така и во анаеробни услови. За време од 7 дена од засејувањето, бојата на подлогата се менува во жолта поради создавањето на киселина од глукозата. **Оксидативниот тип** на бактерии се развива само во онаа епрувета во која нема стерилен парафин.

Ферментативната бактерија *Klebsiella aerogenes* (*Enterobacter aerogenes*) се користи како контролна за брзо производство на киселина. Парафинот не е за употреба пред полевањето во епруветките, бидејќи овозможува дифузија на кислородот во подлогата. Ако бактериите создаваат киселина со глукоза во аеробни услови, значи дека разградувањето е по оксидативен пат, а во анаеробни услови - разградувањето е ферментативно (слика 18).



Слика 18. Оксидативно–ферментативна реакција (OF test)

1. Создавање киселина на виолетова подлога збогатена со лактоза

Засејувањето на културите се врши на виолетова подлога на која се додава 1 % лактоза за да биде завршната концентрација 2 %. Појавувањето на жолта боја е знак дека реакцијата е позитивна и се следи 28 дена.

2. Создавање киселина од сахароза

Се користи основна подлога со 1,5 % агар и 0,0016 % пурпур растворен во вода. Водениот раствор од сахароза е стерилизиран и му се додава топла стерилна подлога за да се добие крајна концентрација од 1 %, и ако имаме појава на жолта боја, тогаш реакцијата е позитивна.

3. Употреба на јаглерод

Користењето на различни јаглеродни соединенија како извор на енергија е значајно во идентификацијата на бактериите од родот *Pseudomonas*. Некои органски киселини често ги користат бактериите од сите родови. Разложувањето на киселините предизвикува зголемување на рН, што се докажува со соодветен индикатор.

Успешно изведените тестови за користење на јаглерод бараат многу внимание со цел да се избегне хемиската контаминација на подлогата. Сите соединенија што се употребуваат мора да бидат одделни, а целиот стаклен прибор треба да биде стерилизиран преку процес на влажна стерилизација.

Пластичните петриеви кутии и лабораторискиот воздух може да влијае врз резултатите. За ова истражување се препорачува минерална подлога составена од 4,75 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,53 g KH_2PO_4 , 1,0 g NH_4Cl , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 ml CaCl_2 , 15 g агар и 900 ml дестилирана вода.

Подлогата со растворите се стерилизира под пара за време од 30 минути, а потоа растворите се одмеруваат по 9 ml или 2 ml во епрувети, се додава јаглерод за да се добие крајна концентрација од 0,3 % активен јаглерод, како и растопен агар, пред да се стават во петриеви кутии или епрувети.

Подлогата може да се чува цела година на 4 °C и повторно да се употребува со додавање на јаглерод. Филтрирано добиениот јаглерод (од јагленохидрат или супстанција која е извор на јаглерод), може да се чува како 3 % раствор на 4 °C за време од една година.

Пред почетокот на тестирањето, испитуваните бактериски колонии мора да бидат пресеани најмалку 3 пати на одредени подлоги кои содржат некаков извор на јаглерод (обично глукоза), кој го користат бактериите (една до две капки се додаваат на подлогата или во петриевите кутии).

Растот се забележува за време од 14 дена, при температура од 25 °C. Основната подлога без извор на јаглерод, истовремено се засејува за испитување на видовата карактеристика на бактериите (одгледувачките одлики).

4. Хидролиза на арбутин – тест β -глукозидаза (за идентификација на *Pseudomonas syringae*)

Испитуваните бактерии се наоѓаат во течна подлога составена од 5 g арбутин, 10 g пептон, 3 g екстракти од квасец, 1 g глукоза и 1 000 ml дестилирана вода, како и pH на медиумот од 7,2. Промената на бојата на подлогата во темнокафеава или црна, за време од 7 до 10 дена од засејувањето покажува знак за позитивна реакција.

5. Хидролиза на ескулин (се користи за идентификација на *X. campestris*, *X. axonopodis* и *X. alnilineans*)

Бактериите се засејуваат на течна подлога составена од 10 g пептин, 5 g NaCl, 1 g ескулин, 1 000 ml дестилирана вода и pH 7,2. Задолжително се стерилизираат на влажна стерилизација на температура од 115 °C, за време од 10 минути. Приготвената подлога има син сјај, кој исчезнува за 48 часа по позитивната реакција. Промената на бојата во темнокафеава или црна, за време од 7 до 14 дена од засејувањето е знак на позитивна реакција.

6. Користење на натриум тартаратот

Повеќето бактериски култури се засејуваат на подлога составена од 1 g K_2HPO_4 , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$, 1,5 g натриум тартарат, растворени во 1 000 ml 0,005 % бромтимолов раствор и подесување на pH 7,2. Промената на бојата во сина за време од 14 дена од засејувањето покажува позитивна реакција и бактеријата користи тартар, како единствен извор на јаглерод.

7. Користење на цитратот

Се користи Симонсова цитратна подлога составена од 5 g NaCl, 0,2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1 g K_2HPO_4 , 2 g натриум цитрат, 0,02 g син бромтимол, 15 g агар и 1 000 ml дестилирана вода и подесување на pH 6,8. Промената на бојата на подлогата во сина покажува позитивна реакција и бактериите користат цитрат како единствен извор на јаглерод.

8. Метил црвено (*Methyl Red* – MR)

Methyl red (2-(*N,N*-dimethyl-4-aminophenyl) azobenzenecarboxylic acid), кој може да е сретне во литературата и како **C.I. Acid Red 2**, се користи како индикатор на pH-вредности на течни култури на колиформните бактерии. Резултатот од испитуваните култури се бележи за позитивен со промена на бојата на подлогата во црвена боја.

Поставување на тестот: додавање 1-2 капки метил црвено индикатор до 5 ml од свежа 24 - 48-часовна културата.

Киселина произведена поради ферментација на гликоза со бактериска култура дава црвена боја на медиумот. Негативната реакција е индицирана со развој на жолта боја.

9. Создавање фенилаленин деаминаза

Ензимот кој го претвора фенилаленинот во фенил пирувична киселина, докажува редукција на железен хлорид. Подлогата е составена од (g/L): 3 g екстракти од квасец, 2 g фенилаленин, 1 g Na_2HPO_4 , 5 g NaCl , 12 g агар. Неколку капки од 10 % раствор на железен хлорид се додава на подлогата по 3 дена од развојот на 27 °C. Појавата на зелена боја е знак за позитивна реакција. Слаба реакција се добива кога се во прашање некои бактерии од родот *Erwinia*, во споредба со јаки реакции што ги создаваат *Proteus* sp.

10. Активност на фосфатазата

Подлогата е составена од 10 g бактериски пептон, 5 g месен екстракт, 15 - 20 g агар и дестилирана вода до 1 000 ml. Растворените состојки во дестилирана вода се загреваат за да биде рН на подлогата 7,0, се стерилизира 10 минути на 121 °C и се лади подлогата до 45 - 50 °C, па потоа се додава раствор од фенолфталеин дифосфат за да биде крајната концентрација 0,05 %.

Се меша добро и се разлива во петриеве кутии кои треба да бидат суви, потоа да се инкубираат 18 часа на 27 °C. Потоа се додава 0,1 ml растворен амонијак, за на крај, петриевите кутии да бидат превртени и да лежат на капакот, за да биде подлогата горе.

Се чека околу 30 минути за да дојдат пареите од амонијакот до подлогата, односно до бактериските колонии, за да се промени вредноста на рН во алкална. Во случај на позитивна реакција, колониите се обојуваат светло розови.

11. Активност на тирозин

Се употребува подлога составена од 0,5 g глицерин, 1,0 g казеин хидролизат, 0,1 g тирозин, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,0125 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,0 g агар, при што рН се подесува на 7,2 до 7,4, и на крај задолжителна е стерилизација на подлогата на 121 °C, за време од 15 минути. Културите се засејуваат во петриевата кутија по површината на подлогата и се следат од 7 до 8 дена.

Црвенокафеавото обојување на подлогата е знак за позитивна реакција на создавање на тирозинот, што се забележува за период од 3 до 4 дена. Силна појава на зелен пигмент е карактеристична за *P. s. pv syringae* која се забележува по 48 часа, а колониите од *P. s. pv morsprunorum* што се портокалово-кафеави, не влијаат врз резултатите.

12. Создавање на липазата

Подлогата е составена од 10 g бактериолошки пептон, 5 g NaCl , 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$, 15 g агар, до 1 000 ml дестилирана вода и рН на подлогата 7,4. Естер алеинската киселина посебно се стерилизира за време од 20 минути на 121 °C и 5 ml се додава на 500 ml во горната подлога, потоа се лади на 40 °C, се меша и се разлива во петриеве кутии, коишто по засејувањето се следат во текот на наредните 7 дена. Појавата на еден ареал околу колонијата е знак за позитивна реакција што се таложи на подлогата, а со помош на микроскопот може да се забележи појавата на ситни кристали.

13. Активност на лецитиназата

Експериментот се поставува со употреба на жолчка од свежо јајце, која добро се меша со еднаква количина на физиолошки раствор (NaCl 0,85 g). 5 ml од оваа смеса се додава на 100 ml течна подлога од квасец, екстракти од месо и пептон. Вака подготвениот хранлив бактериолошки медиум се разлива во петриеви кутии, а инкубациониот период трае 7 дена на 27 °C.

Создавањето на заматени зони околу колонијата покажува позитивна реакција, односно создавање на лецитиназата. Утврдено е дека лецитиназата можат да ја создадат и некои бактерии со активноста на некои триглицериди. Исто така, утврдено е дека позитивна реакција може да се добие и без активноста на лецитиназа. Лецитиназата може да ја создаваат бактериите од родот *Xanthomonas*, но и некои други бактерии кои не припаѓаат на овој род.

14. Оксидација на глуколат

Се користи подлога составена од 0,15 % пептин, 0,1 % екстракти од квасец, 0,1 % K₂HPO₄, 4 % натриум глуколат и pH 7,0. Стерилизацијата се врши на температура од 121 °C за време од 10 минути. Во епруветата се разлива по 6 ml од оваа подлога и секоја епруветка се засејува и се инкубира. Се користи Бенедиктов квантитативен реагенс за оксидација на шеќерот.

Во епруветата се додава 3 ml од културата со супстратот и 0,6 ml Бенедиктовиот реагенс. По протресувањето, епруветата се залива со зовриена вода, 10 минути и брзо се лади во ладна вода и се става на страна за да се овозможи одвивање на реакцијата, која се следи по 2 и 24 часа. Во случај на позитивна реакција се појавува жолтокафеав талог од бакар оксид и карактеристичен мирис на расипана зелка. Разликите во талогот и бојата се во корелативна врска со степенот на оксидација.

15. Користење на аспарагин како единствен извор на јаглерод и азот

Тестот се користи за распознавање на бактериите од родот *Xanthomonas* кои не користат аспарагин како извор на јаглерод и азот од сродни *Pseudomonas* видови кои го користат. Се употребуваат две подлоги од кои првата содржи 2 g KH₂PO₄, 0,4 g KCl и 0,4 g MgSO₄ · 7H₂O во 1 000 ml дестилирана вода и подесување на pH 6,4. На крај при подготовката на подлогата, задолжително стерилизација на истата на температура од 120 °C за време од 15 мин.

Втората подлога се состои од 10 g аспарагин во 1 000 ml дестилирана вода. Ист волумен на растворот од двете подлоги се пренесува асептично и се става во епрувети за тестирање. За секој изолат се користат 4 епрувети. Мала количина на бактериите се засејува во првата епрувета.

По 7 дена, со помош на бактериолошка еза се зема еден зафат од растворот и се засејува од првата во втората епрувета, а потоа засејувањето се врши и во третата и четвртата епруветка за период од 7 дена. На крајот, со помош на бактериолошката еза се зема растворот од испитуваните култури и се пренесува на коса подлога, поради испитувањето на развојот на бактериите.

Развојот на испитуваните бактерии во растворот во сите четири епруветки, како и на подлогата, покажуваат идентификација на видот на бактеријата од родот *Xanthomonas*.

16. Реакција на искористување на соединенијата од сахароза

Подлогата е составена од 10 g пептон, 5 g екстракти од говедско месо, 40 g сахароза, дестилирана вода до 1 000 ml. Бактериските изолати се ставаат во растворот, а потоа истиот волумен на Бенедиктовиот реагенс се додава во епруветата и се става во влажни комори во период од 10 минути. Ако имаме позитивна реакција се појавува жолтопортокалова боја.

За разликување на *E.c. subsp. carotovora* и *E.c. subsp. atroseptica* се користи раствор составен од 10 g бактериски пептон и 10 g сахароза на 1 000 ml дестилирана вода, добро се меша и се разлива по 5 ml од растворот во епруветата. Потоа се додава 5 ml Бенедиктовиот реагенс во чисти епрувети за тестирање, па истите се загреваат.

Создавањето на портокалов или зелен талог е знак на позитивна реакција за *E. c. subsp. atroseptica*. *E. c. subsp. carotovora* предизвикува појава на различни бои на подлогата по загревањето и додавањето на Бенедиктовиот реагенс, а често е и појава на зелена боја што се смета за негативна реакција, па затоа се препорачува следната процедура која опфаќа 2 раствора **A** и **B**:

Растворот A содржи 10 g пептон и 17 g агар во 800 ml дестилирана вода, а **растворот B** содржи 40 g сахароза во 200 ml дестилирана вода. Растворот B се додава во растворот A и тој раствор потоа се истура во петриева кутија со пречник од 9 cm. Со помош на бактериолошка еза, се пресејува инокулумот во петриева кутија каде што се разлива и Бенедиктовиот реагенс. Се инкубираат на 60 °C за 30 до 45 мин., а појавата на портокалова зона со сина заднина означува позитивна реакција.

17. Создавање на 2-кето глуконат

Тестот се користи за идентификација на бактериите од родот *Pseudomonas* и некои видови од родот *Erwinia* што поседуваат оксидативен метаболизам. Се користи истата подлога како во претходниот тест, со тоа што сахарозата е заменета со калиум глуконат. Користејќи го калиум глуконатот како извор на јаглерод, бактериите ослободуваат 2-кето глуконат во подлогата. 2-кето глуконатот врши редукција на бакар сулфатот од Бенедиктовиот реагенс кој преминува во нерастворлив бакар оксид, што пак, се манифестира со појава на жолтопортокалово или портокаловоцрвено обојување.

18. Создавање 3 кето лактоза

Оксидацијата на лактозата од страна на *A. tumefaciens* се одвива преку создавање 3 кето лактоза, што се докажува со постапката од страна на Бернерса и Де Леа. Бактериите се ставаат два дена на подлогата составена од 10 g лактоза, 1 g екстракт од квасец, 15 g агар, а потоа петриевата кутија се прелива со Бенедиктов реагенс. Ако имаме позитивна реакција, околу колониите се создава светол жолтопортокалов талог Cu_2O . Бенедиктовиот реагенс се состои од A и B раствор. За растворот A се користи 173 g натриум цират, 100 g натриум карбонат, растворен во 850 ml загреана дестилирана вода. За растворот B се користи 18 g бакарен сулфат, растворен во 100 ml вода која полека се додава во растворот A.

19. Активност на каталаза

Каталазата е ензим карактеристичен за повеќето видови бактерии, со помош на кој настанува катализација, при што водородниот пероксид (H_2O_2) кој е токсичен за бактериската клетка, се распаѓа под дејство на вода и кислород. За докажување на создавањето на каталазата од страна на бактериите се користи водороден пероксид и имаме неколку постапки:

- Во **првата** постапка, со бактериолошка еза од косата подлога се зема еден полн зафат од колонијата и се тестираат преку микроскопското стакло, со додавање на една капка 20 % раствор на водороден пероксид (H_2O_2);

- Во **втората** постапка има 1 ml H_2O_2 кој се става на површината на колониите;
- Во **третата** постапка, дел од колониите се земаат од косата подлога се хомогенизираат во 1 ml 20 % H_2O_2 ;
- Во **четвртата** постапка, во мали и чисти епрувети се става 1 ml H_2O_2 и се додава 1 ml течна култура;
- Во **петтата** постапка на развиените колонии се испитува изолатот и се додава неколку капки од 10 % раствор H_2O_2 во дестилирана вода.

Појавата на меурчиња настанува како резултат на издвојување на слободниот кислород и тоа е знак на позитивна реакција, односно присуство на ензимот каталаза во испитуваните чисти бактериски изолати.

20. Хидролиза на казеин

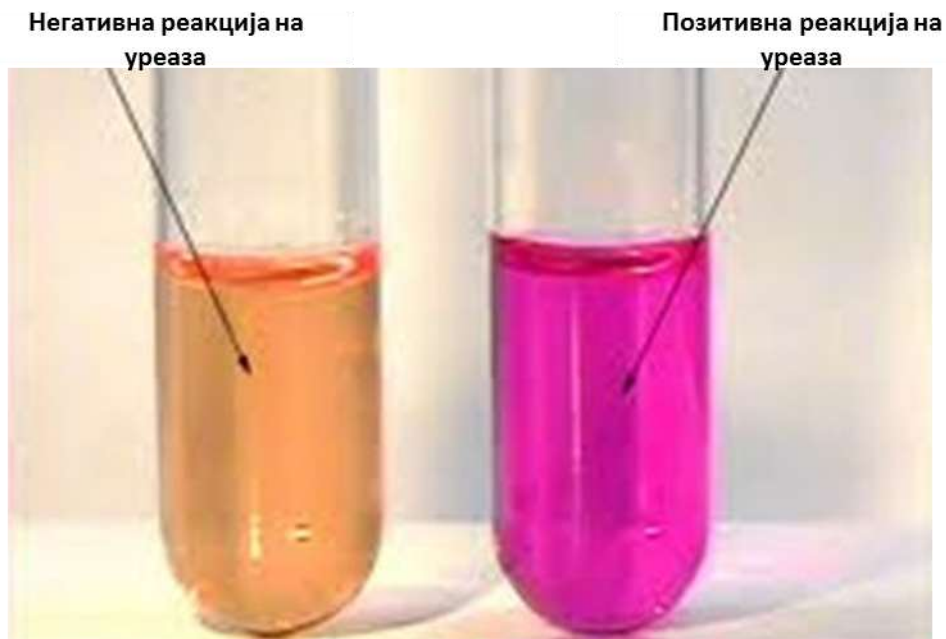
Се користи рамен агар составен од 10 g казеин, 1 g K_2HPO_4 , 1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g NaCl, 5 g пептон, 20 g агар, 1 000 ml дестилирана вода и pH 7,2. Транспарентната зона што се појавува околу развиените колонии за време од 7 до 14 дена е знак на позитивна реакција, односно хидролиза на казеинот.

ВЕЖБА БР. 6

ДИЈАГНОСТИЧКИ ТЕСТОВИ ЗА ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА ВИДОТ НА ФИТОПАТОГЕНИТЕ БАКТЕРИИ

1. Активност на уреаза

1 000 ml 20 % раствор од уреа се стерилизира и се додава на подлогата составена од 1 g пептин, 5 g NaCl, 2 g KH_2PO_4 , 1 g глюкоза, 6 ml 0,2 % раствор од црвен фенол, 20 g агар и 900 ml дестилирана вода и рН 6,8. Тестираните бактерии се засејуваат на подлогата и се следат 5 дена. Црвената боја покажува знак на позитивна реакција (слика 19).



Слика 19. Изглед на епруветки со промена на бојата на медиумот како резултат на позитивна реакција на уреазата

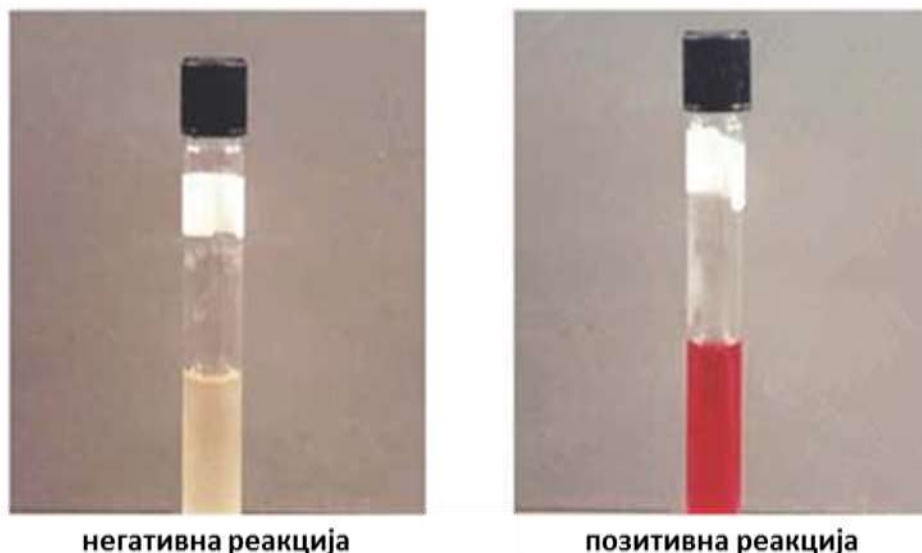
2. Нитратна респирација, анаеробно дишење, редуктивна асимилација, денитрификација

За разградувањето на нитратот имаме две епрувети со мезопептонски раствор, во кои се додава 1 % KNO_3 , се засејуваат со помош на бактериолошка еза, а резултатите се отчитуваат со промена на бојата на подлогата, како резултат на позитивна нитратна реакција (слика 20).

Во едната епруветка се става течен парафин.

Развојот на бактериите во двете епруветки, во аеробни и анаеробни услови, за период од 4 дена, покажува позитивни резултати.

НИТРАТНА РЕАКЦИЈА



Слика 20. Изглед на негативна и позитивна реакција на активност на нитрати

3. Активност во млекото – протеолиза на млекото

Протеолиза-тестот е карактеристичен за бактериите од родот *Xanthomonas*. Се користат течни или цврсти подлоги. Во првиот случај се додава 0,04 g/l виолетов бром крезол, а потоа се става во епрувети се засејува со бактериолошка еза и се става во термостат на 27°C. Создавањето на киселина во безмасно млеко со виолетов бром крезол е поосетлив тест од млеко со лакмус. Во вториот случај во петриевите кутии се става 15 ml мезопептонска подлога, а потоа се додава тенок слој подлога припремена со екстракти од квасец и се додава 15 % безмасно млеко. Стерилизацијата на млекото се врши 1 час под пареа, а потоа ова се меша со стерилизирана и топла подлога во 10 % концентрација. Ссе става во петриеве кутии кои се сушат 2 часа на 45 °C и се следат 7 дена.

4. Создавање честички мраз во растителното ткиво под дејство на бактериската клетка

Докажано е дека бактеријата *P. s. pv. syringae* има способност за создавање честички мраз во растителните клетки, што е од големо значење во одгледувањето на растенијата во зимски услови. Ова својство во лабораториски услови се користи за идентификација на бактериите, а создавањето на честички мраз од страна на бактериите кои се наоѓаат во растителните клетки, односно доведуваат до оштетување на ткивата на растенијата. За растенијата без синтетизирање на антифризни протеини, оштетувањето од мраз обично се јавува на температура помеѓу -4 и -12 °C, бидејќи водата во растителното ткиво може да остане во течна состојба во фаза на ладење. *P. syringae* може да предизвика замрзнување на водата на температура повисока од -1,8°C, но постојат соеви кои предизвикуваат мрзнење на пониски температури (до -8°C). Замрзнувањето предизвикува повреди во епителните ткива, и на тој начин ги прави хранливите материи во основните растителни ткива достапни за бактериите.

За создавање честички мраз во лабораториски услови се користи 2 дена стари култури, одгледани на 25 °C на подлоги составени од екстракти со: 5 g квасец, 5 g пептон, 5 g глюкоза и 15 g агар. Се става во епруветка и се става во ладни простории на -4 °C каде што се држи 5 мин. Како контрола служи епрувета со 5 ml дестилирана вода.

Сите тестирани изолати *P. s. pv. syringae* даваат позитивна реакција, а *P.s. pv. morsprunorum* дава негативна реакција. Кристализацијата на водата настанува со додавање бактерии ако тестот е позитивен. На температура од -9 °C доаѓа до мешање на заситени соли и искршен мраз.

5. Осетливост према CuSO_4 и стрептомицин сулфат

За овие проучувања е користена подлога која содржи сахароза и пептони, како и соодветна концентрација на CuSO_4 од 200 $\mu\text{g/ml}$ и стрептомицин сулфат од 100 $\mu\text{g/ml}$. Подлогата се состои од 20 g сахароза, 5 g бактериски пептон, 0,5 g K_2HPO_4 , 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g агар и дестилирана вода до 1 000 ml.

Подготвената и стерилизирана подлога се разлива во петриеви кутии. Бактериските чисти изолати се засејуваат на петриевите кутии со CuSO_4 и стрептомицин сулфат и се следи развојот на колониите.

За примена на соодветни мерки за заштита, но и за да се утврди токсиколошкото дејство на CuSO_4 и стрептомицин сулфат, во лабораториски услови се следи нивното дејство врз различни бактериски изолати. Различната концентрација, различно делува на појавата, развојот или отсуството на бактериските колонии (слика 21).



Слика 21. Различен степен на инхибиција на зоната околу колониите, зависно од антибиотикот и концентрацијата при апликација на диск од филтерна хартија (бела зона)

ВЕЖБА БР. 7

ОСНОВНИ ПРИНЦИПИ НА СЕРОЛОШКА ДЕТЕРМИНАЦИЈА НА ФИТОПАТОГЕНИТЕ БАКТЕРИИ

Класичниот метод на детерминација на фитопатогените бактерии, земајќи ги предвид нивните морфолошки и биолошки својства, бара реалтивно долга лабораториска работа. Овој метод содржи и неопходна контрола на патогеноста од добиените чисти изолати, што исто така е поврзано со многу тешкотии, бидејќи е неопходна и употреба и присуство на растенија што одговараат со вештачкиот инокулум. Спроведената детерминација не секогаш ги дава задоволувачките резултати. На крајот, меѓусебната сродност на фитопатогените бактерии не може да се утврди само врз основа на нивните морфолошки и биохемиско-физиолошки својства. За идентификацијата на овие патогени форми на микроорганизми, неопходна е примена на брза постапка. Таков еден метод е серолошката детерминација, која одамна нашла примена и во хуманата и ветеринарната микробиологија, односно и во растителната фитобактериологија.

1. Општи поими

За да може да се спроведе серолошки метод на детерминација, неопходно е да се има т.н. **имуносеруми**. Серолошкиот метод се базира на основа на меѓусебното дејство на антигените и антителата.

Антигени - се материи кои внесени парентерално (интравенозно, сукутано, интрамускулно, интраперитонеално) во животински организам, стимулираат и во него образуваат специфични антитела.

Антитела - се глобулини на крвниот серум, изменети под дејство на внесените антигени. Серумот кој содржи антитела се нарекува имуносерум.

Антигенот го карактеризираат две основни својства:

1. Го стимулира создавањето на антитела;
2. Реагира со создадените антитела.

Во ваквите реакции учествуваат само меѓусебно сродни антигени и антитела. Специфичноста на антителата е во тоа што истите можат да навлезат во реакција само со оние антигени што го предизвикале нивното создавање.

Антигените се од белковинско потекло, односно комплекси помеѓу белковини и полисахариди. Во состав на антигените влегува една или пак двете од овие компоненти. Првата има улога на носач, а другата е придружник. Втората компонента, односно придружникот, нема улога во функцијата на самиот антиген. Ниско молекуларната компонента (јаглехидрат) е поважна во оваа улога и ја дава специфичноста на самиот антиген. Од тука, втората компонента претставува детерминантна или специфична група.

Носители на специфичностите во едно, компонентните или белковински антигени се одредени хемиски групи кои влегуваат во состав на самите белковини. Тоа се amino и карбоксилните групи. Факторот за специфичностите кај овие антигени, се тоа што не може да се разградат или одвојат од молекулата на белковината, без нејзино разградување. Со оглед на тоа дека бактериите се изградени од такви супстанции, може да заклучиме дека истите се погодни за серолошки испитувања. За добро да се разбере серолошкиот метод на детерминација на фитопатогените бактерии, потребно е да се разјаснат уште два поима. Првиот поим е т.н. **аглутинација**, а другиот **преципитација**.

Бактериите хомогенизирани во физиолошки раствор (0,85 % NaCl во дестилирана вода) остануваат подолго време во суспензија. Ако во ваквата суспензија

се додаде имуносерум специфичен за тој вид на бактерија, тогаш ќе настане реакција помеѓу сродните антитела и антигени, односно ќе дојде до заемно поврзување на групираниите бактериски клетки, и со тоа се создава можност за исталожување. Оваа реакција се нарекува **аглутинација**. Подоцна, доколку серумот ќе го помешаме со антигените кои се наоѓаат во екстрактот од сокот на болното растително ткиво, ќе дојде до формирање на бел ситен талог. Оваа појава е наречена **преципитација**.

Аглутинини се антитела кои настанале во крвта на животните и во нив се внесени чисти култури од бактерии (живи или умртвени). Овие аглутини, во физиолошки раствор стапуваат во реакција со антигените кои всушност го предизвикале нивното создавање при процесот на аглутинација.

Преципитини се антитела кои се образуваат во крвта на животните по внесувањето на бактериски антигени или екстракти. Растворот од антителата помешан со растворот на одговарачките антигени, резултира со појава на преципитација.

Аглутинацијата, како и преципитацијата, се одвиваат до две фази. Во **првата фаза** антигените се врзуваат со антителата и настануваат агрегати со голема молекула. Во **втората фаза**, физичко-хемиските процеси кои настануваат, причинуваат кондензирање на агрегатите. За да дојде до кондензација, потребно е присуство на липоиди и електролити. Липоидите кои ја потпомагаат кондензацијата, се наоѓаат во серумот. Со своето присуство во серумот како такви ја зголемуваат хидрофобноста на комплексот антиген - антитело. Бактериите и бактерискиот ескудат имаат негативен полнеж. Ваквиот негативен полнеж овозможува лебдење на клетките и колоидните супстанции во суспензијата. Кога антителата реагираат со антигените се намалува негативниот полнеж на антигенот. Полнежот на антигенот го намалуваат и некои едновалентни катјони.

Треба да се истакне и тоа дека бактериската клетка не претставува единствен антиген, туку дека се состои од повеќе антигени кои формираат антиген мозаик. Овие антигени се наоѓаат во клеточните сидови, или пак во самата клетка. Поголема е веројатноста доколку вршме серолошки испитувања да учествуваат само поедини антигени, и да се оневозможи учеството на други антигени. Така, на пример, ако бактериите пред аглутинација се подложни на загревање на температура на вриење на водата, доаѓа до денатурација на антигените кои се наоѓаат во клетката. Таквите бактерии што не содржат антигени во своите клетки, како што е во случајот со телесните клетки, во присуство на имуносерум оневозможуваат формирање талог со ситни честички. Ваквата реакција се нарекува **О-аглутинација**. Наспроти оваа реакција, доколку бактериите пред аглутинација не се загреваат, во реакција со серумот учествуваат како соматски антигени, па како резултат на тоа се создава талог со поголеми честички. Тоа е т.н. **Х-аглутинација**.

Утврдено е дека поедини атомски групи на бактериските антигени покажуваат антигена способност. Како резултат на тоа, секоја од овие атомски групи може да предизвика создавање на свои антитела, и со нив да настапи во реакција.

Серолошките реакции се премногу осетливи бидејќи во нив не учествува само целокупната молекулска структура на антигените, туку и бројот на нивните атомски групи, како и нивниот просторен распоред. По правило, две различни бактерии имаат различен антиген мозаик. Така, имуносерумот добиен од еден вид бактерија, не содржи антитела од друг вид бактерии. Но, две сродни бактерии можат да имаат помалку или повеќе слични антигени. Во овој случај, произведениот серум врз база на едната бактерија реагира со антигенот од другата бактерија, доколку поседуваат заеднички делови во однос на антигените.

Степенот на сродноста на бактериите се изразува со **квантитативна, аглутинациска и преципитациска титрација**.

ВЕЖБА БР. 8

СЕРОЛОШКИ ТЕСТОВИ ЗА ДЕТЕРМИНАЦИЈА НА БАКТЕРИИТЕ

Врз основа на реакцијата на аглутинација и преципитација, создадени се неколку методи кои се користат за серолошка дијагноза на бактериите. Тоа се аглутинациони тестови на предметни стакла или епрувети, преципитационен тест на агар во петријеви кутии и др.

За брзи дијагнози, најчесто се користи првиот метод кој се состои од следното: на предметно микроскопско стакло, со помош на пастерова пипетка, се нанесува капка физиолошки раствор, каде што со бактериолошка игла се додава и се хомогенизираат бактериите од одредена култура, а потоа се додава имуносерум. Во случај на позитивна реакција настанува аглутинација која се манифестира во вид на талог и доаѓа до заматување на капката од растворот.

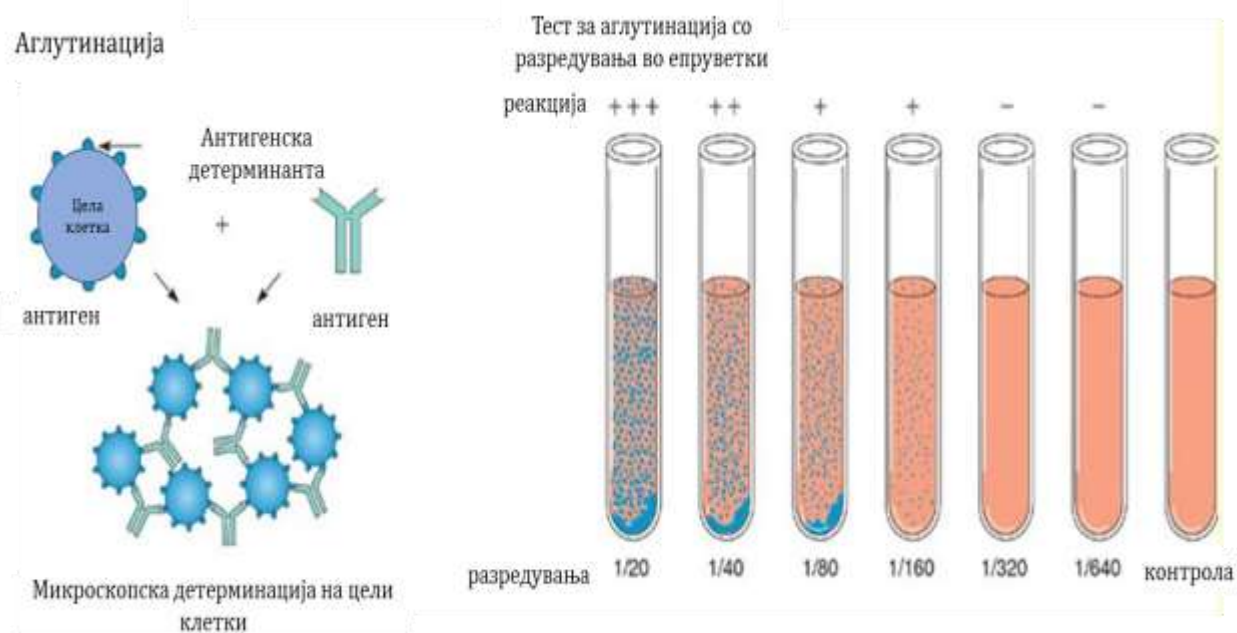
Слична постапка се применува и кај преципитациониот тест, само што овде наместо бактериски култури се користат припремени екстракти од заразено растително ткиво, на кое се додава серумот што одговара.

Аглутинацискиот тест на предметно стакло, како и преципитациониот тест наоѓаат голема примена во брзата дијагноза на различни бактериози и тоа: прстенесто гниење на кртолите на компирот (*Clavibacter michiganensis* spp. *sepedonicus*), бактериска дамкавост на стрните жита (*Xantomonas campestris* pv *translucens*), бактериски рак на домотот (*Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*), бактериози на гравот и др.

Аглутинацискиот тест во епрувети претставува подолга процедура, но сепак е најприменуваниот тест бидејќи е најпрецизен. Во оваа постапка се користат 10 - 12 епрувети наредени на лабораториски сталак за епруветки. Во секоја епрувета се става по 1 ml физиолошки раствор, со исклучок на првата во која се става 1.8 ml раствор и 0.2 ml серум. Откако растворот во првата епрувета добро ќе го хомогенизираме со пипета, со истата пипета се одзема 1 ml течност и се додава во втората епрувета. Од втората, по хомогенизирањето се зема од пробата, се става во третата епрувета и така сè до последната, во која не се додава ништо бидејќи таа служи како контрола. На вака разредениот серум се додава суспензија од бактерии со концентрација од 10^9 бактерии/ml, подготвена во физиолошки раствор, и тоа по 1 ml во секоја епрувета. После тоа, лабораторискиот сталак со сите епрувети се протресува повеќе пати, а потоа се става на водена бања, на температура од 37 °C, за време од 2 часа. Читањето на аглутинацијата се врши по 2 и по 24 часа. Последната епрувета во која настанала аглутинација, укажува на присуство на серум. На пример, ако разредувањето на течностите (серум + физиолошки раствор + суспензијата од бактерија) во првата епрувета изнесувало 1:10, во втората ќе изнесува 1:20, во третата 1:30 итн. Тоа значи дека, доколку реакцијата на аглутинација се манифестира во деветата епрувета, висината на титрирање ќе изнесува 1:2.560.

Според тоа, ако во ваквите истражувања располагаме со специфични серуми произведени со помош на детерминирани и недетерминирани бактерии, тогаш врз основа на споредбеното проучување на реакциите на аглутинација, доаѓаме до информации за сродноста на неидентификуваните бактерии и идентификуваните бактерии.

Покрај сличностите кои постојат во структурата на антигенот, помеѓу некои претставници на фитопатогените бактерии, пр. *Xantomonas*; *Pseudomonas*, оваа дијагноза се дополнува со други осетливи серолошки методи, како што е преципитациониот тест на агар во петријеви кутии.



Шематски приказ на еден работен модел на серолошка реакција - Аглутинација:

Читањето на аглутинацијата се врши по 2 и по 24 часа. Последната епрувета во која настанала аглутинација укажува на присуство на серум. На пример, ако разредувањето на течностите (серум + физиолошки раствор + суспензијата од бактерија) во првата епрувета изнесувало 1:10, во втората ќе изнесува 1:20, во третата 1:30 итн.

ВЕЖБА БР. 9

БАКТЕРИОФАГИ НА ФИТОПАТОГЕНИТЕ БАКТЕРИИ

Освен серолошките методи кои нашле голема примена во детерминацијата на фитопатогените бактерии, за вакво испитување и детерминирање се користат и бактериофагите. Појавата на бактериофагите е откриена првпат во 1915 година од страна на англискиот бактериолог Twort. Овој бактериолог воочил дека некои бактериски култури се дезорганизираат и се разградуваат, можат да исчезнат или пак да се стопат. Во почетокот оваа појава била објаснета на неколку начини. Со појавата на електронскиот микроскоп е откриена вистинската природа на овој феномен.

Утврдено е и дека дезорганизираните бактериски клетки кои се распаѓаат, ослободуваат ситни честички кои наликуваат на вируси. Нивната вирусна природа сега е потполно докажана, а ваквите честички добиле име бактериофаги.

Општи особини, природа и размножување на фагите

Основни карактеристики на бактериофагите се:

1. Отсуство на размена на материјата надвор од бактериската клетка;
2. Размножување само во бактериска клетка домаќин;
3. Иста големина со вирусите;
4. Висок степен на специфичност спрема домаќинот;
5. Нуклеопротеински состав на честичките;
6. Лизогени особини, карактеристични и за латентните вируси.

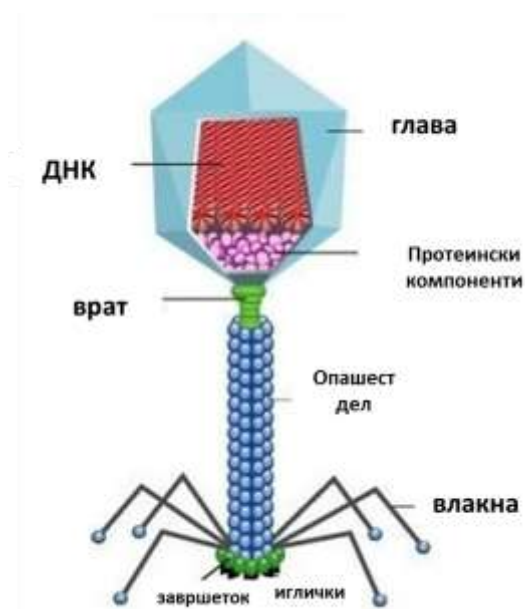
Благодареејќи на истражувањата на многу автори, дошло до голем број информации во врска со природата на бактериофагите. Во однос на нивниот облик, познато е дека голем број од нив имаат облик на сперматозоид (слика 22).



Слика 22. Изглед на бактериофаг

Ваквата елементарна честичка се состои од глава и опашест дел. Хемиски, се состои од 40 до 50 % нуклеинска киселина и 50 % протеини. Во бактериската клетка главна улога има нуклеинската киселина, додека пак протеинската обвивка не учествува во репродукцијата на фагите (слика 23).

Според тоа, бактериофагот можеме да го замислиме како пумпа, кој својата содржина од наследен материјал (ДНК) ја испушта во бактериската клетка, а самата протеинска обвивка останува надвор од неа.



Слика 23. Бактериофаг со неговите составни делови

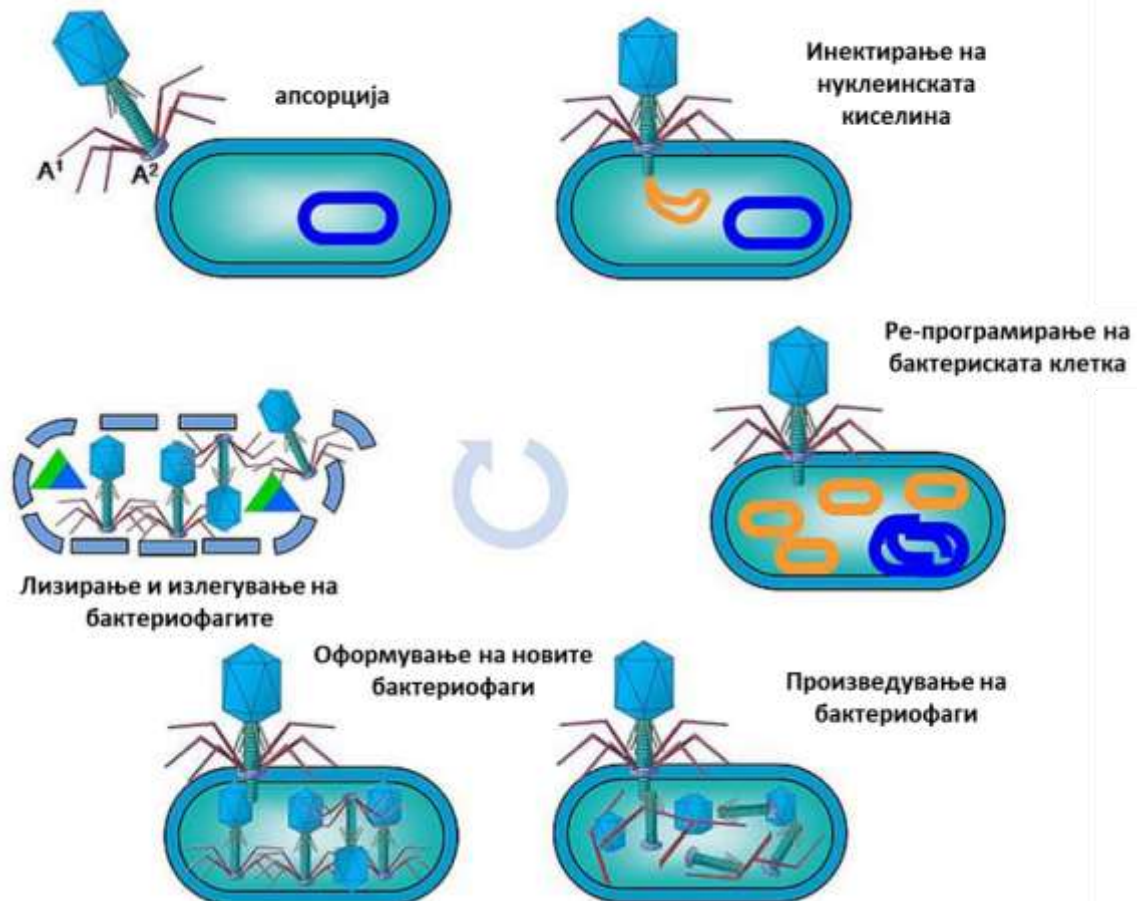
Процесот на репродукција на бактериофагите се одвива во три фази:

1. *Апсорпција на бактериофагот и продирање на нуклеинската киселина во клетката домаќин;*
2. *Синтеза на нови честички од бактериофагите во бактериската клетка домаќин;*
3. *Лизирање на бактеријата и ослободување на новосоздадените бактериофаги.*

Во првата фаза, според принципот на Брауново движење, се одвива спојување на бактериската клетка и фагите. При допирот, бактериофагите се прикрепуваат за површината на бактериската клетка. Откако пенетрацијата на фагите во бактериската клетка е завршена, не постои можност за навлегување на други фаги во истата клетка. Со помош на електронски микроскоп е докажано дека бактериофагот со помош на својата опашка се приближува кон површината на бактериската клетка. Како што е веќе напоменето, во внатрешноста на клетката продира само нуклеинската киселина, и тоа од главичестиот дел на бактериофагот, додека пак протеинската обвивка останува надвор од клетката.

Механизмот на размножување на бактериофагите во бактериската клетка, и покрај многуте обиди, останал неразјаснет. Познато е само дека размножувањето на бактеријата која стапила во контакт со бактериофаг, прекинува и истата почнува да бабри. Во бактериската клетка истовремено настанува интензивната синтеза на нуклеински киселини и протеини на сметка на бактериофагот. Ензимите кои учествуваат во процесот на респирација и понатаму функционираат, а настаната енергија не се користи за градење на нови бактериски клетки туку за синтеза на нови бактериофаги.

Во следната фаза доаѓа до пукање на клеточната мембрана и ослободување на честичките на бактериофагот. Во една бактеријска клетка настануваат 10 - 300 честички. Со распаѓањето на клетките завршува и процесот на размножување на бактериофагот. Со други зборови, размножувањето на бактериофагот не се врши со делба на клетката туку по пат на синтеза. Ваквиот начин на репродукција се запазува само кај зоопатогените и фитопатогените вируси (слика 24).



Слика 24. Животен циклус на бактериофагот

Наведениот начин на размножување може да се спроведе и воочи на цврста и течна хранлива подлога. Така, ако на бактеријата што се размножува на хранливата течна подлога ѝ се додаде бактериофаг, по извесно време подлогата станува бистра како знак на распаѓање на бактеријата, односно создавање бактериофагни честички.

Истото се случува и кога имаме изолација на бактериите на цврста хранлива подлога, со додавање на бактериофаги се забележува дека постепено доаѓа до исчезнување на бактеријските колонии, како резултат на синтетизирање на фагот. Така, под обичен светлосен микроскоп не се воочува бактериофагот, но нивното присуство може да се утврди со одредена лабораториска техника. Доколку во петриева кутија, во која претходно бил додадена цврста хранлива подлога, се разлие раствор во кој се наоѓаат осетливи бактерии и бактериофаги, по 12 или 24 часа може да се видат колонии на светли и рамни површини со тркалезен облик во пречник од 1 до 5 mm. Точкестите светли зони се јавуваат како резултат на дезорганизацијата на бактеријата настаната под дејство на бактериофагот (слика 25).



Слика 26. Бактериската клетка нападната од страна на честичките на фагот, набргу станува разградена

Ова се случува на следниов начин: Бактериската клетка нападната од страна на честичките на фагот, набргу станува разградена. Фагите настанати со разградувањето на оваа клетка ги напаѓаат соседните ненападнати бактерии кои со размножувањето перманентно настануваат, а кои подоцна исто така под дејство на бактериофагот се разорани - лизирани. Така, новите генерации на фагот сè повеќе го појачуваат своето деструктивно дејство во бактериската колонија што се развива, што на крајот доведува до појава на правилни кружни зони во кои бактериите повеќе не се размножуваат.

Специфичност на бактериофагот

Во однос на фитопатогените бактерии, фагите можат да бидат специфични или поливирулентни. Досегашните истражувања покажале дека бактериофагите од родот на бактерии *Xanthomonas* поседуваат изразени специфичности, делуваат само во склоп на една бактерија, додека пак бактериофагите од родот *Pseudomonas* се поливирулентни. Фагите *Xanthomonas* многу често се користат во идентификација на фитопатогените бактерии. Поливирулентните бактериофаги имаат за цел да го одредат степенот на сродност на фитопатогените бактерии, бидејќи делуваат на голем број бактерии.

Најмногу специфичности искажуваат бактериофагите од родот *Xanthomonas*, кои својата активност и специфичност ја искажуваат спрема поедини соеви на една иста бактерија. Поради нееднаквите лизогени способности, поединечните бактериофаги на некои видови бактерии се поделени на многу лизотипови. Таков е случајот со *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, паразит на оризот, каде што се констатирани 5 лизотипови. Ваквите лизотипови се воочени при инокулација на овие бактерии, а кај *Pseudomonas solanacearum* утврдени се дури 40.

Во зависност од природата на фагите, спектарот на нивниот домаќин може да биде широк или тесен. Покрај тоа, освен бактерии, растителни паразити, домаќини на бактериофагот, можат да бидат и некои сапрофитни бактерии што се наоѓаат во изумрено растително ткиво или во почвата.

Практична примена на бактериофагот

Отривањето на бактериофагот дало нова надеж во борбата против паразитните бактерии, како во областа на хуманата медицина, така и во полето на растителната патологија. Но, многу очекуваните резултати не се оствариле. Набргу се потврдило дека бактериофагот внесен во животинскиот организам наидува на дејство на антители. Така оваа голема надеж во поглед на новите можности на уништување на бактериските болести, настаната со новите откритија на бактериофагот, била залудна.

Меѓутоа, од 1940 година почнува нова етапа во развојот на бактериофагијата како дисциплина, која и денеска трае. Како што се воспоставило, бактериофагите станале многу погоден модел за многубројни истражувања. Во прв ред тие многу добро послужиле во поглед на истражувањата на вирусите. Бактериофагите имаат голема улога во областа на вирусологијата. Поновите истражувања во областа на генетиката ѝ придаваат на бактериофагите исто така големо значење, бидејќи лесно се одржуваат во културата, па можат да се користат за разни истражувања. Благодарение на нивната специфичност, денеска користењето на фагите нашло своја примена и во детерминацијата и докажувањето на патогеноста на бактериите. Истражувањата на некои автори отвораат нова етапа во полето на практичната примена на бактериофагот.

Како што претходно напоменавме, ако во течната бактериска култура се додаде специфичен фаг, по 24 часа настанува просветлување на бујонот, при што следи распаѓање на бактериските клетки. Ова е знак за еден сооднос помеѓу бактеријата и фагот и се користи за идентификација на бактериите. Но, постојат и такви бактериофаги кои на бактериската култура делуваат бавно, па наведениот бујон останува матен како резултат на резистентните форми на бактерии или пак, слабите вирулентни фагови.

Иако откритието за појавата на бактериофагијата е релативно ново, користењето на бактериофагот укажува на нивна примена во повеќе струки и области. Со помош на бактериофагот можеме лесно и брзо да ја одредиме заразата на семенскиот материјал, интензитетот на самата зараза, како и видот на причинителот, со што се избегнува постапката околу бројните изоляции на бактеријата и долготрајните методи околу нивната идентификација и проверка на патогеноста. Ако од заболеното растително ткиво се изолира сè уште неидентификувана бактерија и истата се засее на хранлива подлога во петриева кутија, а потоа се додава капка бујон во кој се наоѓа познат бактериофаг, ќе настане лизирање (бактериолиза) - разградување на бактериската колонија, што всушност се докажува со нејзиното исчезнување од подлогата. Тоа е знак дека изолираната бактерија е идентична на познатата бактерија, чиј бактериофаг е употребен за изведување на оваа реакција. Овие испитувања можат едноставно и брзо да се користат во секоја лабораторија. Потребно е само да се познава специфичноста на бактериофагот, барем на оние позначајните причинители на бактериози. Треба да се напомене дека и одржувањето на бактериофагот во лабораториски услови е многу лесно.

Освен во растителен организам, бактериофагите се констатирани и во почвата, отпадните води, бунарските води, реките и морињата. Нивната улога е од посебно значење за и во текот на размножувањето на фитопатогените бактерии, така што тие се појавуваат како значаен фактор при спречување на појавата на епифитициите на бактериозите. Бактериофагите на фитопатогените бактерии, освен своја примена во дијагнозата, можат да бидат значајни и во поглед на сузбивање на бактериозите. За жал овој начин на биолошка борба не нашол голема примена во заштита на растенијата, иако постојат примери на практични примени на бактериофагот, користени и во оваа намена, било да се работи за дезинфекција на семето или садниот материјал, или пак апликација во полски услови.

НАСТАНУВАЊЕ НА БОЛЕСТ КАЈ РАСТЕНИЈАТА

ТРИАГОЛНИК НА ЗАБОЛУВАЊЕ

ПАТОГЕН

Габи, бактерии,
вируси, фитоплазми,
спироплазми, рикеции

ДОМАЌИН

Култивирани
растенија,
Плевелна
вегетација

БОЛЕСТ

УСЛОВИ НА СРЕДИНАТА

Температура на воздухот

Тип на почва

Врнежи

Температура на почвата

pH на почвата

релативна влажност

ВЕЖБА БР. 10

ПАТОГЕНЕЗА НА БАКТЕРИОЗИТЕ (НАСТАНУВАЊЕ НА БОЛЕСТИТЕ)

Извори на инфекција

Настанување и развојот на една растителна болест е условена од повеќе фактори. За да дојде до настанување на болеста се потребни три основни услови: присуство на паразит, домаќин и поволни услови на средината (температура, влага и др). Болеста е патолошки процес кој настанува како резултат на меѓусебни дејства на паразитите и растението домаќин, условени од поволните еколошки фактори. Ако недостига некој од трите фактори, не доаѓа до настанување на болест кај растенијата. Ако го земеме домаќинот чие присуство се подразбира, интересно е прашањето каде се наоѓа паразитот пред да дојде до домаќинот. Со други зборови се поставува прашањето кои се извори на инфекциите, односно инокулумот во природата.

Со оглед на тоа дека многу патолошки видови се пренесуваат со семе, заболеното семе е основен извор на зараза. Инфекцијата на семето настанала во текот на вегетациониот период, за време на развој на растението, кога преку болните делови на растението, паразитот доаѓа до семето. На пример, *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* и *Pseudomonas syringae* pv. *atropfaciens* со заболените плевници стигнуваат до семето од пченица. Некои патогени како што се *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, навлегуваат во компирот преку столоните.

Ова се примери за ендогена зараза, кога паразитот се наоѓа во внатрешноста на семето. Меѓутоа и патогените кои се наоѓаат на надворешноста на семето може да претставуваат опасност за растенијата. Така при прибирање на заболените плодови, паразитот стигнува до површината на семето каде што ја задржува виталноста до следната вегетација, и на тој начин доаѓа до новите млади растенија.

Со пренесување на семето, бактериите се пренесуваат на големи далечини, во нови региони, па дури и континенти. Заболените калеме и овошен саден материјал, луковици од различни цвеќиња, како и инсектите, можат да бидат извори на инфекција. Така, преку калем-гранчињата кои се заразени можат да се пренесат неколку многу опасни паразити кај овошките (*P. s.* pv. *syringae*, *E. amylovora*), а со садници - рак на коренот (*A. tumefaciens*).

На изумрени заразени делови, листови, стебла или другите органи кои стигнуваат на површината на почвата или во почвата, бактериите ја задржуваат својата виталност подолго или пократко време. Доаѓајќи во контакт со домаќинот, вршат зараза на растенијата. Виталноста на паразитот се задржува подолго време ако паразитот се наоѓал на површината отколку во почвата. Во овој случај, должината на виталноста зависи од активноста на антагонистичните сапрофитни микроорганизми кои со своите продукти на метаболизмот делуваат негативно врз фитопатогенните бактерии, како и од длабочината на која се наоѓаат во почвата, од температурата и влагата на почвата, дејството на бактериофагите, од бројноста на бактериите и друго. Ако длабочината на почвата, температурата и влагата се поголеми, а популацијата на фитопатогените бактерии е помала, должината на животот на паразитите е пократка.

Одржувањето на паразитите во ткивото на растението зависи и од брзината на распаѓање на ткивото во кое се наоѓаат. Обично паразитот се наоѓа во ткивото сè до негово целосно распаѓање. При тоа дрвенестите делови на овошките се распаѓаат побавно во споредба со меките нежни делови на растенијата кои се распаѓаат побрзо.

На пример, *E. c.* ssp. *carotovora* подолго време се задржува во коренот отколку во листот на зелката. Некои видови фитопатогени бактерии може да се задржат во почвата одредено време без домаќин, како на пример *A. tumefaciens* и *R. solanacearum*.

Некои инсекти во кои бактериите презимуваат се значаен извор на зараза. На пример, *Erwinia stewartii* презимува во дигестивниот тракт на некои видови инсекти,

најчесто во болвите. Овие инсекти напролет, во потрага по храна, ја пренесуваат бактеријата од својот дигестивен тракт преку плунковите жлезди на здравите растителни ткива. Слична опасност претставува и маслиновата мува (*Dacus oleae*) во која презимува *P. s. pv. savastanoi*, причинител на рак на маслинките.

Инсекти како извор на зарази наоѓаме и кај паразитот *E. c. ssp. carotovora*, причинител на бактериска трулеж, кој презимува во телото на зелковата и луковата мува.

Навлегување и ширење на паразитот во текот на вегетацијата

Бидејќи изворите на зараза може да бидат различни се поставува прашањето како паразитот доаѓа во контакт со растението домаќин? На кој начин од изворот инокулумот доаѓа до домаќинот? Како паразитот се шири и остварува зарази по презимувањето, а како во текот на вегетацијата кај секундарните зарази кои се најчести и најопасни зарази во економски поглед?

Пренесувањето на патогените од нивниот извор до домаќинот се врши на повеќе начини во зависност од природата на бактеријата и нејзиниот извор. Најчести вектори се: човекот, инсектите и животните, водата и ветерот.

Веќе наведовме дека преку заразеното семе, корените, калемите и овошниот саден материјал претставуваат многу значајни извори на инокулум за културните растенија. Со користење на заболените органи, човекот помага со агротехничките мерки во голем број од случаите паразитот да дојде во допир до здравите растенија. Од заболено семе, кртола, калем, по правило ќе се развие болно растение.

Од болното семе ќе се развие болно младо растение. Слично се случува и при користење на заболени луковици на цвеќиња од каде што се пренесува паразитот на органите на младите растенија, предизвикувајќи различни промени. Така со употреба на заболени кртоли на компир или други растенија доаѓа го изумирање или заразување на млади, а потоа и постари растенија.

Со различните агротехнички мерки кои се извршуваат во текот на годината, човекот придонесува за ширење на болестите, овозможувајќи примарни и секундарни зарази во текот на вегетацијата, пр. при производство на расад, резидба итн. Во сите случаи на невнимание, човекот пренесува патогени од заболени на здрави растенија. Така, *P. tabaci* се пренесува на овој начин. Бактериите можат да се пренесат и со машините за работа на терен. На пример, *E. carotovora ssp. atroseptica* може да се задржи на машините за вадење компир и до една година, и така да се пренесува.

Ширењето на фитопатогените бактерии ја потпомагаат и многу инсекти како што се пчелите, осите и мувите, кои се многу активни вектори на овие паразити. Многу од нив често механички пренесуваат болести, бидејќи со делови од телото допира до заболените делови и ги пренесува бактериите. Типичен пример е *E. amylovora*, предизвикувач на бактериска пламеница кај јаболка и круши. Во период на цветање на овошките ги посетуваат многу инсекти, меѓу кои најактивни се пчелите.

Ова пренесување на бактериите преку инсекти има и посложен облик. Така на пример некои бактерии презимуваат во телото на инсектите. Во потрага по храна, овие инсекти пренесуваат бактерии на здрави ткива и предизвикуваат примарни зарази. Инсектите шират и секундарни зарази. Познат е случајот на појава на *E. stewarti* кај пченката во случај на поголеми појави на болви, во чие тело овој паразит презимува. Или пак, при поголема појава на рак на маслинките, при пренамножување на маслиновата мува.

Појавата на бактериози се поврзува и со појавата на нематодите, кои можат да бидат вектори на некои фитопатогени бактерии, а во градинатството бактериите ги пренесуваат и глодачите. Ширењето на бактериите го потпомагаат и други организми, како што се птиците. Тие пренесуваат поединечни заболени плодови на поголеми далечини.

Појавата на бактериската пламеница кај јаболка и круша (*E. amylovora*) во Данска и Холандија се поврзува со паразитот од Англија со посредство на некои видови птици.

Дождовните капки, односно водата е значаен вектор на фитопатогените бактерии. Бидејќи бактериите се наоѓаат на површината на заболените ткива во вид на ескудат, преку капките се пренесуваат на поголеми или помали далечини. При дождови, капките се одбиваат и ги пренесуваат бактериите на здравите ткива или на соседните растенија. Доколку има и ветер, растојанието може да биде и поголемо. На овој начин се пренесуваат бактериите кои причинуваат дамкавост на листовите.

И водата која служи за наводнување на различни посеви, како и водените текови, како што се реките, пренесуваат патогени од заболените остатоци од растенијата. Со наводнување се пренесуваат од една на друга парцела, а преку реките и подалеку. Меѓутоа, одржувањето на виталноста на бактериите во ваква вода е кратко, околу 10-тина дена. Ветрот нема голем удел во пренесувањето на бактериите, бидејќи овие паразити немаат спори, што на овој начин би се пренеле, како што е во случајот со габите. Според тоа, овој начин на пренесување на бактериските клетки со помош на ветерот има значење само во случај на истовремена комбинација на дожд и ветар, бидејќи бактериите на тој начин се наоѓаат во водените капки.

Инфекција, инкубација и појава на симптоми

При контакт со домаќинот, во присуство на поволни еколошки фактори, бактериите остваруваат зарази на растенија. Специфичноста кај овие паразити условила и специфичност на самиот механизам на инфекција. Поради своите особини, бактерите не се во состојба да навлезат директно во домаќинот како габите и да се населат во домаќинот. Патогените бактерии не поседуваат ферменти со чие дејство би дошло до разложување на клеточните мембрани и директно да навлезат во растението, односно во поединечните клетки и ткива. Населувањето на бактериите во ткивото се одвива на 2 начина:

- низ природни отвори;
- низ повреди на растението.

Природни отвори - стоми, хидатоди и лентицели се најчести влезови на бактериите во растението. Најголема улога имаат стомите бидејќи бактериите најчесто навлегуваат преку нив. Бидејќи водата е основен услов за инфекција, бактериите на пасивен начин, преку капките, навлегуваат во стомите на листовите. Подвижните бактерии поседуваат флагели со чија помош се движат во капката вода и продираат директно во стомите и меѓуклеточните простори на ткивото, низ кои се шират низ целото растение. Навлегувањето преку стомите е карактеристично за причинителите на лисна дамкавост.

Некои видови фитопатогени бактерии навлегуваат и преку хидатодите. На пример *X. campestris* pv. *campestris*, причинител за црното гниење на зелката. Оваа бактерија пренесена со инсекти на листот на зелката доаѓа во гутациска капка, а потоа при намалена транспирација се вовлекува во хидатодите. Од таму продираат во околните ткива и во спроводните садови како што е ксилемот, преку кој се шири предизвикувајќи прво хлороза, потоа потемна до црна боја.

Поминувањето на бактериите низ лентицелите во кората на дрвенестите растенија се врши низ проширени лентицели како кај коренот (*A. tumefaciens*) и низ окцата на кртолите на компирот *E. c. ssp. carotovora* предизвикувајќи влажно гниење.

Механички повреди од разна природа настанати под дејство на биотски и абиотски фактори, исто така претставуваат важен пат преку кој бактериите навлегуваат во растенијата. Овој начин на навлегување го применуваат полифагните бактерии. Меѓутоа специјализираните паразити ги користат природните отвори. Типичен пример за навлегување на бактерија преку повреда е полифагната бактерија *E. c. ssp. carotovora* која особено навлегува преку повреди од град. Многу инсекти го оштетуваат растителното ткиво и низ повредите навлегуваат бактерии. Различни зафати, како што е калемењето, овозможуваат патогенот да навлезе во растението.

Влегувајќи во ткивото на домаќинот, бактериите започнуваат со својот начин на исхрана. Нивниот понатамошен развој зависи од видот на паразитот. Сите патогени бактерии делуваат со својот ферментациски систем на клетките и ткивата на домаќинот, разградувајќи ги поединечните состојки, подготвувајќи си себе храна за пораст и репродукција. По навлегувањето во ткивото, најголем број видови се шират во меѓуклеточниот простор и спроводните садови. Ширењето и развојот на бактериите обично е локализирано на паренхимското ткиво, зафаќајќи ги клетките околу заразеното место.

Во ретки случаи, преку расителниот сок се шират на поголеми растојанија, како трахеобактериозите на пример. Од моментот на инфекција до појава на симптомите треба да помине различно време. Овој инкубациски период обично трае неколку дена, обично 2, 4, 7 или 10 дена, па и повеќе. Инкубацијата може да биде и подолга и тоа зависи од температурата во постинфекцискиот период. Така кај *P. s. pv. translucens* на температура од 10 °C, инкубацискиот период трае 8 дена, а на температура од 20 °C трае 2 дена.

Температурата не само што влијае врз должината на инкубацијата туку и на тоа дали ќе се појават симптоми, односно дали ќе се развие болеста. Врз должината на инкубацискиот период влијаат и други фактори, како што се влажност, светлина, исхрана и др., како и внатрешни фактори, како што е периодот на мирување, видот на растението итн. По завршување на инкубацискиот период, како резултат на паразитската активност се појавуваат симптоми или знаци на болеста. Симптомите можат да бидат многу различни.

ВЕЖБА БР. 11

ВЛИЈАНИЕТО НА ЕКОЛОШКИТЕ ФАКТОРИ НА ПАТОГЕНЕЗАТА

За да се развие една болест, освен присуство на паразит и домаќин, потребни се и други услови, како од надворешната средина така и во самото растение. Според тоа, текот и развојот на една болест зависи од биотски и абиотски фактори.

Абиотски фактори

Температура. Оптимална температура за развој на повеќето бактерии се движи од 20 до 25 °C. Минимална граница е од 0 до 2 °C, а максимална од 35 до 37 °C. Летална точка за поголем број видови е од 45 до 55 °C. Повисока критична температура имаат само неколку видови, како на пример *X. c. pv vesicatoria*, предизвикувач на краставост на плодовите на домотот.

Фитопатогените бактерии бараат нешто повисока температура во однос на габите. Постојат и спротивни случаи каде што бактериите можат да се развијат и на пониска температура.

Познавањето на температурните барања има значење во спречувањето на заразите. За да се спречи ширењето на некоја болест, доволно е да се измени температурата во просторот каде што се одгледуваат растенијата. Температурата го одредува ареалот на распространетоста на некои бактерии. На пример, *Pseudomonas solanacearum* има висок температурен оптимум и поради тоа е распространет во тропски и суптропски региони. Во умерени региони болеста послабо се развива.

Температурата влијае како врз бактеријата така и врз домаќинот. Во првиот случај може да влијае позитивно или негативно, односно овозможува или спречува развој на бактериите. Во другиот случај, влијае врз растенијата, односно врз степенот на отпорност, при што отпорноста се зголемува или намалува.

Температурниот оптимум за развој на *P. s. pv syringae* се движи од 15 до 20 °C, иако овој вид може да се развие и на 1 °C, што кај бактериите е редок случај. При силен напад на оваа бактерија кај citrusните овошки се јавуваат некротични промени во рана пролет или доцна еден, кога овошките не се закрепнати од зимниот студ и не се отпорни.

Бактеријата *P. syringae pv. syringae* во поволни услови може да предизвика апоплексија на кајсијата. Поради својот поширок температурен интервал, оваа бактерија се развива во доцна еден, во потопли денови. Со опаѓање на температурата, овошките имаат помала отпорност и тоа овозможува брзо ширење на болеста.

Влијанието на мразот го одредува правецот на ширење на паразитите. Инфекциите настанати наесента и во текот на зимата доведуваат до изумирање на дрвцата, а инфекцијата настаната во текот на вегетацијата се манифестира само во ксилемот. Во вториот случај се зафатени само делови од растенијата, инфекцијата има локален карактер, бидејќи здравите ткива создаваат нови клетки со кои се санира штетата. Во тој случај практично нема штета, иако постои инфекција. Заразениот камбиум не е во можност да формира ново ткиво и овошката се суши и изумира. Сличен пример имаме и кај зелјестите растенија. Посилен напад од *Clavibacter michiganensis ssp. insidiosus* кај луцерката е поврзана со мразот. Затоа селекцијата на отпорни сорти на луцерка е една од мерките за борба против овој паразит.

Влажност. Освен температурата, и влажноста е еден од важните услови кои делуваат како на паразитот, така и на растението. Најголем дел од бактериите се развиваат на повисока влага. Високата влажност има значење за остварување на инфекција која ја нема без присуство на капка вода. Ретки се оние видови кои можат да извршат зараза без капка вода. Капките при допир со заразено ткиво го пренесуваат паразитот на други растенија со помош на ветрот. Преку реките, паразитот се пренесува и на поголеми далечини.

Надвор од растенијата, во недостаток на влага, бактериите ја губат својата виталност. Од друга страна, влажноста влијае и врз растенијата, така што ја зголемува или намалува отпорноста спрема паразитот. При повисока влажност ткивата се поосетливи и обратно. Неколку примери се констатирани кај прстенестото гниење на компирот. Се јавува во години и места каде што пред собирање на кртолите на семенскиот компир биле во водени талози. Дождливото време во тек на вадење на компирот овозможува патогенот да се пренесе од болни на здрави кртоли и наредната година се зголемува степенот на зараза, особено ако и пролетта е врнежлива.

Имајќи го ова предвид, кај компирот може да се предвиди интензитетот на болеста во наредната вегетација. Со сушење на влажните кртоли по вадењето се спречува посилна појава на болести наредната вегетација. *P. s. pv. tabaci* се развива по дожд поради зголемената осетливост на домаќинот по обилни дождови. Високата почвена влага исто така поволно влијае врз развојот на некои фитопатогени бактерии во почвата.

Како што се гледа, влагата е важен еколошки фактор кој делува врз паразитот и врз домаќинот. Ретки се оние бактерии кои можат да направат инфекција без капка вода. Но и во тој случај влагата во воздухот мора да биде висока. Кај таквите паразити ако се намали влагата во воздухот не доаѓа до зараза. Според тоа, при влажно време доаѓа до силни зарази, а на суво време штетите не се значајни.

Има и спротивни примери кои говорат за широката амплитуда на влага во која бактериите се развиваат. На пример *X. c. pv. undulosa*, причинител на пругавост кај пченицата, се развива од 50 до 100 % влажност. Или *E. c. ssp. carotovora* поседува помали барања во поглед на влажноста. Овој паразит се развива од 20 до 100 % релативна влажност, поради што неговиот развој зависи од температурата, а не од влагата.

Овие фактори, температурата и влагата, не можеме да ги гледаме одделно, затоа што заедно делуваат на развојот на болестите. Така, причинителот на бактериската дамкавост кај краставицата, *P. s. pv. lachrymans*, се развива само при температура од 19 до 24 °C, во присуство на капки вода. Промената на овие услови - зголемена температура и намалена влага, може да го спречи развојот на овој паразит во оранжериите. Епифитотичната појава на бактериската краставост на плодовите на доматиот чии причинител е *X. c. pv. vesicatoria*, се поврзува со поволни услови, температура и влажност, бидејќи за да дојде до зараза неопходни се чести дождови и средно годишна температура повисока од 18.5 °C.

Ветер. И ветерот може да има влијание како врз паразитот така и врз растението, делувајќи заедно со другите фактори во процесот на патогенеза. Ветерот ги пренесува заболените делови од растенијата на помала или поголема далечина и на тој начин ги пренесува паразитите. Исто така, ветерот ги пренесува дождовните капки кои можат да бидат заразени со бактерии. Со движењето на листот под влијание на ветерот, бактериите навлегуваат во подлабоките отвори на стомите.

Ветерот ја намалува температурата и влагата на воздухот и со тоа влијае врз развојот на бактериите кои имаат ограничени барања во однос на овие услови.

Намалената влага ја оневозможува инфекцијата. Исто така високите температурни барања кај одредени бактерии кои се наоѓаат на места каде што има ниски температури доведуваат до неповолни услови за развојот на тие бактерии. Ветерот негативно влијае врз болните растенија со заболен корен или спроводни садови, на тој начин што ја зголемува транспирацијата.

Тој предизвикува механички повреди низ кои навлегуваат бактерии, на пример кај зелјестите растенија кои можат да бидат повредени од честичките од песок кои го носи ветрот.

Светлина. Сите бактерии брзо ја губат својата виталност под влијание на директно сончево зрачење, со тоа што бактериите кои имаат жолти пигменти се поотпорни. Присуството на пигментите - каротеноидите во клеточните сидови ги штити

овие паразити од неповолното дејство на ултравиолетовите зраци. Тоа веројатно е и причината поради што големиот дел од фитопатогените бактерии со жолти колонии ги паразитираат надземните органи, додека бактериите со бели колонии ги паразитираат подземните делови на растенијата.

Бактериите со жолти колонии се многу поотпорни на ултравиолетови зраци во однос на бактериите со бели колонии. Така на пример, бактеријата *X. c. pv. malvacearum* го паразитира памукот кога е изложена на директно зрачење, по 30 минути ја губи својата виталност, а *E. carotovora ssp. atroseptica* по 5 минути. Освен што делуваат на паразитот, светлосните зраци делуваат и на растението. Така растенијата одгледувани без светлина се помалку отпорни, послабо се развиваат итн.

Почва (воден режим, аерација и исхрана на растението). И почвата како средина има одредено влијание, како врз поединечни видови бактерии така и врз растенијата, делувајќи заедно со останатите еколошки услови на развојот на болестите. Со својата структура, плодност, воден режим, аерација, како и хранливите материи, почвата влијае врз развојот на растенијата и на нивната отпорност.

Растресита и плодна почва овозможува добар развој на растенијата и нивна отпорност спрема паразитите. И обратно, во тешки, збиени почви е послаб развојот на растенија. Значи со добра агротехника на растенијата им се овозможува подобар развој и поголема отпорност спрема болести. Има и обратни ситуации. Поголемо нагубрување го помага развојот на *X. fragariae*, паразит на јагодите и *E. stewartii* кај пченката. При тоа, азотните ѓубрива во поголем дел од случаите поволно делуваат врз развој на болестите, додека калиумовите и фосфорните имаат обратно дејство. Збиена влажна почва овозможува развој на оние паразити кои имаат поголеми барања во однос на влагата.

ВЕЖБА БР. 12

БИОТСКИ ФАКТОРИ ЗА НАСТАНУВАЊЕ НА БОЛЕСТ КАЈ РАСТЕНИЈАТА

Инсекти и други животински организми. Развојот на поединечни бактерии често е поврзан со појавата на одредени инсекти и други организми. Овој однос најчесто е од механичка природа каде што инсектите се појавуваат како вектори - преносители на паразитите до растенијата. Оваа врска може да има и посложена природа, па дури и да има и симбионтски карактер. Најчесто бактериите презимуваат во телата на инсектите.

Напролет, во потрага по храна, повредувајќи ги растителните органи, инсектите пренесуваат зарази на здравите растенија, при што интензитетот на болеста зависи од преживеаните инсекти. На пример, *Chaetocnema* spp. во чие тело презимува *E. stewartii* или различни видови од родот *Diptera* во чии тела презимуваат, но имаат и симбионтски однос. Така, кромидовата и зелковата мува се преносители на бактеријата *E.c. ssp carotovora*, причинувајќи гниење на зелката и кромидот.

Развојот на некои бактериози го помагаат и нематодите како вектори или влијаејќи само врз инфекцијата од страна на паразитите. Таква врска е воочена кај *S. rathayi* (паразит на пченицата, јачменот и други жита), каде што инфекцијата се поврзува со нематодата *Anguina tritici* и каде што е воочен симбионтски однос.

Почвена микрофлора. Сапрофитните видови на габи и бактерии, како редовни жители во почвата, негативно влијаат врз почвените бактерии. Стигнувајќи во почвата, овие паразити брзо ја губат својата виталност поради конкурентските односи и активности на почвената флора. Сапрофитните паразити со своите метаболитички продукти, антигонистички делуваат на фитопатогените бактерии. Ретки се случаите кога има толерантност помеѓу паразитните и сапрофитните организми во почвата. Освен тоа, разлагањето на органските материи ја зголемува температурата во почвата, ја менува рН-средината, главно неповолно влијае врз фитопатогените бактерии.

Паразитни габи и вируси. Ако на истото растение се најдат фитопатогените габи и бактерии, нивниот однос е доста сложен. Во повеќето случаи оној патоген кој прв ќе дојде до растението создава поволни услови за развој на друг патоген. Нападнатото растение има помала отпорност. Напаѓајќи исти органи кои ги паразитираат и бактериите, габите главно отвораат пат за подоцнежни продирања на фитопатогените бактерии. Нарушувајќи ги покривните ткива на растенијата, габите овозможуваат инфекција и од страна на бактериите. Исто така, габите со своите спори, кои ги разнесува ветерот или некој друг вектор, ги пренесуваат бактериите ако се наоѓаат на површината на споменатите органи. На пример, габата од родот *Colletotrichum* врши зараза на краставицата низ неотштетената покожица на плодот. Повредите настанати како резултат на оваа инфекција служат како отвори за влез на бактеријата *P. s. pv. lachrymans*. Бактериите на површината на спорите од габите се пренесуваат подалеку од нивните домаќини. Или пак, предизвикувачите на црната 'рѓа кај пченица *P. graminis* f. sp. *tritici*, паразитирајќи на пченицата создаваат услови за развој на суперпаразитната бактерија *Pantoea ananas* (*Erwinia uredovora*).

Има и обратни случаи каде што фитопатогените бактерии навлегуваат прво во ткивата или органите на домаќинот подготвувајќи го теренот за развој на паразитните габи. Овие случаи на големи појави од видовите на *Alternaria* и *Mascrosporium* се во врска со претходните инфекции од страна на бактериите.

И помеѓу растителните вируси и фитопатогените бактерии можат да бидат воспоставени одредени односи. Како што бактериите се пренесуваат со спорите на габите, така и вирусите можат да бидат пренесени со помош на бактериите.

Во допир на бактеријата со вирусно заболеното растение, таа го пренесува вирусот од заболеното на здравото растение, при што истовремено се развиваат

симптоми, како бактериози така и вирусни. Вирусот се задржува на површината на бактеријата и по неколку пресејувања на бактеријата. Значи, потребно е да се спомне дека и сапрофитните бактерии кои се наоѓаат на површината на вирусните растенија исто така можат да апсорбираат вирусни честички и така да ги пренесуваат од едно на друго растение.

Овој однос помеѓу фитопатогените бактерии и вирусни честички не се состои само од пренесување на бактеријата, туку и вирусите се размножуваат во нивните клетки. На крајот, интензитетот на појавата и ширењето на одделните бактериози се поврзани со присуството на бактериофаги - специфични вирусни честички кои со својата активност неповолно делуваат на фитопатогените бактерии.

Наоѓајќи се во разни средини: заболени листови, семе и други растителни органи, како и во почвата, честичките на бактериофагите доаѓаат во допир со бактеријата, дезорганизирајќи ја до таа мера што бактериските клетки потполно се распаѓаат и исчезнуваат. На тој начин, дејството на бактериофагите врз клетките на фитопатогените бактерии ја намалуваат популацијата од овие паразити на растението, а со тоа и опасноста од зараза се намалува.

КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Arsenijevic M. (1997): Bakterioze biljaka. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Arsenijevic M. (1975): Bakterioze biljaka, 51-52, 60-61. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Arsenijevic M., Sutic D., Panic M. (1971): Jugoslovenska bibliografija o biljnim bakteriozama. Savremena poljoprivreda 6, 83-88, Novi Sad.
- Bradbury J.F. (1981): Bacterial Plant Pathogens. Review of Plant Pathology 60, 8: 373-376.
- Clarence I. Kado (2010): Plant Bacteriology. The American Phytopathological Society.
- Harveson R. (2015): The bacterium of many colors.
- Nayward A.C. (1974): Latent infections by bacteria. Ann. Rev. Phytopath. 12:87-97.
- Kado C.J., Heskett M.G. (1970): Selective media for isolation of Agrobacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xanthomonas. Phytopath. 60: 969-976.
- Klement Z. (1970): Bacteriology. In: Methods in Plant Pathology.
- Lelliott R.A., Billing E., Hayward A.C. (1966): A Determinative Scheme for the Fluorescent Plant Pathogenic Pseudomonads. J. App. Bact. 29, 470-488.
- Sutic D., Panic M. (1969): Metode proucavanja fitopatogenic bakterija. Zavod za zaštita bilja Poljoprivredni fakultet i Sekretarijat za poljoprivredu, šumarstvo i vodoprivredu. Beograd.

Прилог: Лабораториска петриева кутија со инкубиран бактериски изолат од *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum* – по нова таксономија на видот), засеан од студент на Земјоделски факултет - Штип.

Убаво е и креативно кога теоријата ќе се спои со практика и имагинацијата на младиот студентки ум.

Продолжете да истражувате и да бидете неуморни и вредни, затоа што трудот секогаш резултира со плод!



Од авторите



ISBN 978-608-244-594-6