

BIOLOG – NOV SISTEM ZA DOLOČANJE FITOPATOGENIH IN DRUGIH PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJ

Marta ŠABEC PARADIŽ¹

Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Za identifikacijo bakterij se lahko uporabljajo različne metode. Odgovor na vprašanje ali je neka rastlina okužena z neko določeno bakterijo iščemo z uporabo hitrih metod, specifičnih za iskani organizem. Take so ciljno usmerjene imunološke reakcije ali molekulske metode z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov. Pri iskanju odgovora na vprašanje, kateri organizem je zastopan v vzorcu, pa je potrebno uporabljati bolj splošne metode. Take so npr. analiza profila maščobnih kislin ali proteinov v bakterijskih celicah in splošne molekulske metode (RFLP). Te zahtevajo drago opremo, izkušen kader in so primernejše, kadar analiziramo veliko število vzorcev. Tradicionalne metode so cenejše, vendar zahtevajo veliko dela in so dolgotrajnejše. Biolog z novim pristopom poenostavlja, standardizira in pospešuje klasične postopke testiranja metabolnih značilnosti izolatov. Na Kmetijski inštitut Slovenije pogosto prihajajo posamezni vzorci različnih rastlin, pri katerih so bolezenska znamenja lahko posledica okužbe z različnimi bakterijami. Večina fitopatogenih bakterij se po Gramu barva negativno, zato nam Biologov GN sistem bistveno olajša identifikacijo teh bakterij. Pri uvajanju sistema v preteklem letu smo z njim določili fitopatogene bakterije v glavnem iz rodov *Agrobacterium* in *Xanthomonas*. Sistem pa je primeren tudi za identifikacijo po Gramu negativnih bakterij, izoliranih iz drugih okolij, npr. s površine zdravih rastlin, iz živali, ljudi, voda ali tal.

Ključne besede: identifikacija bakterij, metabolni profili, Biolog

ABSTRACT

BIOLOG – A NEW SYSTEM FOR DETERMINATION OF PHYTOPATHOGENIC AND OTHER GRAM NEGATIVE BACTERIA

Different methods can be used for identification of bacteria. The answer on the question if a plant is infected with a certain bacteria can be obtained by the use of rapid methods, specific for the concerned organism for example targeted immunological tests or molecular methods with use of specific primers. In search for the answer on the question which organism is present in a sample more general methods must be used. Cell fatty acids or proteins profiling and general molecular methods like restriction fragment length polymorphism are the possibilities. Expensive equipment and specialized personal is needed and they are suitable for testing larger quantities of samples. Traditional methods are less expensive, but they are laborious and time-consuming. New approach developed by Biolog Inc. is speeding, simplifying and standardizing the classic processes of metabolic characterization of isolates. Single sam-

¹ univ. dipl. inž. agr., SI-1000 Ljubljana, Hacquetova 17

ples of different plants with symptoms that can be caused by a variety of bacteria are often received at the Agricultural institute of Slovenia. Since most of the phytopathogenic bacteria are Gram negative the Biolog GN system facilitates identification of these bacteria. While introducing the system in the last year phytopathogenic bacteria, mostly from the genera *Agrobacterium* and *Xanthomonas*, were determined. The system is also suitable for identification of Gram negative bacteria isolated from other sources like surfaces of healthy plants, from animals and humans, from water or soil.

Key words: bacterial identification, metabolic profiles, Biolog

1. UVOD

Na področju zdravstvenega varstva rastlin je eden izmed ciljev tudi razvoj ustrezne laboratorijske diagnostike za fitopatogene bakterije, saj vizualna determinacija povzročitelja na osnovi bolezenskih znamenj, ki jih povzročata na rastlinah, ne zadošča: podobna bolezenska znamenja lahko na isti rastlini povzroči več povzročiteljev, prav tako lahko povzročitelj povzročata na različnih rastlinskih vrstah različna bolezenska znamenja.

Večina bakterij, ki so patogene za rastline je aerobnih ali fakultativno anaerobnih in se po Gramu barvajo negativno (10). Prvi korak pri identifikaciji fitopatogene bakterije je običajno izolacija čiste kulture povzročitelja, čemur sledi določanje njegovih lastnosti in identifikacija (7). Pri tem lahko uporabljamo številne metode, ki se med seboj razlikujejo po zanesljivosti, trajanju, zahtevnosti in ceni (8).

Za izolacijo čiste kulture je, odvisno od vrste bakterije in razpoložljivosti selektivnih gojišč, običajno potrebno od 6 do 20 dni (6).

Čas, potreben za identifikacijo, je odvisen od metode, ki jo uporabljamo. Večja specifičnost metode za posamezno vrsto bakterije, njen patovar ali biovar ponavadi pomeni tudi hitrejšo identifikacijo. Za serološke (ELISA, IF...) ali specifične molekularne metode (PCR) je potrebnih le nekaj ur do nekaj dni, vendar moramo imeti na voljo določena protitelesa ali začetne oligonukleotide. Zelo hitre so tudi bolj splošne sodobnejše metode, kot so določanje profila maščobnih kislin, proteinskega profila bakterijskih celic ali polimorfizmov dolžin fragmentov nukleinskih kislin, dobljenih z restrikcijskimi encimi. Take analize lahko opravlja le visoko usposobljeno strokovno osebje, potrebne pa so tudi drage aparature. Klasične metode identifikacije, pri katerih pod mikroskopom in z opazovanjem reakcij ob rasti na različnih gojiščih, določamo morfološke, številne biokemične in fiziološke lastnosti bakterij so cenejše, a dolgotrajnejše. Trajajo od 1 do več tednov. Za pospešitev teh metod so razvili različne sisteme, s katerimi določamo metabolne značilnosti bakterij. Najbolj razširjen je API, v zadnjih letih pa tudi Biolog (1, 8).

Za dokončno potrditev rezultatov laboratorijskih analiz je ponavadi potrebno še testiranje patogenosti bakterijskih izolatov, kar se je v praksi prav tako pokazalo kot zelo variabilno: traja lahko od nekaj dni do več mesecev (4, 9). Ko neko patogeno bakterijo dokažemo prvič ali ko rezultati analiz niso nedvoumni pa jo je potrebno poslati še v analizo v drug laboratorij.

Zaradi narave dela na Kmetijskem inštitutu Slovenije dobimo zaradi prizadetosti v analizo zelo različne vrste rastlin, pri katerih so tudi povzročitelji boleznih lahko zelo različni. V preteklih letih smo razvili več metod za izolacijo čistih kultur mnogih fitopatogenih bakterij. Pri odločanju o razvoju in izbiri metod za njihovo identifikacijo smo se odločili za uvajanje sistema Biolog.

Biolog poenostavlja in standardizira klasične postopke identifikacije za določanje metabolnih značilnosti bakterij. S suspenzijo bakterijskih celic nacepimo luknjice na mikrotitrski ploščici, ki vsebujejo gojišča z različnimi viri ogljika: sladkorji, alkoholi,

organskimi kislinami, amino kislinami in različnimi polimeri. Oksidacija substrata se odrazi v redukciji brezbarvnega tetrazolijevega barvila, ki ga vsebuje gojišče, v temno rdeč do vijoličen formazon. Ob 95 različnih virih ogljika, se po inkubaciji na mikrotitrski ploščici oblikuje za testirano bakterijo značilen vzorec rdeče obarvanih in brezbarvnih luknjic. Računalniška programska oprema omogoča primerjavo metabolnega vzorca testirane bakterije z vzorci bakterij v bazi podatkov in njeno identifikacijo. Rezultate primerjave poda z navedbo 10 najbolj verjetnih bakterijskih vrst ter različnimi statističnimi izračuni verjetnosti pravilnosti identifikacije in podobnosti testirane bakterije z istovrstnimi bakterijami v bazi podatkov v obliki preglednic in histogramov (1, 3). Sistem Biolog je primeren zlasti kadar je število vzorcev, ki jih testiramo, majhno in bi bilo zato uvajanje bolj specifičnih metod za vsakega posameznega patogena predrago in kadar je hkrati potrebno biti sposoben določiti veliko različnih vrst bakterij. Poleg tega je identifikacija sorazmerno hitra: od izolacije čiste kulture traja 2-3 dni.

2. MATERIALI IN METODE

V letu 2000 smo ob uvajanju in preizkušanju sistema Biolog testirali 25 čistih kultur po Gramu negativnih paličastih bakterij. 4 so bili referenčni ali tipski sevi, ostale pa smo izolirali iz vinske trte, zelja, fižola in paprike zaradi suma, da so povzročitelji različnih rastlinskih bolezni iz rodov *Agrobacterium*, *Pseudomonas* in *Xanthomonas*. Determinirali smo jih po predpisanem standardnem protokolu sistema Biolog (1):

- barvanjem bakterijskih sevov po Gramu (5)
- inkubacijo čiste kulture na gojišču BUG 24 ur pri 30 oC,
- suspendiranjem bakterij v inokulacijski tekočini GN/GP-IF do primerne koncentracije (53 % transparenca na turbidimetru),
- nacepljanjem luknjic z gojišči na mikrotitrski plošči GN2 s 150 µl pripravljene bakterijske suspenzije,
- inkubacijo mikrotitrške plošče 6 do 24 ur pri 30 oC,
- vizualnim odčitavanjem biokemičnih reakcij bakterije na gojiščih mikrotitrške plošče,
- vnašanjem rezultatov odčitavanja v računalniško bazo podatkov za po Gramu negativne bakterije in
- interpretacijo rezultatov in identifikacijo testiranih bakterij.

3. REZULTATI

Vse testirane referenčne seve smo določili z zadovoljivo verjetnostjo: 2 kot *Agrobacterium tumefaciens*, 1 kot *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in 1 kot *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*.

Med 4 sumljivimi bakterijskimi izolati iz 2 vzorcev vinske trte smo iz vsakega vzorca po 1 izolat z dovolj veliko verjetnostjo identificirali kot *A. tumefaciens*. Prav tako smo enega od 2 izolatov iz vzorca zelja določili kot *X. campestris* pv. *campestris*.

Okužbe vzorcev fižola s karantensko bakterijo *Xanthomonas campestris* (*axonopodis*) pv. *phaseoli* s sistemom Biolog nismo mogli z gotovostjo potrditi, prav tako tudi ne okužbe s *Pseudomonas savastanoi* (*syringae*) pv. *phaseicola*. Bakterije, izolirane iz 5 vzorcev fižola smo zato poslali v analizo v tujino.

Bakterija, izolirana iz paprike, ni bila povzročiteljica bakterioze *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Natančnejši podatki o rezultatih testiranj izolatov sumljivih bakterij so prikazani v preglednici 1.

Preglednica 1: Rezultati določanja 25 bakterijskih izolatov s sistemom Biolog

Sum na	Identifikacija in njena verjetnost	Malo verjetne druge bakterije
1* <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i> , 100 %	<i>A. rhizogenes</i>
2* <i>A. tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i> , 100 %	<i>A. rhizogenes</i>
3 <i>A. tumefaciens</i>	Brez verjetne identifikacije	<i>Flavobacterium</i> , <i>Aeromonas</i> ,
4 <i>A. tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i> , 99 %	<i>A. rhizogenes</i>
5 <i>A. tumefaciens</i>	<i>A. tumefaciens</i> , 100 %	<i>A. rhizogenes</i>
6 <i>A. tumefaciens</i>	Brez verjetne identifikacije	<i>Pseudomonas</i>
7** <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>poinsettiicola</i> , 75 %	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , 9 %
8 <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> , 100 %	Patovarji <i>X. campestris</i>
9 <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>Flavobacterium</i> , 58 %	<i>Chryseobacterium</i> sp.
10 <i>Xanthomonas campestris</i> (<i>axonopodis</i>) pv. <i>phaseoli</i>	le <i>X. campestris</i> , različni pv., 0 – 99%	<i>X.c.c.</i> pv. <i>phaseoli</i> 0 %
11 <i>X. campestris</i> (<i>axonopodis</i>) pv. <i>phaseoli</i>	le <i>X. campestris</i> , različni pv., 0 – 91%	<i>X.c.c.</i> pv. <i>phaseoli</i> 1%
12 <i>X. campestris</i> (<i>axonopodis</i>) pv. <i>phaseoli</i>	le <i>X. campestris</i> , različni pv., 0-67 %	<i>X.c.c.</i> pv. <i>phaseoli</i> 0%
13 <i>X. campestris</i> (<i>axonopodis</i>) pv. <i>phaseoli</i>	le <i>X. campestris</i> , različni pv., 0 %	<i>X.c.c.</i> pv. <i>phaseoli</i> 0%
14 <i>X. campestris</i> (<i>axonopodis</i>) pv. <i>phaseoli</i>	le <i>X. campestris</i> , različni pv., 0 %	<i>X.c.c.</i> pv. <i>phaseoli</i> 0%
15 <i>Pseudomonas savastanoi</i> (<i>syringae</i>) pv. <i>phaseicola</i>	le <i>P. syringae</i> , različni pv., 0 %	
16 <i>P. savastanoi</i> (<i>syringae</i>) pv. <i>phaseicola</i>	<i>P. viridiflava</i> , 0-99 %	le <i>Pseudomonas</i> sp.
17 <i>P. savastanoi</i> (<i>syringae</i>) pv. <i>phaseicola</i>	<i>P. fulva</i> , 99%	le <i>Pseudomonas</i> sp.
18 <i>P. savastanoi</i> (<i>syringae</i>) pv. <i>phaseicola</i>	<i>P. maculicola</i> , 99 %	le <i>Pseudomonas</i> sp.
19 <i>P. savastanoi</i> (<i>syringae</i>) pv. <i>phaseicola</i>	<i>P. maculicola</i> , 100 %	le <i>Pseudomonas</i> sp.
20 <i>P. savastanoi</i> (<i>syringae</i>) pv. <i>phaseicola</i>	le <i>P. syringae</i> , različni pv., 0-100%	pv. <i>phaseicola</i> 0-5 %
21 <i>P. savastanoi</i> (<i>syringae</i>) pv. <i>phaseicola</i>	le <i>P. syringae</i> , različni pv., 0-100%	pv. <i>phaseicola</i> 0 %
22 <i>P. savastanoi</i> (<i>syringae</i>) pv. <i>phaseicola</i>	le <i>P. syringae</i> , različni pv., 0-100%	pv. <i>phaseicola</i> 0 %
23 <i>P. savastanoi</i> (<i>syringae</i>) pv. <i>phaseicola</i>	le <i>P. syringae</i> , različni pv., 0-100%	pv. <i>phaseicola</i> 0 %
24* <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Patovarji <i>X. campestris</i>
25 <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>Flavobacterium</i> , 60%	<i>X. campestris</i> pv. <i>translucens</i> , <i>Pseudomonas</i>

* referenčni sevi, ** tipski sev

4. DISKUSIJA

Ob uvajanju novih postopkov determinacije in prvih analizah referenčnih sevov in bakterij, izoliranih iz rastlinskih vzorcev, se novi sistem Biolog kaže kot zelo uporabno diagnostično orodje (3).

Z njim smo lahko dokazali okuženost vzorcev s fitopatogenimi vrstami bakterij ali vsaj potrdili utemeljenost suma okuženosti. Na primeru bakterije, izolirane iz paprike, se je pokazalo, da je sumljivo bakterijo mogoče tudi izključiti kot povzročitelja bolezni. Vse bakterije smo izolirali iz rastlin zaradi sumljivih bolezenskih znamenj. Uporabili smo selektivna gojišča, ustrezna za izolacijo posamezne vrste ali patovarja določene bakterije. Kljub temu se je na primeru vzorcev vinske trte, okuženih z *Agrobacterium*

sp. in zelja, okuženega s *X. campestris* pv. *campestris* pokazalo, da pri izolaciji na selektivnih gojiščih pogosto zrastejo tudi bakterije, ki niso povzročitelji bolezni. To po eni strani pomeni, da je za natančnejše določanje okuženosti rastlinskih vzorcev potrebno iz vsakega izolirati in testirati več, ne le eno sumljivo čisto bakterijsko kulturo.

Po drugi strani pa kaže na možnost uporabe sistema Biolog pri proučevanju sestave populacij bakterijske mikroflore obolelih rastlin ter vloge različnih bakterij na razvoj rastlinskih bolezni.

Poleg številnih fitopatogenih vrst bakterij iz rodov *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* in *Xanthomonas* omogoča Biologova baza podatkov tudi identifikacijo drugih aerobnih po Gramu negativnih bakterij, skupno okoli 500 vrst bakterij iz 96 rodov. Sistem bo tako mogoče uporabiti tudi pri proučevanju bakterij s področja medicine, živinoreje in drugih okolij: vode, tal (1, 2).

5. VIRI

1. Biolog Inc. 1999. MicroLog™ System, Release 4.0, User Guide manual.
2. Bochner B.R. 1989. Sleuthing out bacterial identities. *Nature*, 339, 6220: 157-158.
3. Jones J.B., Chase, A.R., Harris G.K. 1993. Evaluation of the Biolog GN microplate system for identification of some plant-pathogenic bacteria. *Plant disease*, 77, 6: 553-558.
4. Klement Z., Mavridis A., Rudolph K., Vidaver A., Preombelon M.C.M., Moore L.W. 1990. Chapter I.5 Inoculation of plant tissues. V *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest: 95-124.
5. Lanyi B. 1987. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. V *Methods in microbiology*, vol. 19, Current methods for classification and identification of microorganisms, ed. R.R. Colwell and R. Grigorova, Academic press: 1-67.
6. Rudolph K., Roy M.A., Sasser M., Stead D.E., Davis M., Swings J., Gossele F. 1990. Chapter I.4. Isolation of bacteria. V *Methods in phytobacteriology*. Ed. Z.Klement, K. Rudolph, D.C. sands, Akademiai Kiado, Budapest:43-94.
7. Staley J.T., Krieg N.R. 1984. Bacterial classification. I. Classification of procaryotic organisms: an overv. V *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore: 965-968.
8. Stead D.E. 1995. Profiling techniques for the identification and classification of plant pathogenic bacteria. *EPPO Bulletin*, 25:143-150.
9. Šabec M., Škerlavaj V. 2000. Crown gall of grapevine in Slovenia. *Res. Rep. Biot. fac. University of Ljubljana – Agriculture*, 75-1: 27-33.
10. Young J.M., Saddler G.S., Takikawa Y., De Boer S.H., Vauterin L., Gardan L., Gvozdyak R.I., Stead D.E. 1996. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. *review of plant pathology*, 75, 9: 721-763.