

ISPITIVANJE FITOPATOGENIH ODLIKA KLINIČKIH IZOLATA *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Slobodan Vlajić, Vesna Lalošević, Stevan Maširević, Mira Mihajlović –
Ukropina, Renata Iličić, Jelica Gvozdanović – Varga, Ana Takač

Izvod: Postojanje mogućnosti perzistencije kliničkih izolata bakterija u biljkama, otvara pitanje o njihovim fitopatogenim svojstvima i mogućnostima da izazovu patološke promene na biljkama. Ispitivanjima su obuhvaćeni klinički izolati *Pseudomonas aeruginosa* i njihova mogućnost prouzrokovanja truleži na krtolama krompira, kriškama mrkve, lukovicama crnog luka, kao i hipersenzitivne reakcije (HR) na duvanu i hidrolize skroba. Kod pojedinih izolata zabeležena je mogućnost pojave simptoma truleži glavicica crnog luka, dok su ostala ispitivana fitopatogena svojstva negativna.

Ključne reči: fitopatogena svojstva, klinički izolati, *Pseudomonas aeruginosa*

Uvod

Pseudomonas aeruginosa je aerobna i uslovno anaerobna bakterija, prilično otporna prema mnogim spoljašnjim faktorima (Karaklašević i sar., 1987). Spada u vodeće uzročnike bolničkih infekcija zbog svojih fizioloških osobina (Loughlin i sar., 2002), a kao oportunistička bakterija, javlja se kod oslabljenog imunskog sistema, nakon povreda ili uništenja normalne crevne mikroflore usled dugotrajne upotrebe antibiotika (Lalošević, 2011). Nalazi se u zemljištu, vodi i biljnom materijalu, naseljavajući ga epifitski, kao saprofit (Arsenijević, 1997).

Dugo prisutno mišljenje o nemogućnosti autonomnog preživljavanja patogenih mikroorganizama u spoljašnjoj sredini (izvan organizma čoveka ili toplokrvnih životinja), danas je opovrgnuto (Litvin, 1996; Đukić i sar., 2009; 2011). Istraživanja Vlajića i sar. (2014) ukazuju na mogućnost prodiranja, transporta i perzistencije humanih izolata *P. aeruginosa* u krastavcu, paradajzu, paprici i kupusu. Navedene činjenice, ukazuju da pojedine biljne vrste, koje se konzumiraju bez termičke obrade,

Slobodan Vlajić, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Srbija (svlajic89@gmail.com), doktorant stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja

Vesna Lalošević, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Srbija (ivesna@polj.uns.ac.rs)

Stevan Maširević, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Srbija (stevanm@polj.uns.ac.rs)

Mira Mihajlović – Ukropina, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Srbija (mmukropina@gmail.com)

Renata Iličić, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Srbija (renata.ilicic@polj.uns.ac.rs)

Jelica Gvozdanović – Varga, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, Novi Sad, Srbija (jelica.varga@nsseme.com)

Ana Takač, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Nemanjina 6, Zemun, Srbija (ancitakac@gmail.com)

moгу imati značajnu ulogu u epidemiologiji crevnih infekcija. Međutim, postavlja se pitanje o virulentnosti i mogućnosti pojave patoloških promena koje mogu da prouzrokuju zoonotske bakterije na biljkama. Sposobnost mikroorganizama da izazivaju patološke promene na biljkama, životinjama i čoveku ukazuje na mogućnost polipatogenosti (Đukić i sar., 2011).

Cilj rada bio je ispitivanje fitopatogenih odlika kliničkih izolata *P. aeruginosa*.

Materijal i metode rada

U ispitivanju je upotrebljeno osam sojeva *P. aeruginosa* (Pa1 – Pa8), poreklom iz humanog brisa guše, izolovanih i identifikovanih u Institutu za javno zdravlje Vojvodine, Centru za mikrobiologiju. Bakterija *Erwinia carotovora* izolat T9 (iz kolekcije prof. dr Jelice Balaž), upotrebljena je kao pozitivna kontrola, a sterilna destilovana voda kao negativna. Za ispitivanje su korišćene prekoćne kulture. Ogladi su postavljeni u tri ponavljanja.

Ispitivanje mogućnosti fluorescencije

Sojevi *P. aeruginosa* zasejani su na selektivnu King B podlogu i inkubirani na 37°C 24 sata, a potom posmatrane pod UV svetlom radi dokazivanja fluorescencije.

Ispitivanje pojave truleži krtola krompira

Krtole krompira sorte Dessire, detaljno su oprane, prebrisane alkoholom i potom flambirane. Nakon toga, krtole su poprečno isečene na kriške debljine oko 10 mm. Ovako pripremljene kriške prenesene su u Petri kutije i na tri mesta izbušene zumbom radi pravljenja bunarčića. U bunarčiću je nalivena bakterijska suspenzija, koncentracije 6×10^8 ćelija ml⁻¹. Nakon sipanja sterilne vode u Petri kutije do polovine kriški krompira, iste su odložene u inkubator na temperaturu od 30°C. Test se smatrao pozitivnim ako se većina inokulisanih kriški potpuno razmekša tokom tri dana nakon inkubacije (Bradbury, 1970).

Ispitivanje pojave truleži kriški mrkve

Mrkva sorte Nantes, prečnika veličine 3,5 – 4 cm korišćena je u ispitivanju. Upotrebljena je ista metodologija kao kod ispitivanja truleži krtola krompira, sa razlikom da je bušen jedan bunarčić po jednoj krišci mrkve.

Ispitivanje hidrolize skroba

Za određivanje sposobnosti bakterije da hidrolizuje skrob upotrebljena je metoda agarnih ploča na skrobnom agaru (skrob u prahu 10 g l⁻¹, KH₂PO₄ 0,5 g l⁻¹, K₂HPO₄ 0,5 g l⁻¹, MgSO₄ x 7H₂O 0,2 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹) (Rodina, 1965). Kao negativna kontrola upotrebljena je nezasejana podloga. Inkubacija je vršena 48 sati u termostatu na 37°C, a potom su kolonije prelivene rastvorom Lugola. Test se smatrao pozitivnim ukoliko se oko bakterijskih kolonija pojavljuje neobojena zona (zona hidrolize).

Hipersenzitivna reakcija na duvanu (HR)

Upotrebljeno je lišće duvana sorte Virdžinija. Inokulacija lišća izvedena je pomoću medicinskog šprica (Klement i sar., 1990), suspenzijom bakterija 10⁷ ćelija ml⁻¹ (Arsenijević, 1997). Inokulisano lišće pri dnu je obavijeno navlaženom vatom i postavljeno u čaše a potom preneto u fitotron. Rezultati su očitavani nakon 24, 48, 72 sata. Pojava nekroze na inokulisanom tkivu smatrano je pozitivnom reakcijom.

Ispitivanje truleži lukovica crnog luka

Lukovice sorte Holandski žuti, veličine 50 – 80 g, odvojene su od spoljašnjih suvih ovojnih listova i potopljene u rastvor 3 % natrijum – hipohlorid. a potom isprane u sterilnoj vodi.

Injektiranje bakterijske suspenzije koncentracije 6×10^8 ćel ml^{-1} (2 skala po McFarland (Klement i sar., 1990), vršeno je pomoću medicinskog šprica. Inficirane lukovice postavljene su u kutiju sa nakvašenom vatom, a potom u fitotron na 30°C. Nakon 5 dana vršeno je vertikalno sečenje lukovica i posmatranje simptoma truleži.

Rezultati istraživanja i diskusija

Ispitivani izolati *P. aeruginosa* gajeni na Kingovoj B podlozi produkuju fluorescentni žutozeleni pigment. Ispitivanjem patogenosti humanih izolata *P. aeruginosa* na krtolama krompira i kriškama mrkve nisu uočeni simptomi truleži, dok je izolat *E. carotovore* (T9) prouzrokovao simptome truleži. Hidroliza skroba i hipersenzitivna reakcija na listovima duvana, kod ispitivanih izolata *P. aeruginosa* bila je negativna. Trulež lukovicama crnog luka u sva tri ponavljanja prouzrokovali su izolati Pa2, Pa3, Pa5, Pa6, kod lukovica inficiranih izolatima Pa1, Pa4, Pa8 nije došlo do razmekšavanja tkiva a time i procesa truleži. Kod lukovica inficiranih izolatom T9, u potpunosti je došlo do dezorganizacije ćelija, i pojave simptoma vlažne truleži (Tabela 1).

Tabela 1. Fitopatogena svojstva humanih izolata *P. aeruginosa*
 Table 1. Phytopathogenic characteristics of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

Izolot	Fluorescencija	Trulež krtola krompira	Trulež kriški mrkve	Hidroliza skroba	HR duvana	Trulež glavica luka
Pa1	+++	----	----	----	----	----
Pa2	+++	----	----	----	----	+++
Pa3	+++	----	----	----	----	+++
Pa4	+++	----	----	----	----	----
Pa5	+++	----	----	----	----	+++
Pa6	+++	----	----	----	----	+++
Pa7	+++	----	----	----	----	-+-
Pa8	+++	----	----	----	----	----
T9	---	+++	+++	+++	---	+++
K-	---	----	----	----	----	----

+++ pozitivna reakcija u sva tri ponavljanja; --- negativna reakcija u sva tri ponavljanja

Ispitivanja sprovedena od strane Lebeda i sar. (1984), ukazuju da izolati bakterije *P. aeruginosa* poreklom iz kliničkih uzoraka ispoljavaju patogene odlike u odnosu na biljke mrkve, crnog luka, krtola krompira i lišća duvana. Ova bakterija često se izoluje iz najrazličitijih biljaka, pri tome su izolati poreklom sa biljka patogeni za životinje, a klinički izolati ispoljavaju izraženo fitopatogeno svojstvo (Gvozđjak i Jakovleva, 1987). U našim istraživanjima nisu zabeležene patološke promene na krompiru, mrkvi i

duvanu, dok je u pojedinim slučajevima zabeležena izrazita trulež lukovica crnog luka, reizolacijom iz razmekšanog tkiva lukovica dobijene su kolonije bakterije *P. aeruginosa*. Na krtolama krompira, oko pojedinih bunarčića u koje je nalivena bakterijska suspenzija primećeni su difuzno raspoređeni koncentrični krugovi plavozelene boje. Maceracijom tkiva iz oboda krugova, i zasejavanjem na hranjivim podlogama dobijene su kolonije *P. aeruginosa*. Ovo može da ukazuje na nesmetano difundovanje i razmnožavanje bakterije u krtolama bez prouzrokovanja patoloških promena.

Analizirajući mehanizme polipatogenosti pseudomonasa, Beljakov i Rjapis (1988, loc. cit. po Đukiću i sar., 2011) ukazuju na sličnost velikog broja strukturalnih i funkcionalnih svojstava toplokrvnih životinja i biljaka kao što su površinski biopolimeri, a sami pseudomonasi sadrže čitavu garnituru univerzalnih faktora polipatogenosti. Smatra se da dva faktora virulencije *P. aeruginosa*, egzotoksin A i fosfolipaza C, utiču na pojavu i sistemsko širenje infekcije kod sisara i *Arabidopsis*-a (Rahme i sar., 1995).

Zaključak

Fitopatogeno svojstvo kliničkih izolata *P. aeruginosa* zabeleženo je u vidu truleži kod inficiranih lukovica crnog luka sa pojedinim izolatima. Trulež krtola krompira, kriški mrkve kao i hidroliza skroba i HR na duvanu, nije zabeležena. Pitanje o mogućnostima pojave patoloških promena na biljkama delovanjem humanih izolata *P. aeruginosa* i dalje ostaje otvoreno.

Napomena

Istraživanja su deo projekta pod nazivom: "Stvaranje sorata i hibrida povrća za gajenje na otvorenom polju i u zaštićenom prostoru" br. TR 31030, koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja i "Kontrola zdravlja životinja u lancu proizvodnje zdravstveno bezbedne hrane" br. 1144512230 – 201104, koji finansira Pokrajinski sekretarijat za nauku i tehnoloski razvoj AP Vojvodine.

Literatura

- Arsenijević M. (1997). Bakterioze biljaka. S print, Novi Sad. Treće izmenjeno i dopunjeno izdanje, 299 – 301 str.
- Bradbury J.F. (1970). Isolation and preliminary study of bacteria from plants. Review of Plant Pathology 49 (5), 213 – 218.
- Đukić D., Jemcev V., Mandić G. (2011). Sanitarna mikrobiologija zemljišta. Agronomski fakultet Čačak, 1 – 502.
- Đukić D., Mandić L., Pešaković M., Božarić L. (2009). Perzistencija salmonela u rizosvernom zemljištu i biljkama. XIV Savetovanje o biotehnologiji, Čačak, 87 – 28. Mart. Zbornik radova, Vol. 14 (15), 27 – 30.
- Gvozdjak RI., Jakovleva LM. (1987). Ob osobennostjah patogennosti *Pseudomonas aeruginosa*. Žurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii, 3, 3 – 5.

- Karakašević B. i sar. (1987). Mikrobiologija i parazitologija. Medicinska knjiga Beograd – Zagreb, 606 – 609.
- Klement Z., Rudolph K., Sands DC. (1990). Methods in Phytobacteriology (Eds). Acadèmiai Kiadó, Budapest, Hungary.
- Lalošević V. (2011). Mikrobiologija. Mala knjiga, Novi Sad, 156 – 158.
- Lebeda A., Kudela V., Jedličkov Z. (1984). Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* for plant and animals. Acta Phytopatologica Acad. Sci. Hung., 19 (3 – 4), 271 – 284.
- Litvin V. Ju (1996). Ekosistemnij puskovoj mehanizm epidemičeskogo pojavljenija sapronozov na primere holerij eljtor. Žurnal mikrobiologii, epidemiologii i imunologii, 3, 11 – 15.
- Loughlin MF, Jones MV, Lambert PA. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane – active agents but not to clinically relevant antibiotics. Journal Antimicrob Chemother, 49(4), 631 – 9.
- Rahme LG., Stevens EJ., Wolfort SF., Shao J., Tompkins RG., Ausubel FM. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science, 268, 1899 – 1902.
- Rodina A.G. (1972). Methods in Aquatic microbiology. Ed. Colwell, R. and Zambruski, M.. University Park Press, Baltimore and butterworth and Co Ltd. London.
- Vlajić S., Lalošević V., Đurić S., Mihajlović – Ukropina M., Jelesić Z., Takač A. (2014). Da li *Pseudomonas aeruginosa* perzistira u biljkama? XIX Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, Čačak 07 – 08. Mart, Vol. 19 (21): 467 – 471.

PHYTOPATHOGENIC CHARACTERISTICS OF CLINICAL *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ISOLATES

*Slobodan Vlajić, Vesna Lalošević, Stevan Maširević, Mira Mihajlović –
Ukropina, Renata Iličić, Jelica Gvozdanović – Varga, Ana Takač*

Abstract

Existence of persistence ability of clinical isolates bacteria in plants, raises the question of their phytopathogenic characteristic and possibilities to cause pathological changes in the plants. The study included clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and their possibility to causing rot on potato tubers, slices of carrots, onion cloves, hypersensitive response (HR) on tobacco leaves and hydrolysis of starch. In the case of some isolates was observed potential symptoms of onion rot, while the other tests of phytopathogenic characteristics were negative.

Key words: phytopathogenic characteristics, clinical isolates, *Pseudomonas aeruginosa*

Slobodan Vlajić, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia (svlajic89@gmail.com), PhD grant student of Ministry of education science and technological development

Vesna Lalošević, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia (lvesna@polj.uns.ac.rs)

Stevan Maširević, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia (stevanm@polj.uns.ac.rs)

Mira Mihajlović-Ukropina, University of Novi Sad, Medical Faculty, Hajduk Veljkova 3, Novi Sad, Serbia (mmukropina@gmail.com)

Renata Iličić, University of Novi Sad, Faculty of Agriculture, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad, Serbia (renata.ilicic@polj.uns.ac.rs)

Jelica Gvozdanović – Varga, Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, Novi Sad, Serbia (jelica.varga@nsseme.com)

Ana Takač, University of Belgrade, Faculty of Agriculture, Nemanjina 6, Zemun, Serbia (ancitakac@gmail.com)