

VILKAVIŠKIO „AUŠROS“ GIMNAZIJA

BIOLOGIJA

IVC klasė

**BIOLOGINIAME VANDENS VALYME NAUDOJAMŲ
MIKROORGANIZMŲ POVEIKIS
FUSARIUM SPP. MIKROGRYBUI IN VITRO**

VIKTORIJA STANEIKAITĖ

Daiva Paškauskienė
Biologijos mokytoja ekspertė

2019 m.

Turiny

Įvadas.....	3
Literatūros apžvalga	5
Darbo tikslas ir uždaviniai.....	6
Tyrimo metodika	7
Duomenų analizė ir rezultatų aptarimas	11
Biologinio vandens valymo mikroorganizmų priešgrybinis aktyvumas <i>Fusarium spp.</i> mikrogrybui	11
Mikroorganizmų grupės.....	12
Stipriausiai veikiančių mikroorganizmų poveikis <i>Fusarium spp.</i> mikrogrybui	13
Stipriausiai veikiančių mikroorganizmų poveikis <i>Fusarium spp.</i> mikrogrybu pažeistiems grūdams	15
Stipriausiai veikiantys mikroorganizmai	15
Išvados	17
Literatūra	18
Priedas	19

Ivadas

Varpų fuzariozė – tai liga, sukelta grybo *Fusarium spp.* Ja gali sirgti visi varpiniai javai. Fuzariozės padariniai - pažeista varpos dalis pasidengia šiuo grybeliu, tada dalis varpos lieka tuščia, o pažeisti grūdai pakeičia spalvą (gali pasidaryti nuo rausvos iki baltos spalvos), tampa minkšti ir lengvi. Bet tai dar būtų pakenčiama, jei ne nuodingos medžiagos – mikotoksinai, susidarančios ant grūdų dėl šio grybo. Net maži mikotoksinų kiekiai gali sukelti įvairius negalavimus tiek žmonėms tiek gyvuliams.

Fuzariozės grybelio atsikratyti sunku, nes jis gali peržiemoti ir su daiginimui atidėtais grūdais, ir su dirvoje paliktomis šalutinėmis javų dalimis.

Žinoma, šiai ligai gydyti naudojami tokie fungicidai kaip metkonazolas (juventus), protiokonazolas (input) ir tebukonazolas, bet nutaikyti tinkamą purškimo laiką labai sunku. Fungicidai ne visada pasitvirtina, didžioji dalis cheminių medžiagų neatlieka reikiamos funkcijos ir nusėda į žemę, vandenį, per kur patenka į organizmų mitybą. Jau nekalbant apie tai, kad pesticidai daugumą organizmų veikia labai neigiamai. O ką daryti ekologišką ūkį turintiems žmonėms.

Išgirdus, kaip tėtis jaudinasi dėl fuzariozės, nusprendžiau patyrinėti, kas gali turėti įtakos fuzariozės mikrogrybo augimui. Dar praeitais metais tyrus įvairių augalų išskirtų medžiagų veikimą šiam grybui, šiais metais nusprendžiau dirbti su įvairiais mikroorganizmais ir jų išskirtomis medžiagomis. Mikroorganizmus tyrimui nutariau išsiauginti iš biologinio nuotekų valymo vandens. Biologiniam nuotekų valymui panaudojami mikroorganizmai, kurių yra ir gamtinėje aplinkoje. Tai aerobiniai (gyvenantys aplinkoje, kurioje yra deguonies) ir anaerobiniai (gyvenantys aplinkoje, kurioje nėra deguonies) mikroorganizmai. Nuotekų biologinio valymo įrenginiuose jiems sudaromos palankios mitybos ir dauginimosi sąlygos (Nuotekų valymo būdai, 2018). Jo metu mikroorganizmai suskaido ir maistui suvartoja nuotekose esančius organinius teršalus, taip išvalydami vandenį. Biologinio valymo metodai yra pagrįsti bakterijų gebėjimu maitintis įvairiomis organinėmis ir mineralinėmis medžiagomis, esančiomis nuotekose (Nuotekų valymo būdai, 2018). Šį vandenį pasirinkau dėl didelės čia esančių mikroorganizmų įvairovės.

Atrinkus labiausiai *Fusarium spp.* grybą veikusius mikroorganizmus būtų galima juos - pavienius ar jų mišinius – kultivuoti, vėliau galima būtų purkšti ant javų sėklų prieš jas pasėjant į dirvožemį (cheminio beicavimo principu) arba purkšti ant jau išdygusių sveikų (siekiant išvengti ligos) ar šiek tiek pažeistų (siekiant sustabdyti ligą) ligų.

Už patarimus ir pagalbą, nustatant mikrogrybo rūšį, dėkoju Vilniaus Universiteto Jungtinio Gyvybės mokslo centro Biochemijos instituto Molekulinės mikrobiologijos ir biotechnologijos skyriaus vyresniajai mokslo darbuotojai Vidai Časaitei.

Už patarimus ir pagalbą, nustatant stipriausiai grybą veikiančios bakterijos gentį ir rūšį, dėkoju LSMU VA Veterinarijos fakulteto lektoriui, Lietuvos respublikos veterinarinės medicinos mokslų daktarui Mariui Virgailiui.

Literatūros apžvalga

Kaip teigia A. Lugauskas, *Fusarium* genties grybai yra aptinkami visame pasaulyje. Nors šis grybas gali parazituoti maždaug 40 rūšių augalų, dažniausiai jie yra laikomi grūdinių kultūrų parazitais. P. E. Nelson ir kt. (1983, žr. Lugauskas, 2002) nurodo, kad šie grybai yra toksiški. Dažniausiai aptinkamas šių grybų išskiriamas toksinas zearalenonas. Kaip pastebi A. Lugauskas, jeigu iš šiuo grybu pažeistų grūdų bus iškepta duona, ją suvalgčius žmonės pradės pykinti, vėliau jie gali vėmti, jiems ims svaigti galva tarytum asmuo būtų girtas. Dėl šios priežasties tokia duona buvo vadinama „girta duona“. Šiuo grybu pažeistais grūdais pašėrus gyvulius šiems gali pasireikšti susijaudinimas, vulvovaginitas (lytinių organų ir makšties uždegimas), gyvuliai sulėtėja, pradeda blogai koordinuoti aplinkoje, sutrinka jų regėjimas, o arkliai gali net pasiusti. Šiandien yra žinomos šios toksinės medžiagos: zeageninas, aureofusarinas, fusarenonas X, nivalenonas, toksinas T–2, rubrofusarinas, ravenalinas, trichotevinas, fusarinas C, kulmarinas, vomitoksinas, sambukoinas ir kt. (Domsch et al., 1980; Frisvad, 1988; Gravagen et al., 1994; žr. Lugauskas, 2002). Yra pagrindo manyti, kad šios rūšies grybai sukelia ligą, kuri pasireiškia išsėtinių kraujų dėmių atsiradimu odoje (Kwon-Chung, Bennett, 1992), (kaip nurodoma A. Lugauskas, 2002).

Rimutė Mačkinaitė straipsnyje „Žvilgsnis į mikroorganizmų pasaulį“ nagrinėja sandėliuojamų grūdų užterštumą mikromicetais. Ji nurodo, kad *Fusarium* genties grybų aptikimo dažnis jos tirtų grūdų audiniuose sudarė 14,8 %. Dažniausia šis grybas parazituoja kviečių, miežių ir rugių grūduose. Tirtuose grūduose labiausiai paplitę *F. poae*, *F. sporotrichioides* ir *F. Avenaceum*. (Rimutė Mačkinaitė, 2007).

Kaip teigia K. Stumbrienė „Lietuvoje šio grybo išplitimas pastebėtas pastaraisiais metais (Sakalauskas ir kt., 2014). *F. graminearum* išplitimas siejamas su glifosato naudojimu, minimaliu žemės dirbimu (Fernandez ir kt., 2005), tačiau labiausiai su gamtinėmis sąlygomis ir klimato atšilimu (Parikka ir kt., 2012a, b)“. (Stumbrienė, Karina, 2018).

Taigi Lietuvoje atliktuose tyrimuose, buvo nagrinėjama *Fusarium* mikrogrybo paplitimas, aptikimo dažnis, žemės dirbimo būdų įtaka *Fusarium* infekcijos lygiui grūduose, D. Černiauskas disertacinio darbo metu kūrė efektyvius metodus *Fusarium spp.* mikrogrybų pažeistiems grūdams aptikti, jų toksinams detoksikuoti (D. Černiauskas, 2017).

Aš 2017–2018 m. m. atlikau mokslinį tiriamąjį darbą, kuriame nagrinėjau augalų išskirtų medžiagų poveikį *Fusarium* mikrogrybo augimui ir nustačiau, kad antpiluose esančių medžiagų priešgrybinis poveikis stipresnis nei ekstraktuose, kad porų ir svogūnų lapų antpiluose esančių medžiagų priešgrybinis poveikis stipriausias, o krienų lapų – silpniausias, kad tiriamuose augaluose esančių medžiagų poveikis silpnėjęs nei fungicido „Folicur“ (V. Staneikaitė, 2018 m.).

Darbo tikslas ir uždaviniai

Tikslas:

Nustatyti biologinio vandens valymo mikroorganizmų priešgrybinį aktyvumą *Fusarium spp.* mikrogrybui in vitro.

Uždaviniai:

1. Išsiauginti mikroorganizmus iš biologiniam valymui naudojamam vandens, juos išgryninti.
2. Užsiauginti *Fusarium spp.* mikrogrybo kultūrą iš fuzarioze užsikrėtusių žieminių kviečių.
3. Nustatyti biologiniame vandens valyme naudojamų mikroorganizmų poveikį *Fusarium spp.* mikrogrybui.

Tyrimo metodika

Tiriamasis darbas atliekamas Vilkaviškio „Aušros“ gimnazijos biologijos kabinete. Naudotos terpės DRBC agaras ir Triptono sojos agaras, pirktos UAB „Bioeksma“, kolonijos augintos termostate, 30 °C temperatūroje.

Darbo eiga:

1. Mikroorganizmų, naudojamų biologiniame vandens valyme, kultivavimas:

1.1 Iš UAB „Vilkaviškio vandenys“ parsivežiau biologinio nuotekų valymo vandens;

1.2 Vandenį supyliau į kūginę kolbą ir laikiau 20 min., kol nusistojo dumblas ir atsiskyrė vanduo. Tyrimui naudoju atsiskyrusį vandenį;

1.3 Paruošiau šio vandens skiedinius:

1:1 (1 ml atsiskyrusio nuotekų vandens ir 1 ml distiliuoto vandens);

1:10 (0,5 ml atsiskyrusio nuotekų vandens ir 5 ml distiliuoto vandens);

1.4 Ant 2 Triptono sojos agaro lėkštelių užpyliau po 1 ml paruoštų (1:1 ir 1:10) skiedinių ir juos paskleidžiau. Ant trečios lėkštelės kilpele sėjau biologinio valymo vandenį;

1.5 Visus mėginius laikiau termostate 2 dienas;

1.6 Išsirinkau reprezentatyvias kolonijas kultūroms išgryninti;

1.7 Triptono sojos agaro Petri lėkštes dalinau į 4 dalis ir kiekvienoje dalyje sėjau atsirinktas kolonijas, termostate laikiau 30 °C temperatūroje 48 val..

2. Grybelio *Fusarium spp.* kultivavimas:

2.1 Ant DRBC agaro terpės uždėjau grybeliu užkrėstų grūdų. Mėginį laikiau termostate 30 °C temperatūroje 24 val.. Išaugusį grybą naudoju tiriamiems mėginiams ruošti.

3. Grybelio genties tyrimas.

Atliktas Vilniaus Universiteto gamtos mokslų fakulteto laboratorijose (metodika 1 priedas), norint įsitikinti, ar tikrai dirbu su *Fusarium* mikrogrybu.

4. Priešgrybinio aktyvumo tyrimas

4.1 Tyrimui naudoju po 4 mitybines Triptono sojos ir DRBC agaro terpes 90 mm skersmens Petri lėkštelėse. Lėkštes padalinu į keturias dalis, užsirašiau mėginių numerius;

4.2 Mikrogrybo sėjimas: į sužymėtas Petri lėkštes sėjau grybelį: iš Petri lėkštelės su *Fusarium* grybeliu išpjoviau 0,8 x 0,8 cm dydžio kvadratėlius ir uždėjau į paruoštą Petri lėkštelių centrą;

4.3 Į kiekvieną lėkštelės dalį, pažymėtą atitinkamu skaičiumi, kilpele sėjau išgrynintus mikroorganizmus 15 mm skersmens apskritimu. Taip paruošiau 13 mėginių. Į mėginį Nr. 14 tokiu pačiu principu sėjau nusistovėjusio atsiskyrusio nuotekų vandens. Mėginį Nr. 15 palikau neužsėtą mikroorganizmais – kontrolinis mėginys. Mėginyje Nr. 16 padariau šulinėlį, į kurį su kintamo

tūrio pipete įpyliau 20 mikrolitrų nusistovėjusio atsiskyrusio nuotekų vandens. Viso paruošiau 16 mėginių;

4.4 Petri lėkšteles dėjau į termostatą ir laikiau 30 °C temperatūroje. Po 48 valandų kiekviename mėginyje įvertinau mikroorganizmų poveikį tiriamam grybui, liniuote išmatuodama užaugusio *Fusarium spp.* dydį nuo grybelio centro iki jo krašto trijuose taškuose (spindulį link mikroorganizmo kultūros centro ir po spindulį į kultūros kraštus).

5. Nustačiau stipriausiu priešgrybiniu aktyvumu pasižyminčių mikroorganizmų grupes:

5.1 Nustačiau išaugusių grybų grupes, mikroskopuojant grybų kolonijas Petri lėkštelėse ir pasidarytuose grybų preparatuose.

5.2 Nustačiau mikrobinių ląstelių struktūras, išskyriau vienus mikrobus nuo kitų (gramteigiamos ar gramneigiamos, formas, išsidėstymą), pasidariusi preparatus ir nudažiusi Gramo būdu. (Dažymo būdas 2 priedas).

6. Fungicido „Folicur“ kalibracinės kreivės ruošimas:

6.1 Norėdama nustatyti *Fusarium* mikrogrybo jautrumą ir atsparumą mikroorganizmų išskiriamoms medžiagoms, šio grybo užaugusias kolonijas mėginiuose lyginau su paruošta fungicido „Folicur“ kreive.

Paruošiau 5 skirtingų koncentracijų fungicido „Folicur“ tirpalus (12,5 %; 25 %; 50 %; 75 %; 100 %).

100 % laikau tirpalą pagamintą pagal naudojimo instrukcijas santykiu 1:200.

75 % stiprumo tirpalui gauti 100 % tirpalą skiedžiau distiliuotu vandeniu santykiu 3:1;

50 % stiprumo tirpalui gauti 100 % tirpalą skiedžiau distiliuotu vandeniu santykiu 1:1;

25 % stiprumo tirpalui gauti 100 % tirpalą skiedžiau distiliuotu vandeniu santykiu 1:3;

12,5 % stiprumo tirpalui gauti 100 % tirpalą skiedžiau distiliuotu vandeniu santykiu 1:7;

0 % tirpalui naudojau gryną distiliuotą vandenį.

6.2 Paruoštus tirpalus pyliau į šulinėlius, padarytus 90 mm skersmens Petri lėkštelėse, užsėtose *Fusarium graminearum* mikromicetais ir auginau termostate 30 °C temperatūroje 96 val. Grybo kolonijų ilgį išmatavau liniuote. Pagal gautus duomenis braižiau kalibracinę kreivę.

7. Kultūrų išgryninimas:

7.1 Kadangi ištyrus tiriamųjų organizmų kolonijas paaiškėjo, kad šios kolonijos nėra grynos (mikroskopuojant matoma ne vienos rūšies mikroorganizmas) toliau mikroorganizmus gryninau, persėjant reprezentatyvias kolonijas ir tyrimą kartojau tol, kol mikroskopuojant mačiau vienos rūšies mikroorganizmą.

7.2 Išgrynintus mikroorganizmus sužymėjau raidėmis A–P. Su šiomis kultūromis pakartojau priešgrybinio aktyvumo tyrimą *Fusarium spp.* mikrogrybui. Po 48 valandų įvertinau

mikroorganizmų poveikį tiriamam grybui, gautus rezultatus palyginau tarpusavyje, su kontroliniu mėginiu ir su fungicido „Folicur“ kalibracine kreive.

8. Stipriausiai veikiančių mikroorganizmų poveikio *Fusarium spp.* mikrogybu pažeistiems grūdams nustatymas.

1 būdas – Ant Triptono sojos agaro terpės užsėjau atsirinktus stipriausiai veikusius mikroorganizmus, mėginius laikiau termostate 48 val., ant užaugusių mikroorganizmų kultūrų dėjau *Fusarium spp.* mikrogybu pažeistus grūdus ir laikiau termostate. Vertinu grybo augimą po 48 val., 72 val., 96 val..

2 būdas – darau atsirinktų stipriausiai veikusių mikroorganizmų suspensijas, jose 1 val. palaikau *Fusarium spp.* mikrogybu pažeistus grūdus, kuriuos uždedu ant Triptono sojos agaro terpės. Mėginius termostate laikau ir vertinu grybo augimą po 48 val., 72 val., 96 val..

9. Stipriausiai veikiančių mikroorganizmų genties (rūšies) nustatymas

Gentį (rūšį) nustačiau tų mikroorganizmų, kurie neleido augti *Fusarium spp.* mikrogybui iš grybu pažeisto grūdo.

9.1 Oksidazės testas – ant filtrinio popieriaus užlašinau oksidazės reagento, ant kurio gausiai uždėjau tiriamų mikroorganizmų kultūrų. Visos penkios kultūros nusidažė mėlynai – visų oksidazės testas buvo pozityvus.

9.2 Tiriamus mikroorganizmus persėjau į keturias skirtingas terpes – MacConkey agaro, TBX agaro, Cetrimido agaro bei SIM agaro terpes judrumui nustatyti.

Kadangi pagal kvapą ir išvaizdą lėkštelėje ir per mikroskopą mikroorganizmai buvo identiški, toliau tyriau tik du mėginius – B ir D (juos buvau pažymėjus skaičiais 2 ir 4).

9.3 Biocheminis Fermentų tyrimą „Margosios eilutės“ metodu (Microgen™ GnA+B-ID Sistema). Šios terpės turi angliavandenių, kuriuos mikroorganizmai fermentuoja, ir indikatorių, duodantį spalvinę reakciją, pakitus pH:

a) Pasidariau tiriamų (2 ir 4) mikroorganizmų emulsijas: naudoju mėgintuvėlį su fiziologiniu vandeniu, kuriame kilpele įdėjau tiriamus mikroorganizmus ir VELD SCIENTIFIKA™ VORTEX MIXER aparato pagalba juos išmaišiau. Naudojant McFarland™ DEN-1B Densitometro aparatą atitinkiamą mikroorganizmų kiekį emulsijoje iki 150×10^6 vnt/ml (0,5 McFarland™ vienetai).

- Į kiekvieną margosios eilutės šulinėlį įpyliau po keturis lašus mikroorganizmų emulsijos, o į juodai apvestus šulinėlius įpyliau ir po du lašus sterilaus aliejaus (kad susidarytų anaerobinė terpė). Mėginį užkliajavau tam skirta juostele ir įdėjau į termostatą.

- Po 48 valandų įvertinau gautus rezultatus. Susumavus skaičius gavosi kodas, pagal kurį kompiuterio pagalba atradau mikroorganizmus.

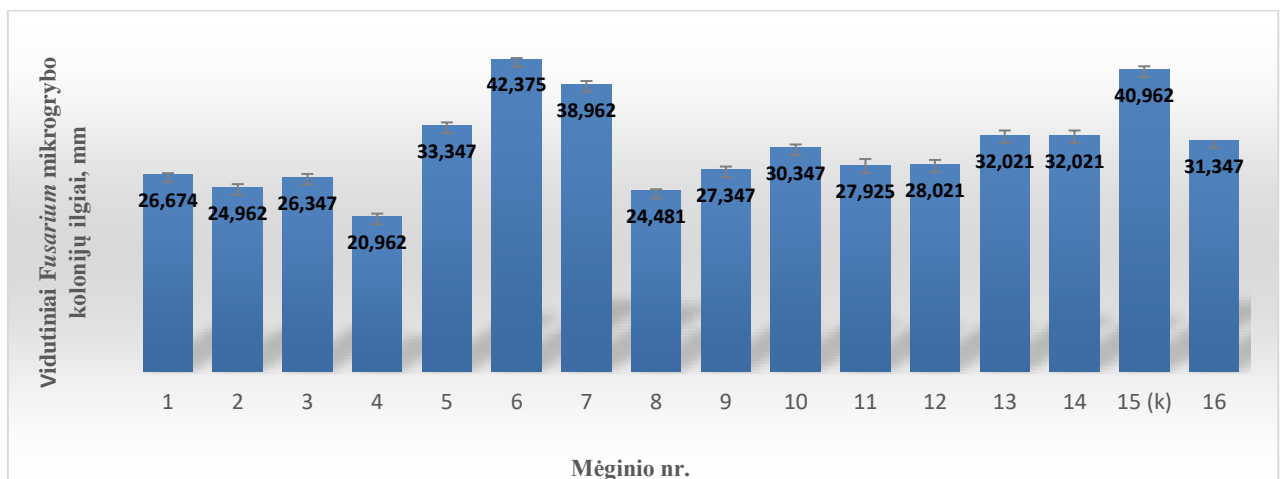
10. Gautus duomenis surašiau į lenteles, nubraižiau palyginamąsias diagramas ir atlikau galutinę kiekvieno gauto fakto analizę. Į lenteles surašiau kiekvieno matavimo: vidurkį \bar{x} (cm) ir paklaidą $m_{\bar{x}}$ (cm), patikimumą P (%), variacijos koeficientą V (%).

Duomenų analizė ir rezultatų aptarimas

Biologinio vandens valymo mikroorganizmų priešgrybinis aktyvumas *Fusarium spp.* mikrogybui

Mėginiuose ant DRBC agarų terpės (skirta *Fusarium* mikrogybui auginti) bakterijos neaugo ar augo labai prastai, todėl tyriau mėginius, sėtus tik ant Triptono sojos agarų terpės.

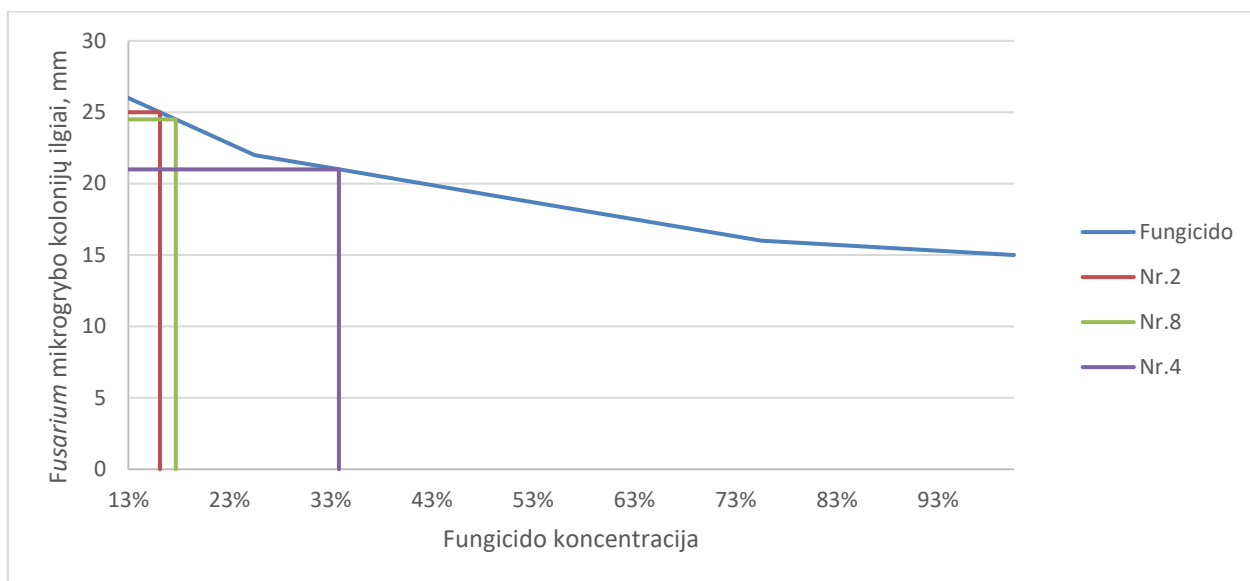
Biologinio nuotekų valymo vandenyje esančių mikroorganizmų poveikis *Fusarium spp.* mikrogybui yra skirtingas. Stipriausiu priešgrybiniu poveikiu pasižymėjo mikroorganizmai esantys mėginiuose Nr. 2, Nr. 4, Nr. 8. Juose inhibicinės zonos didžiausios, o *Fusarium* mikrogybo kolonijų ilgiai apie 2 kartus (20 mm) trumpesni nei kontrolinio mėginio (Nr. 15) mikrogybo kolonijų ilgiai. Mėginiuose Nr. 1, Nr. 3 *Fusarium* mikrogybo kolonijų ilgiai apie 1,6 karto trumpesni nei kontrolinio mėginio mikrogybo kolonijų ilgiai. Mėginiuose Nr. 5, Nr. 9, Nr. 10, Nr. 11, Nr. 13, Nr. 16 *Fusarium* mikrogybo kolonijų ilgiai nuo 13 iki 7 mm trumpesni nei kontrolinio mėginio. Silpniausias priešgrybinis poveikis stebimas mėginyje Nr. 7, kur *Fusarium* mikrogybo kolonijos 2 mm trumpesnės už kontrolinio mėginio mikrogybo kolonijas. Grybo augimui jokios įtakos neturėjo mėginio Nr. 6 mikroorganizmas. Mikrogybo kolonijų ilgiai 1,4 mm ilgesni nei kontrolinio mėginio kolonijų ilgiai. Duomenys pateikti 1 paveikslėlyje ir 2 lentelėje 3 priedas.



1 pav. Vidutiniai *Fusarium spp.* mikrogybo kolonijų ilgiai mėginiuose (mm).

Fusarium mikrogybo jautrumas ir atsparumas medžiagoms, kurias išskiria stipriausiu priešgrybiniu poveikiu pasižymintys mikroorganizmai mėginyje Nr. 4 atitinka 33 % koncentracijos fungicido „Folicur“ tirpalo jautrumą. Šio mikrogybo jautrumas ir atsparumas medžiagoms, kurias išskiria mikroorganizmai mėginyje Nr. 8 atitinka 17,2 % koncentracijos fungicido „Folicur“ tirpalo jautrumą ir šio mikrogybo jautrumas ir atsparumas medžiagoms,

kurias išskiria mikroorganizmai mėginyje Nr. 2 atitinka 15,6 % koncentracijos fungicido „Folicur“ tirpalo jautrumą. Duomenys pateikti 2 paveikslėlyje ir 3 lentelėje 4 priedas.



2 pav. *Fusarium* mikrogybo jautrumo ir atsparumo mikroorganizmų išskirtoms medžiagoms palyginimas su fungicido „Folicur“ kalibracine kreive.

Mikroorganizmų grupės

Mikroorganizmus, išaugusius mėginiuose, sugrupavau į grupes. Mėginiuose išaugo prokariotai – bakterijos – kokai, lazdelės ir eukariotai – grybai (mieliagrybiai). Mieliagrybiai rasti tik viename mėginyje (Nr. 9). Šiame mėginyje *Fusarium* mikrogybo kolonijos 13,7 mm trumpesnės nei kolonijų ilgiai kontroliniame mėginyje. Tiriamuose mėginiuose rasti kokai Gram +, o lazdelės – Gram–. Visuose stipriausiu priešgrybiniu poveikiu pasižymėjusiuose mėginiuose Nr. 2, Nr. 4, Nr. 8 buvo streptokokų šeimos bakterijų genčių bakterijų. Mėginyje Nr. 2 vien tik grandinėle išsidėstę kokai – streptokokai, o mėginiuose Nr. 4, Nr. 8 buvo ir kitų mikroorganizmų (kultūras išgryninti nepavyko, tad dar darbas tęsiamas, kultūros gryninamos). Abiejuose mėginiuose rasta kokai – mikrokokai, išsidėstę pavieniai, ir diplokokai, išsidėstę po du. Mėginyje Nr. 4 dar nustatyta eilute išsidėstę Gram+ lazdelės - streptobakterijos, o mėginyje Nr. 8 – kekėmis išsidėstę stafilokokai. Duomenys pateikti 1 lentelėje. Tik streptokokų (mėginys Nr. 2) išskirtų medžiagų poveikis *Fusarium* mikrogybui praktiškai toks pat, kaip derinio diplokokai, mikrokokai, streptokokai ir stafilokokai (mėginys Nr. 8). Mikroorganizmų deriniai mėginiuose Nr. 4 ir Nr. 8 skiriasi tik vienu mikroorganizmu (mėginyje Nr.4 yra streptobakterijos, o Nr. 8 – stafilokokai). Mėginyje Nr. 6 rasta sarcinos, diplokokai, stafilokokai. Šiam mikroorganizmų deriniui *Fusarium* mikrogybas buvo atsparus. Silpnas poveikis grybui buvo ir mėginyje Nr. 7. Čia

раста лазделės išsidėstę po dvi ir pavienės lazdelės, taip pat diplokokai. Skirtingų mikroorganizmų derinių priešgrybinis poveikis *Fusarium* mikrogybui skirtingas.

1 lentelė. Mikroorganizmų grupės tiriamuose mėginiuose.

Mėginio nr.	Mikroorganizmų grupės	Gram+/gram –	Forma	Išsidėstymas
1	Lazdelės Mikrokokai Diplokokai Streptobakterijos	Gram– Gram+ Gram+ Gram+	Pailgos, apvaliais galais Rutulio Rutulio Įvairios lazdelės	Pavienės ir grandinėle Pavieniai Po du Grandinėle
2	Streptokokai	Gram+	Rutulio	Grandinėle
3	Mikrokokai Lazdelės Diplokokai	Gram+ Gram– Gram+	Rutulio Pailgos Rutulio	Pavieniai Eilute Po du
4	Mikrokokai Lazdelės Streptokokai Streptobakterijos	Gram+ Gram– Gram+ Gram+	Rutulio Pailgos Rutulio Lazdelės	Pavieniai Po du Grandinėle Išsidėstę eilute
5	Streptokokai Mikrokokai Diplokokai	Gram+ Gram+ Gram+	Rutulio Rutulio Rutulio	Grandinėle Pavieniai Po du
6	Sarcinos Diplokokai Stafilekokai	Gram+ Gram+ Gram+	Rutulio Rutulio Rutulio	Krūvelėmis Po du Kekėmis
7	Lazdelės Lazdelės Diplokokai Mikrokokai	Gram– Gram– Gram + Gram+	Lazdelės Lazdelės Rutulio Rutulio	Po vieną Po dvi Po du Pavieniai, labai mažai
8	Lazdelės Mikrokokai Streptokokai Stafilekokai	Gram– Gram+ Gram+ Gram+	Pailgos Rutulio Rutulio Rutulio	Po du Pavieniai Grandinėle Kekėmis
9	Mieliagrybis	–	Ovalo formos, dideli	-
10	Lazdelės Sarcinos	Gram– Gram+	Trumpos Rutulio	Kampu Krūvelėmis
11	Stafilekokai Sarcinos	Gram+ Gram+	Rutulio Rutulio	Kekėmis Krūvelėmis
12	Mikrokokai Diplokokai Lazdelės	Gram+ Gram+ Gram–	Rutulio Rutuli Trumpos lazdelės	Pavieniai Po du Grandinėle
13	Lazdelės	Gram–	Trumpos lazdelės	Po dvi

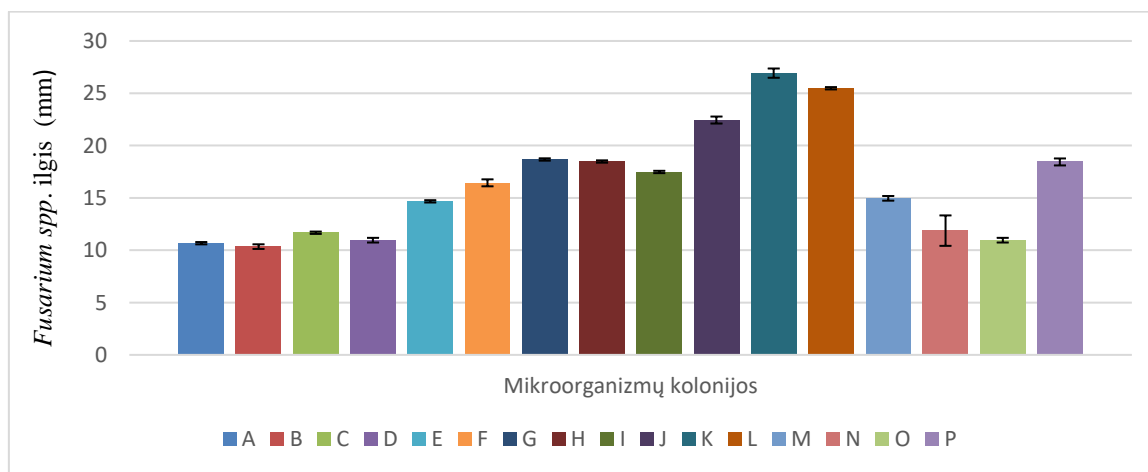
Stipriausiai veikiančių mikroorganizmų poveikis *Fusarium spp.* mikrogybui

Ištyrus tiriamųjų organizmų kolonijas paaiškėjo, kad šios kolonijos nėra grynos (mikroskopuojant matoma ne vienos rūšies mikroorganizmas) toliau mikroorganizmus gryninau, persėjant reprezentatyvias kolonijas ir tyrimą kartočiau tol, kol mikroskopuojant mačiau vienos

grupės mikroorganizmą. Išgrynintus mikroorganizmus sužymėjau raidėmis A–P. Duomenys pateikti 4 lentelėje.

Mėg.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
Mikroorganizmai	Lazdelės	Lazdelės	Lazdelės	Lazdelės	Streptobakterijos	Mikrokokai	Mikrokokai	Mikrokokai	Mikrokokai	Sarcinos	Stafilokokai	Stafilokokai	Streptobakterijos	Streptokokai	Lazdelės	Mikrokokai

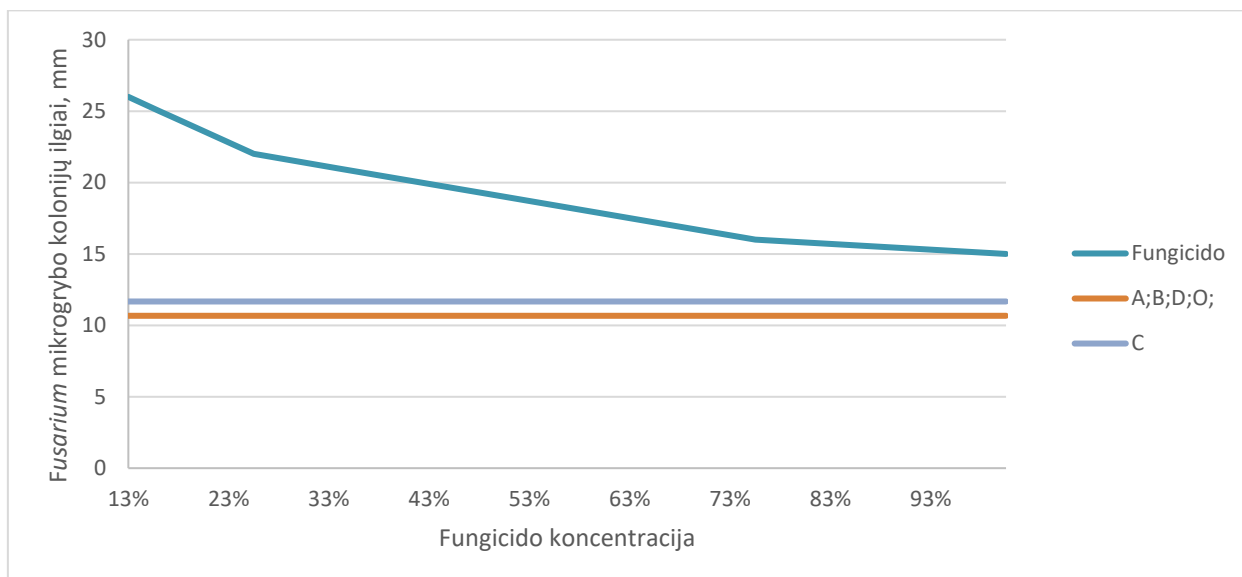
Su šiomis A–P kultūromis pakartoju priešgrybinio aktyvumo tyrimą *Fusarium spp.* mikrogybui. Po 48 valandų įvertinau mikroorganizmų poveikį tiriamam grybui. Rezultatai pateikti 5 lentelėje priede ir 3 paveikslėlyje.



3 pav. Vidutiniai *Fusarium spp.* mikrogybo kolonijų ilgiai mėginiuose (mm), sąveikaujant su A–P mikroorganizmais.

Trumpiausios *Fusarium spp.* mikrogybo kolonijos užaugo mėginiuose su A, B, C, D, O mikroorganizmais, jų ilgiai svyravo nuo 10,34 mm mėginyje su B mikroorganizmu iki 11,67 mm mėginyje su C mikroorganizmu. Šių mikroorganizmų išskirtos medžiagos pasižymi stipriausiu priešgrybiniu poveikiu tiriamam grybui, jų inhibicinės zonos ilgiausios, mikrogybo kolonijų ilgiai apie 4 kartus trumpesni, nei grybo kolonijų ilgiai kontroliniame mėginyje.

Fusarium mikrogybo jautrumas ir atsparumas medžiagoms, kurias išskiria stipriausiu priešgrybiniu poveikiu pasižymintys mikroorganizmai mėginiuose A, B, C, D, O, yra didesnis už šio grybo jautrumą 100 % koncentracijos fungicido „Folicur“ jautrumui. Duomenys pateikti 4 paveikslėlyje. Šių mikroorganizmų išskirtų medžiagų poveikis mikrogybui apie 1,5 karto stipresnis nei fungicido.



4 pav. *Fusarium* mikrogrybo jautrumo ir atsparumo A, B, C, D, O mikroorganizmų išskirtoms medžiagoms palyginimas su fungicido „Folicur“ kalibracine kreive.

Stipriausiai veikiančių mikroorganizmų poveikis *Fusarium spp.* mikrogrybu pažeistiems grūdams

Išsiaiškinau, kad *Fusarium spp.* mikrogrybą stipriausiai veikia A, B, C, D, O mikroorganizmai, todėl juos naudočiau norėdama išsiaiškinti jų tiesioginį poveikį *Fusarium spp.* mikrogrybu pažeistiems grūdams. Šiuos tyrimus vykdžiau 2 būdais, pažeistą grūdą dėdama ant mikroorganizmo kultūros ir grūdą palaikiusi mikroorganizmų suspensijose. *Fusarium spp.* mikrogrybas gerai auga ant DRBC agarų terpės, o bakterijos šioje terpėje neauga, todėl kultūras auginu tik ant Triptono sojos agarų terpės. Pažeistą grūdą, uždėjusi ant terpės užsėtoms stipriausiai veikiančiais mikroorganizmais, gavau, kad ant 50 % grūdų viršutinės dalies (nesiekusios mikroorganizmų) buvo stebimas silpnas augimas (lyginant su kontroliniu mėginiu). Ant grūdų, palaikytų mikroorganizmų suspensijose, grybo augimo nebuvo. Fuzariozės grybas neišaugo iš grūdų, mirkytų mikroorganizmų suspensijose.

Stipriausiai veikiantys mikroorganizmai

Gentį (rūšį) nustačiau tų mikroorganizmų, kurie neleido augti *Fusarium spp.* mikrogrybui iš grybu pažeisto grūdo. Aišku buvo, kad A, B, C, O mėginiuose yra tas pats mikroorganizmas, mikroskopuojant nustačiau, kad tai yra gram– lazdelės išsidėstę pavieniai, o D mėginyje kitas organizmas – lazdelės, išsidėstę po dvi, gram–.

Atlikus Oksidazės testus pamačiau, kad visos penkios kultūros nusidažė mėlynai – visų oksidazės testas buvo teigiamas (6 priedas).

Atlikus mikroorganizmų judrumo tyrimą paaiškėjo, kad visose kultūrose mikroorganizmai nejudrūs.

Kadangi pagal kvapą ir išvaizdą lėkštelėje ir per mikroskopą mikroorganizmai buvo identiški, toliau tyriau tik du mėginius – B ir D (juos buvau pažymėjus skaičiais 2 ir 4).

Įvertinus Biocheminio Fermentų tyrimo „Margosios eilutės“ metodu (Microgen™ GnA+B-ID Sistema) gautus rezultatus gavau kodą, pagal kurį kompiuterio pagalba atradau, kad abiejuose mėginiuose, mikroorganizmas buvo *Pseudomonas fluorescens* (98,04 %), (7 priedas).

Šią *Pseudomonas fluorescens* bakteriją, bus galima kultivuoti ir panaudoti Fuzariozės mikrogrybo naikinimui in vivo. Galvoju, kad radau būdą apsaugoti kviečius nuo Fuzariozės, nenaudojant įvairių kenksmingų cheminių medžiagų. Kaip alternatyvą cheminiams preparatams siūlau naudoti *Pseudomonas fluorescens* bakteriją ir taip, išauginus sveikus javus, sumažinti išmetamų grūdų kiekius ir prisidėti prie globalios žaliavų švaistymo problemos sprendimo.

Išvados

1. Tiriamuose mėginiuose išaugo kokai, lazdelės ir mieliagrybiai.
2. Skirtingų mikroorganizmų derinių priešgrybinis poveikis *Fusarium* mikrogrybui skirtingas.
3. Mėginiuose su A, B, C, D, O mikroorganizmais *Fusarium* mikrogrybo kolonijų ilgiai apie 4 kartus trumpesni, nei mikrogrybo kolonijų ilgiai kontroliniame mėginyje.
4. Stipriausiu priešgrybiniu poveikiu pasižymi iš biologinio valymo nuotekų vandens išskirtos gram-lazdelės, išsidėsčiusios pavieniai ir po dvi.
5. Stipriausiu priešgrybiniu poveikiu pasižymi *Pseudomonas fluorescens*. Jo poveikis 1,5 karto stipresnis nei fungicido „Folicur“.
6. Fuzariozės grybas neišaugo iš grūdų, mirkytų mikroorganizmų suspensijose.

Literatūra

1. Lugauskas, A. ir kt. (2002). *Patogeniški ir toksiški mikroorganizmai žmogaus aplinkoje*, Vilnius;
2. *Nuotekų valymo būdai* (2018 m. rugpjūčio 27 d.). Internetinė svetainė. Prieiga internete: <http://nuotekuvalymoirenginiaiainos.lt/nuoteku-valymo-budai/>;
3. *Augalų išskirtų medžiagų poveikis Fusarium grybo augimui* (2018 m.), V. Staneikaitė. Prieiga internete: <https://duomenys.ugdome.lt/?/mm/gamtamokslis/med=31/308>;
4. *Fusarium link genties grybai - sandėliuojamų grūdų teršėjai* / Rimutė Mačkinaitė. Vilnius, Botanikos institutas. 2007. Prieiga internete: [https://elaba.lvb.lt/primo-explore/fulldisplay?docid=ELABAPDB5908363&context=L&vid=ELABA&lang=lt_LT&search_scope=eLABa&adaptor=Local%20Search%20Engine&tab=default_tab&query=any,contains,Fusarium,AND&mode=advanced&offset=0](https://elaba.lvb.lt/primo-explore/fulldisplay?docid=ELABAPDB5908363&context=L&vid=ELABA&lang=lt_LT&search_scope=eLABa&adaptor=Local%20Search%20Engine&tab=default_tab&query=any,contains,Fusarium,AND&mode=advanced&offset=0;);
5. Grybo *Fusarium graminearum* išplitimas, chemotipų struktūra, patogeniškumas ir kontrolė Lietuvoje auginamuose kviečiuose. Stumbrienė, Karina; 2018, Aleksandro Stulginskio universitetas. Prieiga internete: https://elaba.lvb.lt/primo-explore/fulldisplay?docid=ELABAETD29678088&context=L&vid=ELABA&lang=lt_LT&search_scope=eLABa&adaptor=Local%20Search%20Engine&tab=default_tab&query=any,contains,Fusarium,AND&mode=advanced&offset=0;
6. Detection and detoxification of *Fusarium* spp. contaminated cereal grains for malt production by antifungal bioagents. Černauskas, Darius; 2017. Kauno technologijos universitetas. Prieiga internete: https://elaba.lvb.lt/primo-explore/fulldisplay?docid=ELABAETD21035444&context=L&vid=ELABA&lang=lt_LT&search_scope=eLABa&adaptor=Local%20Search%20Engine&isFrbr=true&tab=default_tab&query=any,contains,Fusarium,AND&mode=advanced&offset=0.

Priedas

1 Priedas

Grybelio genties tyrimas (atliktas Vilniaus Universiteto gamtos mokslų fakulteto laboratorijose).

- Grybo DNR paruošimas PGR reakcijai:

Gabalėlį grybo micelio įdėjau į mėgintuvėlį su 50 µL fiziologinio tirpalo, sumaišiau sūkurinėje kratyklėje ir 10 min pakaitinau 96 °C temperatūroje.

- Polimerazės grandininė reakcija (PGR).

40 µL reakcijos mišinio sudarė: 2x Maxima Hot Start Green PCR Master Mix, po 1 µL (100 µM koncentracijos) atvirkštinio ir tiesioginio pradmenų, 3 µL DNR ir vanduo.

PGR programa: pradinė denatūracija 95 °C – 3 min., 30 kartų ciklas: denatūracija 95 °C – 25 s, pradmenų prilydimas 50 °C – 25 s, DNR sintezė 72 °C – 1 min., galutinė DNR sintezė 72 °C – 3 min..

Termocikleris: Eppendorf „Mastercycler EP“; pradmenis naudoju darbe buvo iš : Smit E, Leeflang P, Glandorf B, Dirk van Elsas J, Wernars K. Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR–Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology. 1999;65(6):2614-2621.

- DNR elektroforezė

DNR elektroforezę atliekau horizontaliame 1,0 % agarozės gelyje TAE buferyje. Elektroforezės gelį dažiau etidžio bromido tirpale ir analizavau ultravioletinėje šviesoje. DNR fragmentus lyginau su Gene Ruler™ DNA ladder Mix molekulinį masių standartu.

Elektroforezės 50xTAE buferis: 121 g Tris-OH, 18,6 g natrio EDTA, 28,6 ml acto rūgšties (99,5 %), vandens – iki 500 ml.

Iš gautų rezultatų sprendžiu, kad grybas tikrai priklauso rūšiai *Fusarium graminearum*.

2 Priedas

Gramo dažymo būdas.

Pasiruošiau fiksuotus preparatus. Objektinius stiklelius, ant kurių ruošiau preparatus, gerai nuvaliau etanoliu, kad ant jo nebūtų jokių kitų mikroorganizmų. Tada ant jų dėjau lašą distiliuoto vandens ir jame paskirsčiau ląstelių mases. Sumaišius bakterijų ląsteles su vandeniu, palaukiau, kol išgaruos vanduo. Tepinėliams išdžiūvus objekcinio stiklelio apatinę pusę pakaitinau 3 kartus po kelias sekundes virš liepsnos – taip fiksavau preparatus. Šis fiksavimas reikalingas tam, kad dažymo metu mikroorganizmai nenusiplautų. Tuo pačiu, fiksacijos metu, nužudomi dažomi mikroorganizmai.

Tada ant paruoštų preparatų užpyliau – kristalvioleto ir palaikiau apie 1 min.. Po to pridėjau jodo tirpalo ir palaikiau taip pat 1 min. Jodas padidina sąveiką tarp ląstelės ir dažo – kuo dažas stipriau prisikabina, tuo ryškiau nusidažo mėginiai. Toliau mėginius blukinau 95 % etanoliu apie 20 sekundžių. Po blukinimo preparatus pakartotinai dažiau safraninu apie 1–2 min.

3 Priedas

2 lentelė. Grybo *Fusarium spp.* augimas mitybinėje Triptono sojos agaro terpėje (mm).

Mėginio Nr.	<i>Fusarium spp.</i> grybo kolonijų ilgiai (mm)	Vidutiniai <i>Fusarium spp.</i> mikrogrybo kolonijų ilgiai (mm)		
		x ± Mx	V%	P%
1	27; 27; 26	26,674 ± 0,111	1,020	0,417
2	26; 24; 25	24,962 ± 0,222	2,181	0,890
3	27; 25; 27	26,347 ± 0,222	2,066	0,843
4	22; 20; 20	20,962 ± 0,222	2,597	1,060
5	34; 32; 34	33,347 ± 0,222	1,632	0,666
6	42; 42; 43	42,375 ± 0,077	0,511	0,181
7	38; 38; 40	38,962 ± 0,222	1,397	0,570
8	25; 24; 24	24,481 ± 0,111	1,112	0,454
9	28; 26; 28	27,347 ± 0,222	1,990	0,813
10	31; 29; 31	30,347 ± 0,222	1,794	0,732
11	30; 26; 26;	27,925 ± 0,444	3,899	1,592
12	29; 26; 28	28,021 ± 0,333	2,914	1,190
13	33; 30; 33	32,021 ± 0,333	2,550	1,041
14	35; 30; 35	32,021 ± 0,333	2,550	1,041
15	41; 40; 41	40,962 ± 0,222	1,329	0,543
16	30; 30; 31	31,347 ± 0,222	1,736	0,709

4 Priedas

3 lentelė. Fungicido „FOLICUR“ skirtingų koncentracijų tirpalų poveikis grybelio *Fusarium graminearum* augimui.

Fungicidas „FOLICUR“ tirpalo koncentracijos	0 %	12,5 %	25 %	50 %	75 %	100 %
<i>Fusarium</i> grybo ilgis, mm	0	26	22	19	16	15

5 lentelė. Grybo *Fusarium spp.* augimas mitybinėje Triptono sojos agarų terpėje veikiant grynintas mikroorganizmų kolonijas

Mėginys	Mėginio Nr.	<i>Fusarium spp.</i> grybo kolonijų ilgiai (mm)	Vidutiniai <i>Fusarium spp.</i> mikrogrybo kolonijų ilgiai (mm)		
			$\bar{x} \pm Mx$	V%	P%
A	3	11; 10; 11	10,674 \pm 0.111	2,550	1,041
B	3	11; 9; 11	10,347 \pm 0.222	5,261	2,148
C	3	12; 11; 12	11,674 \pm 0.111	2,331	0,952
D	4	11; 10; 12	10,962 \pm 0.222	4,966	2,027
E	4	15; 14; 15	14,674 \pm 0.111	1,855	0,757
F	4	18; 15; 16	16,443 \pm 0.333	4,966	2,027
G	3	18; 19; 19	18,674 \pm 0.111	1,457	0,595
H	4	19; 18; 18	18,481 \pm 0.111	1,473	0,601
I	8	17; 17; 18	17,481 \pm 0.111	1,557	0,636
J	11	21; 24; 22	22,443 \pm 0.333	3,638	1,485
K	11	25; 26; 29	26,925 \pm 0.444	4,043	1,651
L	8	24; 25; 25	25,481 \pm 0.111	1,068	0,436
M	4	16; 15; 14	14,962 \pm 0.222	3,638	1,485
N	8	18; 19; 16	11,875 \pm 1.454	34,641	12,247
O	8	12; 11; 10	10,962 \pm 0.222	4,966	2,027
P	3	18; 17; 20	18,443 \pm 0.333	4,427	1,807

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No. *MVI**Mikrobiologijas laboratorija*Specimen Type: *diava Nr.2*

Date: _____

				GN A wells												GN B wells											
Well Number				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose.	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	4			4			0			0			0			0			0			0			1		

Octal Code: _____

Final Identification: _____

WF6125/08/03

GN-ID A+B PANEL REPORT FORM

Lab. No. *MVI**MIKROBIOLOGIJAS
LABORATORIJA*Specimen Type: *diava Nr.4*

Date: _____

				GN A wells												GN B wells											
Well Number				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Reaction	Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H2S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V.P.	Citrate	TDA	Gelatine	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose.	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
Result	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	4			4			0			0			0			0			0			0			1		

Octal Code: _____

Final Identification: _____

WF6125/08/03

Microgen ID

Microgen GNA + B Oxidase Positive

Specimen Details

Lab Ref.: MVI Mikrobiologijas laboratorija

Date: 2019.03.21

Name: Viktorija

Specimen Type:

Source (ward/location): dirva

Results Entry

Octal Code: 440000001

+ OXI	Oxidase	- MOT	Motility	- NIT	Nitrate Reduction
+ LYS	Lysine Decarboxylase	- ORN	Ornithine Decarboxyl	- H2S	H2S Production
- GLU	Acid from Glucose	- MAN	Acid from Mannitol	- XYL	Acid from Xylose
- ONP	ONPG	- IND	Indole	- UR	Urea Hydrolysis
- VP	Voges Proskauer	- CIT	Citrate Utilization	- TDA	Tryptophan Deaminase
- GEL	Gelatin Liquefaction	- MAL	Malonate Inhibition	- INO	Acid from Inositol
- SOR	Acid from Sorbitol	- RHA	Acid from Rhamnose	- SUC	Acid from Sucrose
- LAC	Acid from Lactose	- ARA	Acid from Arabinose	- ADO	Acid from Adonitol
- RAF	Acid from Raffinose	- SAL	Acid from Salicin	+ ARG	Arginine Dihydrolase

Identification Analysis

	<i>Ps.fluorescens-35</i>	<i>Moraxella spp.</i>	<i>Ps.putida</i>	<i>A.faecalis type 11</i>	<i>Ps.stutzeri</i>
Select ID Choice	Yes	No	No	No	No
Probability	1/492	1/32.250	1/205.171	1/316.870	1/861.148
Percent Probability	98,04%	1,5%	0,24%	0,15%	0,06%
Likelihood	1,32%	0,05%	<0,01%	<0,01%	<0,01%
Human Isolate	Yes	Yes	Yes	No	Yes
Tests against					
Test 1	MOT (94%)	ARG (0,1%)	MOT (99,9%)	ARG (0,1%)	MOT (99,9%)
Test 2			CIT (95%)	MOT (91%)	ARG (14%)
Test 3					NIT (81%)
Additional Tests	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Oxidation of Glucose	99,9%	0,1%	99,9%	0,1%	99,9%
Growth on Cetrimide	80%	0%	89%	12%	0,1%
Growth on MacConkey	99,9%	70%	99,9%	99,9%	99,9%
Growth on SS Agar	86%	0,1%	99,9%	78%	54%
Growth in 0% NaCl	99%	43%	99,9%	99,9%	96%
Additional Comments	2 Previously <i>A.faecalis</i> . Usually isolated from the environment				2

Identification Comments

Acceptable Identification of *Pseudomonas fluorescens* 37°C

The strain is not typical (one or more tests may be against), although it is well separated from other suggested identification choices