

УДК 579.2

М.Б. Галкін, Н.В. Ліманська, Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: aerugen@onu.edu.ua

**ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВКИ БАКТЕРІЯМИ
LACTOBACILLUS PLANTARUM НА КОРЕНЯХ
РОСЛИН *LEPIDIUM SATIVUM L.***

*Проведено дослідження формування біоплівки молочнокислими бактеріями на поверхні коренів тест-рослин крес-салату *Lepidium sativum L.* Встановлено, що за змодельованих умов клітини бактеріоциногенних штамів *Lactobacillus plantarum* мають здатність до адгезії та формування біоплівки на коренях тест-рослин, на відміну від бактерій *Lactococcus lactis*. Вивчення механізмів формування біоплівки бактеріями *Lactobacillus plantarum* ONU 87 на коренях рослин показало, що вибіркова інактивація основних груп адгезинів по різному впливає на цей процес. Інактивація S-шару призводить до припинення адгезії бактерій, інактивація поверхневих поліцукридів – до припинення формування мікроколоній, а видалення тейхоевих кислот – до інгібування процесу дозрівання біоплівки.*

*Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, біоплівка, адгезини, *Lepidium sativum L.**

Використання синтетичних речовин таких як гербіциди, пестициди, стимулятори росту часто призводить до порушення балансу взаємовідносин між рослинами та мікроорганізмами ризосфери, що в свою чергу надає перевагу фітопатогенним мікроорганізмам і призводить до значних втрат рослинної продукції від інфекційних хвороб. В зв'язку з цим актуальним є пошук підходів до біологічного контролю за формуванням нормальної мікробіоти ризосфери та захисту від фітопатогенних мікроорганізмів, особливо в умовах гідропоніки та інших умовах штучного вирощування рослин [2, 11].

Відомо, що на коренях рослин в ґрунті формується біоплівка, яка складається з представників різних видів мікроорганізмів [3, 4]. Біоплівка виконує багато життєво важливих для рослин функцій, зокрема забезпе-

© М.Б. Галкін, Н.В. Ліманська, Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця, 2012



чує захист рослин від фітопатогенних мікроорганізмів. Цей захист може бути обумовлений як продукуванням широкого спектру біосурфактантів, антибіотиків та бактеріоцинів, так і блокуванням сайтів адгезії на коренях [1,7]. Порушення у формуванні структури біоплівки відкриває можливість фітопатогенним мікроорганізмам взаємодіяти з тканинами рослини та викликати її захворювання.

Пошук інструментів біологічного контролю фітопатогенних бактерій доцільно проводити серед мікроорганізмів, які з одного боку здатні продукувати антимікробні метаболіти, а з іншого формувати біоплівку на коренях та інтегруватися у природні біоплівки, підсилюючи їх захисні властивості. Однією з перспективних груп таких мікроорганізмів є бактерії роду *Lactobacillus*, більшість з яких здатні продукувати бактеріоцини [9, 10]. Незважаючи на те, що у природних умовах представників роду *Lactobacillus* знаходять на рослинах, механізми взаємодії цих бактерій з рослинами, особливо з їх кореневою системою, вивчені недостатньо.

Метою даної роботи було вивчення особливостей та механізмів формування біоплівки бактеріями *Lactobacillus plantarum* на коренях рослин крес-салату.

Матеріали та методи

В роботі були використані штами молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU 87, *Lactobacillus plantarum* ONU 12, для яких встановлено здатність продукувати бактеріоцини, штам лактококів *Lactococcus lactis* ONU 505, які не притаманні для мікробіоти рослин, та штам ґрунтової бактерії *Pseudomonas fluorescens* ONU303. *Lactobacillus plantarum* ONU 87, *Lactobacillus plantarum* ONU 12 та *Lactococcus lactis* ONU 505 вирощували на середовищі MRS за температури 37 °С, штам *Pseudomonas fluorescens* ONU 303 — на середовищі Гіса за 25 °С.

Для вивчення формування біоплівки бактеріями на коренях рослин використовували крес-салат *Lepidium sativum* L. сорту «Ажур». Насіння крес-салату стерилізували шляхом занурення на 3 хв у 70% етанол та переносили на диски стерильного фільтрувального паперу у чашки Петрі. Диски заливали стерильною водогінною водою та витримували за кімнатної температури впродовж 3 діб. Після проростання відбирали проростки з довжиною кореня 2–3 см. Контроль стерильності насіння та проростків здійснювали шляхом викладання на чашки Петрі з МПА та інкубування при 37 °С впродовж 24 год.

Отримані проростки переносили до 48-лункового планшета по одному до кожної лунки, що містили по 1 мл суспензії клітин бактерій в концентрації 10^8 КУО/мл в середовищі MRS. Проростки з бактеріями в планшетах інкубували 24 год при 37 °С.

Після інкубації проростки промивали від не прикріплених до кореня клітин шляхом занурення у фізіологічний розчин. Сформовану біоплівку

фіксували 96% етанолом впродовж 15 хв та забарвлювали 1% розчином акридинового помаранчевого впродовж 5 хв. Забарвлені проростки ретельно висушували на предметному склі, мікроскопували з використанням мікроскопу Primo Star PC, Carl Zeiss при збільшені $\times 900$ та фотографували з використанням камери Olympus DCM (3,0 M pixels). Сформованість біоплівки оцінювали за системою чотирьох плюсів (табл. 1).

Таблиця 1

Критерії оцінки сформованості біоплівки

Table 1

The criteria of biofilm quality assessing

Значення	Критерії
—	Адгезія бактерій не спостерігається, біоплівка не формується.
+	Біоплівка представлена адгезованими клітинами практично без мікроколоній.
++	Біоплівка представлена поодинокими повністю сформованими мікроколоніями.
+++	Біоплівка середньої товщини з розривами у структурі.
++++	Біоплівка середньої або більше товщини без розривів у структурі, добре сформований матрикс.

Вивчення механізмів адгезії бактерій *L. plantarum* до поверхні коренів здійснювали шляхом вибіркової інактивації основних груп адгезинів. Поверхневі поліцукриди інактивували шляхом їх окиснення метаперіодатом натрію [6]. Для цього суспензію бактеріальних клітин (10^8 КУО/мл) інкубували 18 год при 4 °С у 100 мМ розчині метаперіодату натрію в 0,1 М CH_3COONa з рН 5,5. Після інкубації суспензію клітин тричі відмивали фізіологічним розчином та інкубували 1 год з 100 мМ NaBH_4 при 4 °С. Після інкубації та відмивання клітини ресуспендували у середовищі MRS. Тейхоеві кислоти вилучали з клітинної стінки шляхом обробки суспензії клітин *L. plantarum* 30% трихлороцтовою кислотою (ТХО) при 37 °С впродовж години [12]. Білки S-шару клітинної стінки вилучали за інкубації бактерій впродовж 15 хв 5 М LiCl у середовищі MRS на льоду [5]. Після цього бактерії тричі відмивали фізіологічним розчином та ресуспендували у середовищі MRS.

Життєздатність клітин *L. plantarum* після інактивації адгезинів підтверджували шляхом висівів оброблених клітин на чашки Петрі з твердим середовищем MRS.

Результати та їх обговорення

Вивчення особливостей формування біоплівки бактеріоциногенними штамами *Lactobacillus plantarum* показало, що обидва досліджувані штами лактобацил виявляють здатність взаємодіяти з коренями тест-рослин.



Для порівняння формування біоплівки бактеріями штамів *L. plantarum* порівнювали з біоплівками ґрунтової бактерії *Pseudomonas fluorescens* ONU 303 та *Lactococcus lactis* ONU 505, що не зустрічається на рослинах за природних умов.

Отримані результати (рис. 1) показали, що *P. fluorescens* ONU 303 вже за 24 год інкубації формує розвинену біоплівку середньої товщини, яка займає практично усю поверхню кореня та складається з добре сформованих мікроколоній та матриксу. Загалом сформованість біоплівки *P. fluorescens* ONU 303 оцінено як «++++» (табл. 2).

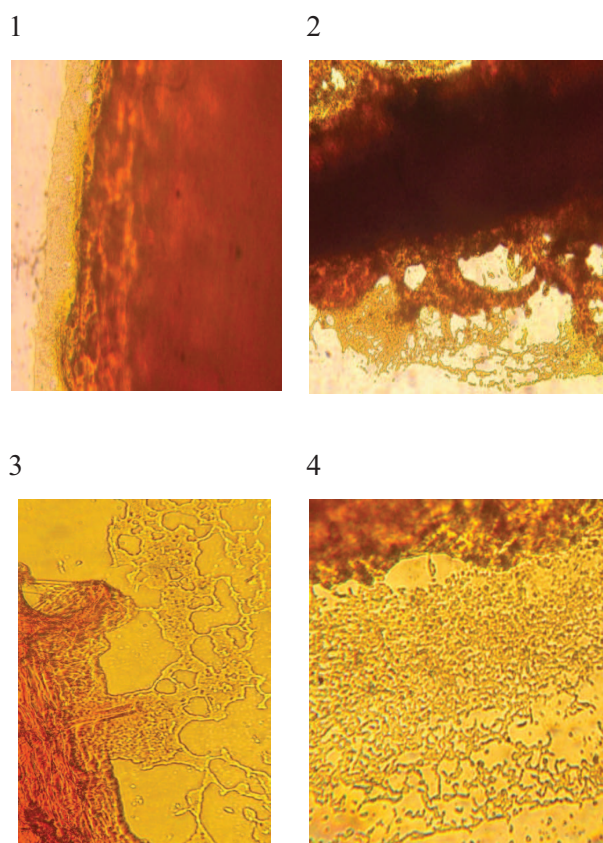


Рис. 1. Біоплівка досліджуваних бактерій на поверхні коренів крес-салату
1 – *Pseudomonas fluorescens* ONU 303; 2* – *Lactococcus lactis* ONU 505;
3 – *Lactobacillus plantarum* ONU 12; 4 – *Lactobacillus plantarum* ONU 87.
Примітка: * – інкубація 48 год

Fig.1. Biofilm formation of bacteria test-strains on the roots of watercress lettuce
1 – *Pseudomonas fluorescens* ONU 303; 2* – *Lactococcus lactis* ONU 505;
3 – *Lactobacillus plantarum* ONU 12; 4 – *Lactobacillus plantarum* ONU 87.
Note: * – 48 hours incubation

У порівнянні з *P. fluorescens* ONU 303, бактерії *L. lactis* ONU 505 виявили набагато меншу здатність до формування біоплівки на коренях

тест-рослин (рис. 1). Так, після першої доби інкубації біоплівку цих бактерій на поверхні коренів не виявили, або спостерігали поодинокі адгезовані клітини. Таким чином, ступінь сформованості біоплівки бактеріями *L. lactis* ONU 505 за 24 год оцінювали як «-» та «+». Через 48 годин інкубації біоплівка *L. lactis* ONU 505 складалася з поодиноких, але повністю розвинутих мікроколоній, з численними зонами розриву. Ці структури нерівномірно покривали поверхню кореня та концентрувалися переважно у зоні кореневих волосків. На більшості досліджених ділянок контакт між мікроколоніями був відсутнім і лише місцями виявлено структури, які були наближені до сформованої біоплівки. Загалом на 48 год інкубації сформованість біоплівки *L. lactis* ONU 505 на коренях крес-салату оцінено «++».

Таблиця 2

Оцінка сформованості біоплівки досліджуваних штамів мікроорганізмів

Table 2

Quality assessment of biofilm formation by used test-strains

Штам	Час інкубації, год	Оцінка сформованості біоплівки
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ONU 303	24	++++
	48	++++
<i>Lactococcus lactis</i> ONU 505	24	-/+
	48	++
<i>Lactobacillus plantarum</i> ONU 12	24	+++
	48	+++
<i>Lactobacillus plantarum</i> ONU 87	24	++++
	48	++++

Очевидно, отримані результати свідчать про те, що *L. lactis* в природних умовах не взаємодіє з рослинами і не входить до мікробіоти філо- та ризосфери рослин.

Дослідження бактеріоциногенних штамів *L. plantarum* щодо формування біоплівки на коренях крес-салату (рис. 1.) показало здатність обох штамів утворювати біоплівку за 24 год інкубації. Оцінювання сформованості біоплівок виявило деякі специфічні штамові особливості. Біоплівка *L. plantarum* ONU12 була добре сформованої структури середньої товщини з розвинутим матриксом. Вона не була прикріпленою до кореня по всій своїй площі. Ділянки біоплівки, які були прикріплені до кореня мали вигляд тяжів.

Біоплівка *L. plantarum* ONU 87 мала значну товщину та рівномірність по поверхні. В біоплівці бактерій цього штаму виявлено зони з різним рівнем розвитку матриксу. З віддаленням від кореня біоплівка ставала менш щільною. В цілому сформованість біоплівки штамів *L. plantarum* можна якісно оцінити як «+++» для *L. plantarum* ONU 12 та «++++» для *L. plantarum* ONU 87.



Для подальшого вивчення механізмів адгезії лактобацил до поверхні коріння проростків крес-салату використано штам *L. plantarum* ONU 87, який більш здатний до формування біоплівки. У зв'язку з тим, що механізми адгезії бактерій роду *Lactobacillus* є добре вивченими [5], з'ясування механізмів адгезії та формування біоплівки здійснювали шляхом інактивації поверхневих поліцукридів, тейхоєвих кислот та S-шару.

Отримані результати (рис. 2) свідчать про те, що всі три основні групи адгезинів тою чи іншою мірою обумовлюють адгезію та формування біоплівки штаму *L. plantarum* ONU 87 на поверхні коренів тест-рослин. Так, обробка клітин штаму *L. plantarum* ONU 87 метаперіодатом натрію, що призводить до інактивації поверхневих поліцукридів (рис. 2.), не впливала на здатність клітин бактерій штаму до адгезії, але порушувала формування мікроколоній. Оцінка сформованості біоплівки змінювалася з «++++» у контролі до «+» (табл. 3). Отримані результати уможливають припущення, що поверхневі поліцукриди не впливають на адгезію клітин до поверхні кореня тест-рослин, але обумовлюють агрегацію клітин, тобто формування мікроколоній.

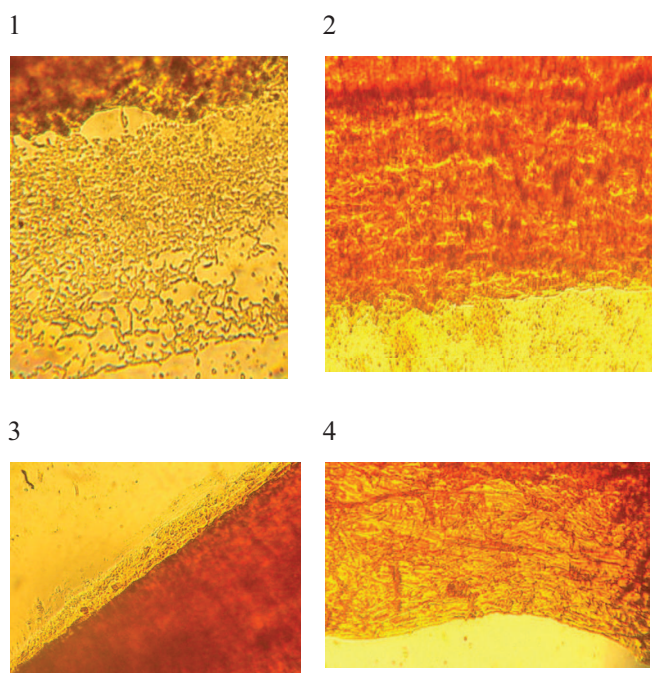


Рис. 2. Біоплівка бактерій *L. plantarum* ONU 87 на поверхні коренів крес-салату за інактивації окремих груп адгезинів

1 — контроль; 2 — інактивація поверхневих поліцукридів;
3 — інактивація тейхоєвих кислот; 4 — інактивація S-шару

Fig.2. *L. plantarum* ONU 87 biofilm formation on the surface of the roots of tested plants after different adhesions groups inactivation

1— control; 2 — surface polysaccharide inactivation;
3 — teichoic acid inactivation; 4 — S-layer inactivation

Вилучення тейхоевих кислот (рис. 2) також призводить до порушення структури біоплівки бактерій *L. plantarum* ONU 87. Обробка бактерій 30% ТХО не порушувала адгезію та формування мікроколоній, проте оброблені таким чином клітини формували біоплівку зі значно порушеною архітектурою. Біоплівка мала вигляд окремих мікроколоній практично не зв'язаних між собою. Можна припустити, що у системі взаємодії бактерій *L. plantarum* ONU 87 з коренями крес-салату, тейхоеві кислоти відіграють провідну роль у дозріванні біоплівки. Якісна оцінка формування біоплівки змінювалася з «++++» до «++» у порівнянні з контролем (табл. 3).

Таблиця 3

Оцінка сформованості біоплівки бактерій *L. plantarum* ONU 87 за вибіркової інактивації основних груп адгезинів

Table 3

Changes in quality of *L. plantarum* ONU 87 biofilm after selective inactivation of the major adhesions groups

Інактивовані адгезини	Оцінка сформованості біоплівки
Контроль	++++
Поліцукриди	+
Тейхоеві кислоти	++
Білки S-шару	-

Інактивація білків S-шару клітин *L. plantarum* ONU 87 5М розчином LiCl призводила до повної втрати клітинами здатності до адгезії на коренях крес-салату (рис. 2). S-шар є складним комплексом поверхневих білків, які знаходяться у кристалічній формі [8]. Ця структура розташована на поверхні клітин бактерій і виконує декілька важливих функцій, у тому числі відповідає за адгезію. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що у змодельованій системі взаємодії між *L. plantarum* ONU 87 та кореневою системою тест-рослини, ключовим компонентом, який відповідає за адгезію, є саме білки S-шару.

Таким чином, підсумовуючи отримані результати можна зробити висновок, що досліджені бактеріоциногенні штами *L. plantarum* проявили досить добру здатність до формування біоплівки на коренях тест-рослин. Механізм адгезії бактерій *L. plantarum* ONU 87 до коренів крес-салату переважно залежить від білків S-шару. Поліцукриди, що розташовані на поверхні клітинної стінки відповідають, очевидно, за формування мікроколоній, а тейхоеві кислоти — за процес дозрівання біоплівки.

Виходячи з отриманих результатів можна зробити висновок, що *L. plantarum* ONU 87 у зв'язку зі здатністю до формування біоплівки та



синтезу бактериоцинів може бути перспективним для подальшого дослідження як потенційний компонент пробіотичного препарату для захисту рослин від інфікування фітопатогенними бактеріями.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Amellal N., Burtin G., Bartoli F., Heulin T. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – V. 64. – P. 3740–3747.
2. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production. // Plant Physiology. – 2004. – V. 134. – P. 307–319.
3. Costerton J.W. Overview of microbial biofilms. // J. Ind. Microbiol. – 1995. – V. 15. – P. 137–140.
4. Davey Marry Ellen, O'Toole George A. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics // Microbiology and molecular biology reviews. – 2000. – V. 64. – № 4. – P. 847–867.
5. Kos B., Suskovic J., Vukovic S., Simpraga M., Frece J., Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. // J. Appl. Microbiol. – 2003. – V. 94. – P. 981–987.
6. Lorca G., Torino M.I., de Valdez G.F., Ljungh A. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. // FEMS Microbiology Letters. – 2002. – V. 206. – P. 31–37
7. Lugtenberg B.J.J., Chin-A-Woeng T.F., Bloemberg G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2002. – V. 81. – P. 373–383.
8. Mobili P., Gerbino E., Tymczynszyn E.E., Gómez-Zavaglia A. S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. // Curr. Res. Tech. Ed. Top. in Appl. Microbiol. and Biotech. (Ed) A. Mendez-Vilas. – 2010. – P. 1224–1234.
9. Ogunbanwo S.T., Sanni A.I., Onilude A.A. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. // African J. Biotech. – 2003. – V. 2. – P. 219–227.
10. Ruiz-Barba J.L., Cathcart D.P., Warner P.J., Jiménez-Díaz R. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a Bacteriocin Producer, as a Starter Culture in Spanish-Style Green Olive Fermentations. // Appl. Environ. Microbiol. – 1994. – V. 60. – P. 2059–2064.
11. Stanghellini M.E., Miller R.M. Biosurfactants. Their Identity and Potential Efficacy in the Biological Control of Zoosporic Plant Pathogens. // Plant Disease. – 1997. – V. 81. – P. 4–12.
12. Zárata G., Morata De Ambrosini V., Chaia A.P., González S. Some factors affecting the adherence of probiotic *Propionibacterium*

acidipropionici CRL 1198 to intestinal epithelial cells. // Can. J. Microbiol. — 2002. — V. 48. — P. 449–457.

Стаття надійшла до редакції 20.09.2012 р.

Н.Б. Галкин, Н.В. Лиманская, Т.О. Филиппова, В.А. Иваница

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: aerugen@onu.edu.ua

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЁНКИ БАКТЕРИЯМИ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* НА КОРНЯХ *LEPIDIUM SATIVUM* L.

Реферат

Проведено изучение формирования биоплёнки клетками бактериоциногенных штаммов *Lactobacillus plantarum* на поверхности корней тест-растений крес-салата *Lepidium sativum*. Показано, что оба исследованных штамма обладают способностью к адгезии и формированию биоплёнки в отличие от молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis*. Исследование механизмов образования биоплёнки бактериями штамма *Lactobacillus plantarum* ONU 87 на корневой системе растений показало, что избирательная инактивация основных групп адгезинов по-разному влияет на этот процесс. Инактивация S-слоя приводила к прекращению адгезии, инактивация поверхностных полисахаридов — к прекращению формирования микроколоний, а инактивация тейхоевых кислот — к ингибированию процесса созревания биоплёнки.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, биоплёнка, адгезины, *Lepidium sativum* L.

M.B. Galkin, N.V. Limanska, T.O. Philipova, V.O. Ivanytsia

Odesa National Mechnikov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (048) 765 33 61, e-mail: aerugen@onu.edu.ua

BIOFILM FORMATION BY *LACTOBACILLUS PLANTARUM* BACTERIA ON *LEPIDIUM SATIVUM* L. ROOTS

Summary

Investigation of a biofilm formation ability of *Lactobacillus plantarum* bacteriocinogenic strains on the plant roots shows that each used strain



has a good ability to adhesion and biofilm formation on the test-plant roots surface in contrast to *Lactococcus lactis*. Study of the mechanisms of biofilm formation by test strains on the root system of plants has shown that selective inactivation of the major groups of adhesions different by influences on this process. Since inactivation of S-layer led to the cessation of adhesion, inactivation of surface polysaccharides to the cessation of microcolonies formation and inactivation of teichoic acids to the inhibition of the biofilm maturation process.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, biofilm, adhesions, *Lepidium sativum* L.

