

**Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації організмів
та дослідження біорізноманіття**

// Trends Plant Sci. — 2004. — V. 10. — P. 484—489.

5. Verma S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alert the activities of antioxidant enzymes in grooving rice plants / S. Verma, R.S. Dubey // Plan. Sci. — 2003. — V. 64. — P. 645—655.

УДК 579.2:577.19

**ЗМІНА РЕАКЦІЙ ХЕМОТАКСИСУ *RHIZOBIUM*
RADIOBACTER ДО ЕКСТРАКТУ МОРКВИ
У ПРИСУТНОСТІ АНТАГОНІСТА
*LACTOBACILLUS PLANTARUM***

Д. В. Сокол, Н. В. Ліманська, М. Б. Галкін

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
E-mail: sokoldima94@gmail.com

Хемотаксис – це своєрідна моторна відповідь рухливих клітин на хімічні речовини шляхом цілеспрямованого руху до атрактантів і від репелентів [2]. Первинний контакт неприкріпленої бактерії відбувається внаслідок спрямованого руху, зумовленого хемотаксисом. Великої шкоди агропромисловості завдають фітопатогени, ефективних методів боротьби з якими ще досі не розроблено. Збудниками бактеріального раку більшості рослин є *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens* - за минулою класифікацією) та *R. vitis*, які загрожують насадженням цінних рослин, таких, наприклад, як виноград і яблуна. Ці патогени швидко розповсюджуються з ґрунтом, зберігаючись у ньому роками, і внаслідок цього молоді насадження можуть швидко загинути [3]. Тому актуальним є захист насаджень від фітопатогенів. Лактобацили з фруктів та овочів мають здатність до пригнічення фітопатогенних мікроорганізмів. Антагоністична активність цих бактерій забезпечується органічними кислотами, пероксидом водню і бактеріоцинами, але також було описано й мікробну конкуренцію [5].

Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації організмів та дослідження біорізноманіття

Метою нашого дослідження була розробка простої методики виявлення реакцій фітопатогенів на присутність бактерій-антагоністів на першому етапі патогенезу - хемотаксису до рослинних екстрактів.

Об'єктом дослідження були *Rhizobium radiobacter* PJZ та два штами лактобацил: *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 та *Lactobacillus plantarum* ОНУ 355 [1]. Готували нічну культуру на LB бульйоні для ризобій: пептон – 10 г/л, дріжджовий екстракт – 5 г/л, NaCl – 5 г/л; для лактобацил використовували середовище MRS згідно інструкцій виробника (Sigma Aldrich). Для дослідів готували трьохгодинну культуру фітопатогена. Для дослідження хемотаксису використовували голодний агар (0,5%). У якості атрактанту використовували екстракт соку моркви (сік був профільтрований крізь паперовий фільтр та фільтри 0,22 мкм «Мілліпор»). Посередині чашки Петрі із голодним агаром вносили екстракт моркви на дно чашки в об'ємі 5 мкл. Потім на відстані від точки внесення екстракту у чотирьох послідовностях на однакових відстанях від нього було інокульовано фітопатоген. Експеримент був проведений у двох варіантах: у першому варіанті відстань між точкою інокуляції фітопатогену та бар'єром лактобацил складала 1 см, у другому варіанті – 0,5 см. Потім посередині між фітопатогеном та екстрактом було проведено бар'єр із лактобацил. Два штами лактобацил були протестовані у кожному з варіантів для порівняння. Чашки інкубували в термостаті протягом доби при 28°C. Після цього знімали з чашки агар, фіксували етиловим спиртом 96% 15 хв. Фарбували кристалічним фіолетовим 1% (водний розчин) 10 хв. Висушували протягом доби та мікроскопіювали (світловий мікроскоп, 600x). Під мікроскопом спостерігали прикріпленні бактерії до скла *R. radiobacter* та *L. plantarum*.

Мікроскопіювання поверхонь чашок показало велику кількість бактерій, прикріплених до скла, що свідчить про всебічний ріст і розповсюдження бактерій та формування ними біоплівки. Бактерії обох видів прикріпилися до скла. Це було виявлено при огляді dna чашки у світловому мікроскопі, оскільки ці два види бактерій суттєво вирізняються за формою клітин,

Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації організмів та дослідження біорізноманіття

тому не було потреби у додатковому фарбуванні зразка. Ризобії були видно як дрібні кокоподібні клітини (1-1,5x2-3 мкм), розташовані переважно поодинокі, а лактобацили - як значно більші за розмірами клітини (2-3x4-5 мкм), розташовані переважно у ланцюжках.

Використана нами методика є авторською, перед нами було широке завдання вивчити вплив антагоністичних бактерій на кожен з етапів патогенезу бактеріального раку. Реакції хемотаксису є першою реакцією патогенних ризобій на присутність тканевих рідин раневих поверхонь рослин. Раніше нами було виявлено, що лактобацили є активними антагоністами *R. radiobacter*, і вони здатні пригнічувати патоген як у дослідах на поживних середовищах, так і на рослинах. Дані тези описують дослідження впливу на перший етап патогенезу.

У відсутності атрактанта - екстракта моркви - ризобій розташовувалися по склу поодинокі, без певної направленості, біоплівка була слабо розвинута - дифузійна лише на першому етапі формування.

У контролі, де було введено екстракт моркви, а лактобацили були відсутніми, під впливом атрактантів екстракту моркви клітини ризобій розташовувалися рівномірно по поверхні скла, утворюючи дифузну біоплівку, і були направлені у напрямку точки введення екстракту. Дифузна біоплівка характеризується відсутністю певної структуризації, в тому числі - у ній, як правило, відсутні сформовані мікроколонії [4]. Присутність бар'єрів з клітин лактобацил змінювало реакцію хемотаксису ризобій. Клітини *R. radiobacter* під впливом дифузії речовин починали утворювати мікроколонії, що свідчить про несприятливий вплив тестованих рослинних речовин, оскільки саме грибоподібна біоплівка з її товстим матриксом і складною архітектурою зазвичай формується у більш несприятливих умовах, ніж дифузна, коли бактерії стають менш рухливими [4].

Отже, за присутністю стресового фактору реакції хемотаксису патогена змінювалися.

Захисні властивості бар'єру різних штамів показали, що антагоністичні властивості штамів лактобацил *L. plantarum* ОНУ

Фізіолого-біохімічні аспекти адаптації організмів та дослідження біорізноманіття

355 були проявлені більшою мірою за *L. plantarum* ОНУ 12, оскільки у випадку першого штама утворювалася більш розвинута грибоподібна біоплівка.

Запропоновано просту методику визначення впливу бактерій-антагоністів на першому етапі патогенезу бактеріального раку - на етапі хемотаксису. Дослідження впливу штамів *Lactobacillus plantarum* ОНУ 12 та *Lactobacillus plantarum* ОНУ 355 показало, що присутність лактобацил змінювала реакцію хемотаксису клітин *R. radiobacter*. Під впливом бар'єрів з клітин *L. plantarum* фітопатогенні бактерії утворювали мікроколонії, що свідчить про захисну відповідь на присутність антагоністичних бактерій.

Наступними дослідженнями будуть порівняння прикріплення лактобацил і фітопатогенів на коренях рослин. Лактобацили, розмножуючись на коренях рослин та виділяючи різноманітні речовини з антагоністичним ефектом, можуть попереджувати прикріплення бактерій - збудників захворювань рослин.

Література

1. Квасников Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Квасников Е.И., Нестеренко О.А. — М.: Наука, 1975. — 326 с.
2. Adler J. Chemotaxis in bacteria / J. Adler // Science. — 1966. — 153, № 3737. — P. 708—716.
3. Burr T. J. Biological control of grape crown gall attachment sites on grape cells / T. J. Burr // Phytopathology. — 1997. — Vol. 87. — P. 707—711.
4. Picioreanu C. Microbial motility involvement in biofilm structure formation – a 3D modelling study / [Picioreanu C., Kreft J.-U., Klausen M., et al.] // Water Science and Technology. — 2007. — Vol. 55. — P. 337—343.
5. Tallon R. Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds / Tallon R., Arias S., Bressollier P., Urdaci M.C. // J Appl Microbiol. — 2006. — Vol. 102. — P. 442—451.