

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

Дипломна робота
бакалавра

на тему: **«Конкурентна адгезія бактерій-антагоністів *Lactobacillus plantarum* і фітопатогена *Rhizobium radiobacter*»**

«Competitive adhesion of antagonistic bacteria *Lactobacillus plantarum* and a phytopathogen *Rhizobium radiobacter*»

Виконала: студентка денної форми
навчання
напряму 6.040102 Біологія
Мельникович Діана Борисівна

Науковий керівник
кандидат біологічних наук, доцент
Ліманська Наталія Вікторівна

Рецензент:
кандидат біологічних наук, доцент
Чернадчук Сніжана Сергіївна

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ _____ від «___» _____ р.

Завідувач кафедри
_____ Філіпова Т.О.
(підпис)

Захищено на засіданні ЕК № 2
Протокол № _____ від «___» _____ р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК
_____ Стойловський В.П.
(підпис)

Одеса – 2017

АНОТАЦІЯ

Було проведено дослідження для визначення здатності бактерій-антагоністів *Lactobacillus plantarum* пригнічувати збудника бактеріального раку *Rhizobium radiobacter* на рівні прикріплення. Оптимальними умовами дослідження було культивування бактерій обох видів у середовищі MRS за температури 28°C. Найбільше пригнічення збудників бактеріального раку (60-80%) спричиняли штами-антагоністи *L. plantarum* ОНУ 12, *L. plantarum* ОНУ 311 та *L. plantarum* ОНУ 355. Уперше виявлено, що *R. radiobacter* і *L. plantarum* можуть утворювати змішані біоплівки.

Роботу викладено на 37 сторінках, вона містить 3 таблиці та 5 рисунків. Наведено посилання на 53 джерел літератури (30 кирилицею та 23 латиницею).

Ключові слова: *R. radiobacter*, *L. plantarum*, бактеріальний рак; конкурентна адгезія

Studies of capabilities of antagonistic bacteria *Lactobacillus plantarum* to inhibit crown gall agent *Rhizobium radiobacter* on adhesion level have been carried out. The optimal conditions were cultivation of bacteria of both species in a nutritional medium MRS at 28°C. The most inhibition (60-80%) was caused by the antagonistic strains *L. plantarum* ONU 12, *L. plantarum* ONU 311 and *L. plantarum* ONU 355. For the first time it was found out that *R. radiobacter* and *L. plantarum* can form the mixed biofilms.

Diploma work is expounded on 37 pages, it contains 3 tables and 5 figures. It contains links to 53 literature sources (30 in Cyrillic and 23 - in Latin).

Key words: *R. radiobacter*, *L. plantarum*, crown gall, competitive adhesion

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Біологічні властивості бактерій роду <i>Rhizobium</i>	7
1.1.2. Систематичне положення.....	9
1.1.3. Морфологічні, біохімічні та культуральні властивості.....	9
1.1.4. Геном	10
1.1.4.1 Хромосоми.....	11
1.1.4.2.Плазміди	11
1.1.5. Патогенез захворювання.....	12
1.2. Біологічні властивості бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	13
1.2.1. Систематичне положення.....	14
1.2.2.Морфологічні властивості бактерій роду <i>Lactobacillus</i> ...	15
1.2.3. Культуральні властивості бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	15
1.2.4. Антагоністичні властивості лактобацил.....	16
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	17
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	21
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	29
ВИСНОВКИ.....	31
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	32

ПЕРЕЛІК ТЕРМІНІВ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

МПА – м'ясо-пептонний агар

МРС (MRS) – середовище de Man, Rogosa, Sharp

Ti-плазміда (від англ. «tumor-including») – плазміда, що спричиняє утворення пухлин

LB (англ. Lysogeny broth) - середовище для росту культур бактерій.

ВСТУП

Поверхня надземної частини рослин містить мало поживних речовин, доступних для мікроорганізмів [11], тому представники епіфітної мікробіоти часто знаходяться у так званому некультивуємому стані, в якому бактеріальні клітини здатні виживати завдяки споживанню малої кількості ресурсів [7]. Поява поживних речовин призводить до зміни фенотипового стану клітин у бік підвищеної активності [21]. У цей час особливо важливими для мікроорганізмів постають конкурентні відносини, коли бактерії певних видів виживають краще, ніж інші.

Збудник бактеріального раку *Rhizobium radiobacter* реагує на хімічні сигнали від пошкоджених поверхонь рослин [18]. Рослинні екsudати одночасно несуть поживні речовини і атрактанти для запуску циклу життєдіяльності даного збудника, який призводить до патогенезу бактеріального раку [2]. Для захисту рослин від даного патогена надзвичайно важливим є застосування штамів-антагоністів для біологічного контролю. У літературі описано антагоністи збудника бактеріального раку з декількох родин - *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Rahnella* [5, 12]. Нами уперше було запропоновано використовувати у якості антагоністів молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum* [25]. Перевагами молочнокислих бактерій є їх абсолютна безпечність для людини і тварин, затверджена статусом GRAS - "generally recognized as safe" (англ.) - "абсолютно безпечні". Лактобацили даного виду також населяють поверхні рослин, і саме вони постають основною причиною молочнокислого бродіння ферментованого рослинного матеріалу [15].

Для відбору найефективніших штамів-антагоністів серед лактобацил необхідними є швидкі та прості методики, які б дозволяли за короткий термін виявити штами, які пригнічують початкові стадії патогенезу бактеріального раку. Першою такою стадією є хемотаксис, а другою - адгезія, коли клітини

фітопатогена пересуваються у напрямку до ексудатів рослини і починають прикріплення на рослинній поверхні і формування біоплівки [6].

Метою даної роботи було дослідження конкурентної адгезії бактерій-антагоністів *Lactobacillus plantarum* і збудника бактеріального раку *Rhizobium radiobacter*.

Для досягнення мети дослідження вирішували наступні задачі:

1. Визначити оптимальні умови дослідження рівня адгезивної активності лактобацил і ризобій за конкурентного прикріплення.
2. Дослідити конкурентну адгезію за допомогою бактерій штама *R. radiobacter* PYZ, які несуть плазмиду GFP.
3. Виявити можливість пригнічення прикріплення фітопатогена за наявності бактерій-антагоністів *L. plantarum*.
4. Дослідити здатність *L. plantarum* і *R. radiobacter* утворювати змішані біоплівки.

Об`єкт дослідження – особливості колонізації поверхонь бактеріями за умов межвидової конкуренції.

Предмет дослідження – здатність *L. plantarum* до пригнічення фітопатогена *R. radiobacter* на етапі прикріплення до поверхонь.

Щиро вдячна кандидату біологічних наук доценту Галкіну Миколі Борисовичу за допомогу у експериментах з дослідження біоплівок.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Лактобацили відомі за широким спектром антагоністичних властивостей, тому перспективним постає їх використання для захисту рослин від фітопатогенів.

Важливим є пригнічення збудників захворювань вже на етапі прикріплення до поверхонь, тому метою даної роботи було дослідження конкурентної адгезії бактерій-антагоністів *Lactobacillus plantarum* і збудника бактеріального раку *Rhizobium radiobacter*.

У дослідженні використовували два штами фітопатогена збудника бактеріального раку і п'ять штамів лактобацил, в яких раніше було встановлена виражена антагоністична активність.

Для дослідження конкурентної адгезії нами було запропоновано просту методику, яка може застосовуватись у випадку зіставлення властивостей грампозитивних і грамнегативних бактерій. Для розробки цієї методики нам потрібно було підібрати умови, в яких би і лактобацили і ризобії росли в однаково сприятливих умовах. Проаналізувавши накопичення біомаси бактеріями у двох поживних середовищах за різних температур інкубації нами було виявлено, що оптимальними умовами для спільного інкубування було середовище MRS і температура 28°C, ріст в якому при даній температурі дозволяв отримати за добу 10^7 кл/мл обох видів бактерій.

Адгезію проводили на склі, а сформовані біоплівки фарбували за Грамом. Така методика дозволяла швидко, за одну добу, оцінити потенціал штама-антагоніста щодо пригнічення адгезії фітопатогена.

За добу утворювалася змішана біоплівка, в якій присутність грамнегативних ризобій та грампозитивних лактобацил можна було відмітити візуально за відмінністю забарвлення. Склад біоплівок оцінювали у відсотках за наявністю грамнегативних клітин *R. radiobacter* і грампозитивних клітин *L. plantarum*.

Найбільше пригнічення збудників бактеріального раку (60-80%) спричиняли штами-антагоністи *L. plantarum* ОНУ 12, *L. plantarum* ОНУ 311 та *L. plantarum* ОНУ 355.

Для підтвердження даних, отриманих нами за допомогою фарбування змішаних біоплівки за Грамом, ми застосовували конкурентну адгезію з бактеріями штама *R. radiobacter* PYZ, які несуть плазмиду GFP. Бактерії цього штаму продукують зелений білок, що флуоресцує у синьому світлі. Застосовуючи флуоресцентний мікроскоп з синім фільтром ми змогли візуально розрізнити клітини фітопатогена, які світилися насиченим темно зеленим кольором, від прозорих безбарвних лактобацил, яких не було видно на салатівому фоні поля зору мікроскопу.

Таким методом також було виявлено, що краще пригнічення фітопатогена спричинили штами-антагоністи *L. plantarum* ОНУ 12, *L. plantarum* ОНУ 311 і *L. plantarum* ОНУ 355.

Отже, результати дослідження конкурентної адгезії з бактеріями штама *R. radiobacter* PYZ, які несуть плазмиду GFP, підтверджують данні, отримані за допомогою фарбування змішаних біоплівки за Грамом.

Загалом, результати вивчення конкурентної адгезії на склі вказують на те, що лактобацили здатні утворювати з фітопатогеном *R. radiobacter* змішані біоплівки. Це явище описано нами уперше. Ймовірно, саме у таких змішаних біоплівках бактерії-антагоністи здатні надалі пригнічувати збудника бактеріального раку.

Необхідними є подальші дослідження конкурентної адгезії на тест-рослинах.

ВИСНОВКИ

1. Для дослідження адгезивної активності лактобацил і ризобій за конкурентного прикріплення оптимальними умовами є культивування бактерій обох видів у середовищі MRS за температури 28°C.
2. Результати дослідження конкурентної адгезії з бактеріями штама *R. radiobacter* PYZ, які несуть плазмиду GFP, підтверджують данні, отримані за допомогою фарбування змішаних біоплівочок за Грамом.
3. Найбільше пригнічення збудників бактеріального раку (60-80%) спричиняли штами-антагоністи *L. plantarum* ОНУ 12, *L. plantarum* ОНУ 311 та *L. plantarum* ОНУ 355.
4. Уперше показано утворення змішаних біоплівочок *R. radiobacter* і *L. plantarum*.

Список літератури

1. *Алавердян Ж.Р., Акопян Л.Г., Чарян Л.М., Айрапетян С.Н.* Кислотообразующая способность молочнокислых бактерий // Микробиология. – 1996. – Т. 65 - №2. – С. 241 – 244.
2. *Афонин А.Н.* Агроэкологический атлас России и сопредельных стран: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения [Электронный ресурс] / Грин С.Л., Дзюбенко Н.И., Фролов А.Н. (ред.). – Санкт-Петербург: Всероссийский институт растениеводства, 2008. – Режим доступа до книги.: <http://www.agroatlas.ru/ru/>.
3. *Байдербек Р.* Опухоли растений. – М.: Колос, 1981. – С. 114.
4. *Беспоместных К.В.* Исследование биохимических и морфологических свойств штаммов бактерий рода *Lactobacillus* / К.В. Беспоместных, А.Г. Галстян, Е.В. Короткая // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 2. – С. 94-99.
5. *Блинкова Л.П.* Биотехнологические условия синтеза бактериоцинов / Блинкова Л.П., Машенцева Н.Г., Хорольский В.В., Горобец О.Б., Дорофеева Е.С. // Журн. Микробиология. – 2006. - №2. – С. 83-89.
6. *Блудова Н. Г.* Лактобактерії, пробіотики та імунна система кишечника / Н.Г. Блудова Н.Г. // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 4. – С. 115-120.
7. *Бондаренко В.М.* Классификация бактерий рода *Lactobacillus* // Материалы VIII съезда Всерос. общества эпидемиол., микробиол. и паразитологов. - М.,- 2002. - С. 140 - 144.
8. *Ботина С.Г.* Видовая идентификация и паспортизация молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования // Молочная промышленность. – 2008. – № 3. – С. 52-54.
9. *Ганбаров Х.Г., Джафаров М.М.* Антибактериальная активность рода *Lactobacillus* // Журн. микробиология – 2006. – С. 56 - 58.

10. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50-58.
11. Дмитриева Н.Н., Виникова Н.В., Матвеева Н.П. Бактериальный рак клеток растений // Инфекционные болезни культурных растений. – 1988. – Т. 35. – № 5. – С. 879-887.
12. Дьяков Ю.Т., Дементьева М.И., Семенкова И.Г. Общая и сельскохозяйственная фитопатология. – М.: Колос, 1984. – 495 с.
13. Коваленко Н.К., Немировская Л.Н. Бактериоциногенная и лизоцимсинтезирующая активность молочнокислых бактерий // Микробиол. журн. – 1999. – № 6. – С. 42-52.
14. Косуле Т., Комаи Л. Инфекционные болезни растений. – М.: Агропромиздат, 1985. – 185 с.
15. Курбанова И.В., Чумаков М.И. Формирование внеклеточных структур в конъюгирующих культурах агробактерий // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2000. – № 3. – С. 26 – 31.
16. Леманова Н.Б., Гатина Э.Ш. Бактериальные болезни винограда и плодовых культур. – Кишинев: Штиинца, 1991. – 156 с.
17. Лиманская Н.В., Жунько И.Д., Конуп Л.А., Милкус Б.Н. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики *A. vitis* // Виноградарство и виноделие. – 2003. – № 6. – С. 14 – 16.
18. Лиманська Н.В. Бактеріальний рак винограду (діагностика і поширення на півдні України) : автореф. дис. ... канд.біол.наук : 06.01.11. – К., 2006. – 20 с.
19. Любимова Н.В., Лактин В.М., Бинюков В.И., Шувалова Е.Н. Плазмиды // Прикладная биология и микробиология. – 1988. – Т. 24. – № 1. – С. 102 – 109.
20. Маркова Ю.А., Романенко А.С., Духанина А.В. Выделение бактерий семейства *Enterobacteriaceae* из растительных тканей // Микробиология. – 2005. – Т. 74, № 5. – С. 663 – 666.

21. Матвеева Т.В., Лутова Л.А., Нестер Ю. Опухолеобразование у растений // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 9. – С. 1188 – 1197.
22. Матышевская М.С. Экзополисахариды фитопатогенных бактерий и их роль в развитии бактериозов // Микробиол. журн. – 1984. – Т. 46, № 3. – С. 88 – 101.
23. Мерліч А.Г. Антагоністична активність бактерій *Lactobacillus plantarum*, виділених з рослинних джерел України та Франції, проти фітопатогенних бактерій / А.Г. Мерліч, Н.В. Ліманська // Мікробіологія і біотехнологія. – 2016. – № 4. – С. 71-85.
24. Милкус Б.Н., Лиманская Н.В., Жунько И.Д., Конуп Л.А., Бойко О.А. Выявление возбудителя бактериального рака в почве виноградника в разные сезоны вегетации // Виноградарство и виноделие: Сб. науч. тр. ИВиВ «Магарач». – Ялта: ИВиВ «Магарач», 2007. – С. 66 –68.
25. Милкус Б.Н., Конуп Л.О., Жунько И.Д., Ліманська Н.В. Тестування деяких сортів винограду на наявність збудника бактеріального раку і вірусів коротковузля та скручування листя // Микробиол. журн. – 2005. – Т. 67, № 1. – С. 41 – 48.
26. Милкус Б.Н., Конуп Л.О., Ліманська Н.В., Жунько И.Д. Діагностика вірусів і збудника бактеріального раку винограду за допомогою полімеразної ланцюгової реакції // Тези Х З'їзду Товариства мікробіологів України. – Одеса: “Астропринт”, 2004. – С. 286.
27. Романенко В. М., Перепнихатка В. И. Жгутики клеток *Agrobacterium tumefaciens* // Микробиол. журн. – 1984. – Т. 46, № 6. – С. 66 – 69.
28. Романенко В.М., Гвоздяк Р.И. Особенности ультраструктуры клеток *Agrobacterium tumefaciens* // Микробиол. журн. – 1986. – Т. 48, № 1. – С. 46 – 50.
29. Сарнацкая В.В. Регуляция метаболизма растительной клетки. – Киев: Наукова думка, 1973. – С.111-125.

30. Чернышева З.С., Назарчук В.С. Бактериальный рак как причина изреживания виноградных насаждений в Одесской области // Проблемы онкологии и тератологии растений. – Л.: Наука, 1975. – С. 155 – 157.
31. Belanger C., Canfield M., Moore L.W., Dion P. Genetic analysis of nonpathogenic *Agrobacterium tumefaciens* mutants arising in crown tumors // J. Bacteriol. – 1995. – 177, № 13. – P. 3752 – 3757.
32. Brisset M.N., Rodriguez-Palenzuela P., Burr T.J., Collmer A. Attachment, chemotaxis, and multiplication of *Agrobacterium tumefaciens* biovar 1 and biovar 3 on grapevine and pea // Appl. Environm. Microbiol. – 1991. – 57, № 11. – P. 3178 – 3182.
33. Detrait M., Hondt L.D., Andre M., Lonchay C., Holemans X., Maton J.P., Canon J.L. *Agrobacterium radiobacter* bacteremia in oncologic and geriatric patients: presentation of two cases and review of the literature // Intern J Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 12, № 6. – P. 7 – 10.
34. Eastwell K.C., Sholberg P.L., Saylor R.J. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agents of crown gall disease of grapevines // Crop protection. – 2006. – 25, № 11. – P. 1191-1200.
35. Escobar M.A. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease / M.A. Escobar, A.M. Dandekar // Trends Plant Sci. – 2003. – Vol. 8. – P. 380-386.
36. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. – 1995. – 61, № 8. – P. 2879 – 2884.
37. Hawes M.C. *Agrobacterium tumefaciens* mutants deficient in chemotaxis to root exudates / M.C. Hawes, L.Y. Smith, A.J. Howarth // Molecular and plant-microbe interactions. – 1988. – Vol. 1, № 4. – P. 182-186.
38. Judicial Comission of the International Committee on Systematic Bacteriology // Intern J Systematic Bacteriology. – 1995. – Vol. 45. –P. 195–196.

39. Kersters K., De Ley J. Genus III. *Agrobacterium* // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Baltimore: Williams and Wilkins Co, 1989. – V. 1. – P. 244 – 253.
40. Lapaglia C. Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus* / C. Lapaglia, P.L. Hartzell // Appl Environm Microbiol. – 1997. – Vol. 63, № 8. – P. 3158-3163.
41. Leveau J.H. Appetite of epiphyte: quantative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere / J.H. Leveau, S.E. Lindow // PNAS. – 2001. – Vol. 98, № 6. – P. 3446-3453.
42. Li J., Vaidya M., White C., Vainstein A., Citovsky V., Tzfira T. Involvement of KU80 in T-DNA integration in plant cells // Proc Natl Acad Sci USA. – 2005. – Vol. 102, № 52 – P. 19231 – 19236.
43. Limanska N. Prevention of grape crown gall // Microbiology and Biotechnology. – № 1(17). – 2012. – P. 6 – 22.
44. Limanska N.V. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter* / N.V. Limanska, N.V. Korotaeva, G.V. Yamborko, V.O. Ivanytsia // Microbiology and Biotechnology. – 2014. – № 1 (25). – P. 8 – 18.
45. Limanska N.V. Prevention of grape crown gall // Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 1, № 17. – P. 6 – 22.
46. Lindow S.E. Microbiology of the phyllosphere / S.E. Lindow, M.T. Brandl // Appl Environm Microbiol. – 2003. – Vol. 69, № 4. – P. 1875-1883.
47. Manulis S., Chalupowicz L., Dror O., Kleitman F. Molecular diagnostic procedures for production of pathogen-free propagation material // Pest Manag. Science. – 2002. – 58. – P. 1126 – 1131.
48. Moore L.W., Chilton W.S., Canfield M.L. Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors // App. Environ. Microbiol. – 1997. – Vol. 63. – P. 201 – 207.

49. *Petrunia I.V., Frolova O.Y., Komarova T.V., Kiselev S.L., Citovsky V., Dorokhov Y.L. Agrobacterium tumefaciens-induced bacteraemia does not lead to reporter gene expression in mouse organs // PLoS ONE. – 2008. – Vol. 3, № 6 [Электронный ресурс]: – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2396281/>*
50. *Pionnat S., Keller H., Richer D. et al. Ti plasmids from Agrobacterium characterize rootstock clones that initiated a spread of crown gall disease in Mediterranean countries // Appl. Environm. Microbiol. – 1999. – 65, № 9. – P. 4197 – 4206.*
51. *Sawada H., Ieki H., Oyaizu H., Matsumoto S. Proposal for rejecting of Agrobacterium tumefaciens and revised descriptions for the genus Agrobacterium and for Agrobacterium radiobacter and Agrobacterium rhizogenes // Int. J. Syst. Bacteriology. – 1993. – Vol. 43. – P. 694 – 702.*
52. *Wood D.W. The genome of the natural genetic engineer Agrobacterium tumefaciens C58 // Science. – 2001. – Vol. 294, № 5550. – P. 2266.*
53. *Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E., Kerr A., Sawada H. A revision of Rhizobium Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of Agrobacterium Conn 1942 and Allorhizobium undicola de Lajude et al. 1998 as new combinations: Rhizobium radiobacter, R. rhizogenes, R. rubi, R. undicola and R. vitis // Int. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2001. – Vol. 51. – P. 89 – 103.*