



УДК 579.25:632.35:634.8.03/.05

ВИЖИВАННЯ ЛАКТОБАЦИЛ І АГРОБАКТЕРІЙ, ІНТРОДУКОВАНИХ У ФІЛОСФЕРУ РОСЛИН

**Н. В. Коротаєва, Н. В. Ліманська, О. В. Басюл,
Ж. Ю. Сергєєва, В. О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
Шампанський провулок, 2, Одеса 65058, Україна
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua

Досліджено виживання бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU12 на поверхнях листя каланхое *Kalanchoe daigremontiana* Mill., зелених стебел винограду *Vitis vinifera* L. сорту Піно чорний, стебел рослин томату *Lycopersicon esculentum* Mill. сорту Балада, а також збереження життєздатності *L. plantarum* ONU12 і фітопатогенних бактерій *R. radiobacter* C58 за сумісного нанесення на неушкодженому листі каланхое. З'ясовано, що молочнокислі бактерії виживали на стеблах томатів і винограду до 30 днів, а на листі каланхое – понад 30 діб. Встановлено, що бактерії *R. radiobacter* C58 за будь-якого сумісного способу нанесення з лактобацилами зникали з поверхні рослин уже на третій день експерименту. Молочнокислі бактерії *L. plantarum* ONU 12 у разі нанесення одночасно з клітинами фітопатогена виділяли з поверхні рослин упродовж 8 діб, а за умов нанесення до чи після суспензії фітопатогена – протягом 14 діб. Доведено захисну дію молочнокислих бактерій у пригніченні бактеріального раку на тест-рослинах. Молочнокислі бактерії *L. plantarum* ONU 12 виявилися перспективними мікроорганізмами для біологічного захисту рослин від інфекції, спричиненої фітопатогенними *Rhizobium radiobacter* та *R. vitis*.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, *Rhizobium radiobacter*, інтродукція, рослини, виживання.

ВСТУП

Лактобацили становлять 0,01–1% від загальної мікробної популяції філосфери [10]. Оскільки молочнокислі бактерії ферментують окремі частини рослин, можна припустити, що ці мікроорганізми доволі стійкі до фітонцидів [18]. Молочнокислі бактерії можуть захищати рослини, пригнічуючи фітопатогени, зокрема *Xanthomonas campestris* [18], *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) [19], *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* [18], *Ralstonia solanacearum* [11], *Aspergillus niger* [6], та *Penicillium expansum* [6]. На основі попередніх досліджень встановлено антагоністичну дію лактобацил щодо *E. carotovora* [15] та *R. radiobacter* [8].

Молочнокислі бактерії *Lactobacillus plantarum* здатні до адгезії, населяють рослинні поверхні, а також слизові оболонки людини і тварин. Відомо, що адгезію у *L. plantarum* забезпечують манозоспецифічні лектини [3], а також інші адгезини білкової природи, S-шари [13], полісахариди, [16], тейхоеві кислоти [10]. Конкуренція між *L. plantarum* і патогенними бактеріями за рецептори клітин хазяїна зменшує адгезію останніх і таким чином захищає хазяїна від збудника інфекції [4].

Механізми прикріплення та виживання *L. plantarum* на рослинних поверхнях досі малодосліджені. Так, Reina et al. встановили, що кількість прикріплених клітин *L. plantarum* до поверхні плодів огірка значно зменшувалася після обробки гексаном, що видаляє шар воску [14]. Ці дослідження підтверджують участь гідрофобних взаємодій на поверхні рослин з клітинами лактобацил. Лактобацили прикріплялися до огірків вже упродовж 10 хв інкубації плодів у суспензії 10^8 КУО/мл, але найбільша їх кількість (10^5 КУО/мл) прикріплювалася до рослин за годину інкубації. Вивчення адгезії бактерій штаму *L. plantarum* ОНУ 87 до поверхні корінців крес-салату дало змогу встановити механізм адгезії бактерій, який залежав від білків S-шару [5].

Метою дослідження було встановити терміни виживання бактерій *L. plantarum* ОНУ12 на рослинах і вивчити їхній вплив на збудника бактеріального раку рослин *R. radiobacter* C58 за сумісної інтродукції на неушкоджене листя каланхое.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідження використовували виділений з винограду штам *L. plantarum* ОНУ 12, на основі якого у попередніх дослідженнях *in vivo* встановлено інгібувальну дію щодо збудника бактеріального раку. Конкурентне виживання вивчали на прикладі патогенного штаму *R. radiobacter* C58.

Для проведення експериментів молочнокислі бактерії вирощували у рідкому середовищі MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) [2] за 37°C , а ризобії – у рідкому середовищі Luria-Bertani [3] за 28°C упродовж 24 год.

Добові культури *L. plantarum* ОНУ 12, у концентрації 10^{10} КУО/мл, та *R. radiobacter* C58, у концентрації 10^8 КУО/мл, наносили з 0,01% розчином SDS за допомогою пульверизатора в об'ємі 1 мл на 25 см^2 поверхні рослини.

Для вивчення впливу *L. plantarum* ОНУ12 на збудника бактеріального раку рослин *R. radiobacter* C58 сумісне нанесення мікроорганізмів здійснювали у таких варіантах: перший варіант – на поверхню листя каланхое *Kalanchoe daigremontiana* Mill наносили лактобацили, а через 15 хв – ризобії; другий варіант – наносили ризобії, а через 15 хв – лактобацили; у третьому варіанті наносили одночасно ризобії та лактобацили; четвертий варіант був позитивним контролем, у якому на листя наносили ризобії та еквівалентний об'єм води, п'ятий варіант – негативний контроль із нанесенням на поверхню листка каланхое лактобацил і стерильної води.

Для вивчення здатності до виживання на поверхнях рослин бактерії *L. plantarum* ОНУ 12 наносили на поверхню листя каланхое *Kalanchoe daigremontiana* Mill., зелених стебел винограду *Vitis vinifera* L. сорту Піно чорний та на поверхню стебел рослин томату *Lycopersicon esculentum* Mill сорту Балада у концентрації 10^{10} КУО/мл в об'ємі 1 мл на 25 см^2 поверхні рослини.

Для виявлення кількості бактерій, що прикріпилися та вижили, здійснювали змиви з поверхні стерильними тампонами, змоченими у стерильному 0,9% розчині

NaCl через 15 хв після нанесення на 2-гу, 3-тю, 8-му, 14-ту і 30-ту добу. Для підрахунку патогенних ризобій суспензії з серійних розведень висівали на середовище LB, а лактобацил – на середовище MRS. Дослідження здійснювали на 9 рослинах у трьох повторях на кожній.

Результати дослідів обчислювали статистично за допомогою Microsoft Word Excel. Достовірність відмінностей отриманих результатів оцінювали на рівні значимості не менше 95 %.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення виживання інтродукованих лактобацил штаму *L. plantarum* ONU 12 на рослинних поверхнях дало змогу встановити, що через дві доби на листі каланхое і стеблах винограду кількість бактерій зменшилася на порядок, а на стеблах томату – майже на два порядки (рис. 1).

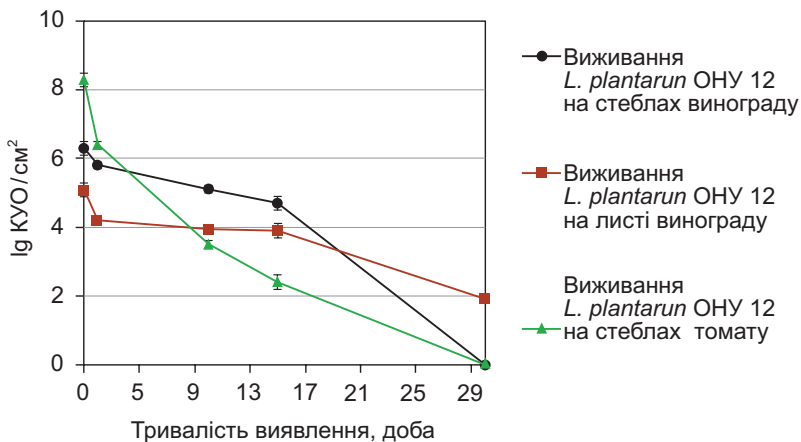


Рис. 1. Кількість клітин *L. plantarum* ONU 12, що виживали на рослинних поверхнях за їх інтродукції
 Fig. 1. Number of *L. plantarum* ONU 12 cells that survived on plants' surfaces

У подальшому кількість життєздатних інтродукованих молочнокислих бактерій на усіх рослинах мала стабільну тенденцію до поступового зменшення включно до 30-ї доби досліджень. На 30-ту добу дослідження бактерії *L. plantarum* ONU 12 виявляли на листі каланхое та не виявляли на поверхнях стебел томатів і винограду.

Це могло бути наслідком загибелі бактерій. Іншим поясненням є те, що лактобацили могли включитися у біоплівки на поверхні рослини. Деякими дослідженнями виявлено, що на листі рослин наявні біоплівки завтовшки 20 мкм і завдовжки до 1 мм, які містять екстраполімерний матрикс і представників різних видів бактерій [14]. Відомий потенціал лактобацил до утворення біоплівок дає змогу припустити, що ці бактерії можуть бути частиною таких біоплівок [14]. Так, у попередніх дослідженнях виявлено, що лактобацили штаму *L. plantarum* ONU 12 здатні утворювати біоплівку на поверхнях коренів крес-салату [5].

Загалом, з отриманих результатів видно, що штучно нанесені лактобацили виявляли у посівах зі змивів, отриманих з поверхонь стебел томатів і винограду до 30 діб, а з поверхонь листка каланхое – понад 30 діб, тобто весь цей проміжок часу

бактерії досліджених штамів або ж частина з них були наявними у філосфері, зокрема за межами сформованих біоплівки зі щільним матриксом, з яких бактерії не завжди можливо виділити звичайними методами змивів.

Особливий інтерес мало вивчення сумісного виживання лактобацил *L. plantarum* ОНУ 12 та фітопатогена *R. radiobacter* С58 за інтродукції на неушкоджене листя каланхое. На підставі того, що у попередніх дослідженнях було встановлено антагоністичну дію лактобацил щодо *E. carotovora* [15] та *R. radiobacter* [8].

Як видно з рис. 2, бактерії *R. radiobacter* С58, нанесені на листя каланхое, зберігали життєздатність упродовж 8 днів, а за сумісного нанесення з лактобацилами збудник бактеріального раку не виявляли на поверхні листя вже на третю добу експерименту (рис. 2).

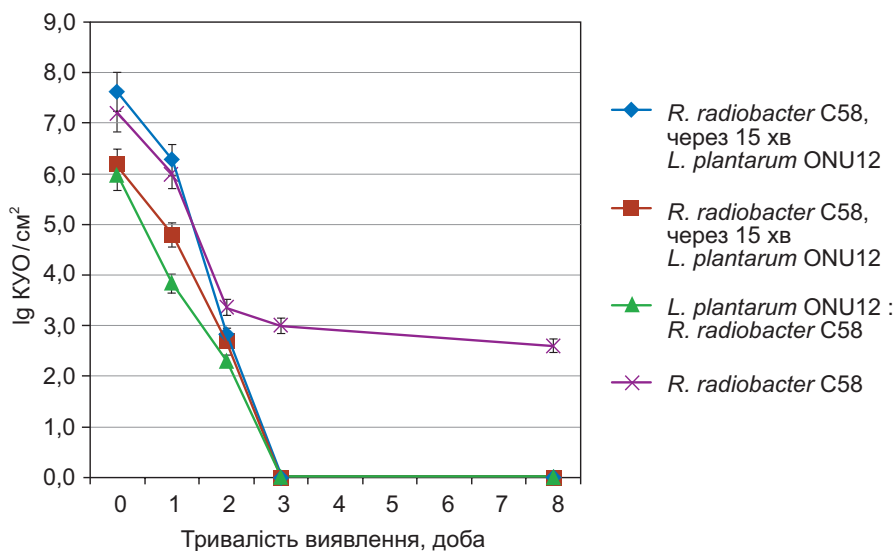


Рис. 2. Кількість клітин *R. radiobacter* С58, що виживали на поверхнях листя каланхое за сумісної інтродукції з *L. plantarum* ОНУ 12

Fig. 2. Number of *R. radiobacter* С58 cells that survived on kalanchoe leaf surfaces in the case of simultaneous inoculations with *L. plantarum* ОНУ 12

Бактерії *L. plantarum* ОНУ 12 у разі нанесення одночасно з клітинами фітопатогена виявляли у посівах змивів з поверхні рослин протягом 8 днів, а за умов нанесення до чи після суспензії фітопатогена – упродовж 14 днів (рис. 3).

Відомо, що у незворотній фазі адгезії ризобій до рослинних поверхонь беруть участь целюлозні фібрили, і в такому стані фітопатогени майже неможливо виділити методами змивів або вилучення фрагментів тканин [4]. Проте у нашому дослідженні у контролі без нанесення лактобацил клітини ризобій виділяли щонайменше упродовж 8 днів. Отже, відсутність росту фітопатогена у посівах на третій день експерименту за сумісного нанесення зі штамом-антагоністом є наслідком саме загибелі клітин *R. radiobacter* С58. Це свідчить про пригнічення патогенних ризобій лактобацилами безпосередньо на рослинній поверхні.

Патогенні ризобії спричиняють захворювання, прикріплюючись і проникаючи у раневі поверхні рослин [4]. Якщо рослинні поверхні встигли покритися раневими

тканинами після пошкодження, то вони вже є захищеними від інвазії фітопатогена. На основі отриманих даних встановлено, що лактобацили здатні виживати на рослинних поверхнях протягом 8 днів. Цей час може бути достатнім для загоєння раневих поверхонь і захисту рослин від фітопатогенних бактерій.

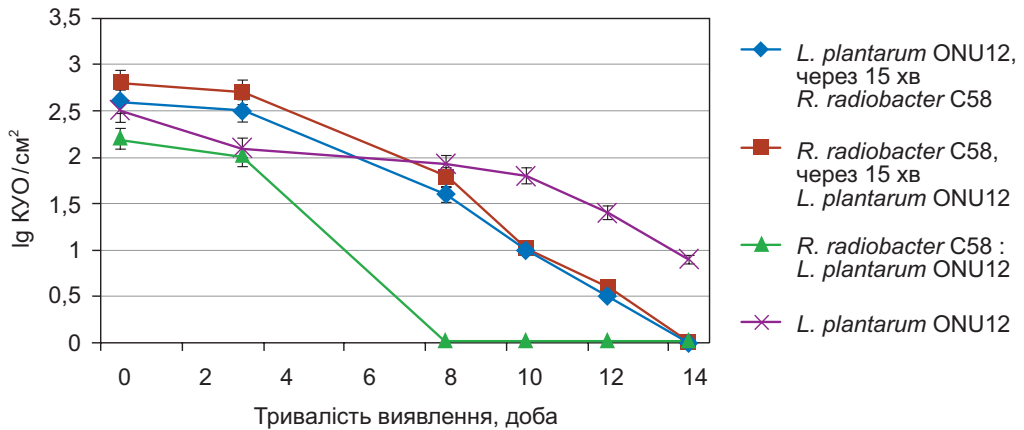


Рис. 3. Кількість клітин *L. plantarum* ONU 12, що виживали на поверхнях листя каланхое за сумісного штучного нанесення з *R. radiobacter* C58

Fig. 3. Number of *L. plantarum* ONU 12 cells that survived on kalanchoe leaf surfaces in the case of simultaneous inoculations with *R. radiobacter* C58

Виявлено захисну дію молочнокислих бактерій у пригніченні бактеріального раку на тест-рослинах. Молочнокислі бактерії *L. plantarum* ONU 12 виявилися перспективними мікроорганізмами для біологічного захисту рослин від інфекції, спричиненої фітопатогенними *Rhizobium radiobacter* та *R. vitis*.

ВИСНОВКИ

У результаті проведених досліджень встановлено:

1. Бактерії *R. radiobacter* C58 за будь-якого сумісного способу нанесення з лактобацилами на неушкоджене листя каланхое не виявляли у посівах змивів уже на третій день експерименту.
2. Молочнокислі бактерії *L. plantarum* ONU 12 у разі нанесення одночасно з клітинами фітопатогена виділяли з поверхні рослин упродовж 8 днів, а за умов нанесення до чи після суспензії фітопатогена – протягом 14 днів.
3. Молочнокислі бактерії виявляли у посівах зі змивів з поверхонь стебел томатів і винограду до 30 днів, а з поверхонь листя каланхое – понад 30 днів, і цей час може бути достатнім для загоєння ран поверхонь і захисту рослин від збудника бактеріального раку.

1. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, 1951; 62: 293–300.
2. de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol**, 1960; 23: 130–135.
3. de Vries M.C., Vaughan E.E., Kleerebezem M., de Vos W.M. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **Intern. Dairy J**, 2006; 16: 1018–1028.
4. Escobar M.A., Dandekar A.M. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. **Trends in Plant Science**, 2003; 8(8): 380–386.
5. Galkin M.B., Limanska N.V., Philipova T.O., Ivanytsia V.O. Biofilm formation by *Lactobacillus plantarum* bacteria on *Lepidium sativum* L. roots. **Microbiology and Biotechnology**, 2012; 3: 34–43. (In Ukrainian).
6. Korotaeva N.V., Kondratiuk T.V., Basiul O.V. et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 87 in mixture with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by *Rhizobium radiobacter* C58. **Microbiology and Biotechnology**, 2013; 22(2): 6–14.
7. Kos B., Suskovic J., Vukovic S. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **J. Appl. Microbiol**, 2003; 94: 981–987.
8. Kurylenko V.V., Ivanova E.P., Mikhailov V.V. Features of the adhesion of epiphytic bacteria on the leaves of the sea grass *Zostera marina* and non-biological surfaces. **Microbiology**, 2007; 76 (4): 502–506. (In Russian).
9. Lwin M., Ranamukhaarachchi S. L. Development of biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations. **Int. J. Agric. Biol**, 2006; 8(5): 657–660.
10. Mobili P., Gerbino E., Tymczyszyn E.E., Gomez-Zavaglia A. S-layers in lactobacilli: structural characteristics and putative role in surface and probiotic properties of whole bacteria. **Current Research, Technology and Educational Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. In: Mendez-Vilas A. (Ed.). FORMATEX, Argentine, 2010: 1224–1234.
11. Reina L.D., Fleming H.P., Breidt F.Jr. Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. **J. Food Protection**, 2002; 65(7): 1881–1887.
12. Sergeeva Zh.U., Krylova K.D., Limanska N.V. et al. Influence of bacteria *Lactobacillus plantarum* ONU-87 and autolysate of bacteria *Erwinia carotovora* ZM1 on soft rot disease infectious process. **Microbiology and Biotechnology**, 2012; 20(4): 18–28.
13. Tallon R., Arias S., Bressolier P., Urdaci M.C. Strain- and matrix-dependent adhesion of *Lactobacillus plantarum* is mediated by proteinaceous bacterial compounds. **J. Appl. Microbiol**, 2007; 102: 442–451.
14. Prokaryotes. Third Ed. A Handbook on the biology of bacteria: firmicutes, cyanobacteria. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E. et al. (Ed.). **Springer**, 2006: 336–338.
15. Trias R., Baneras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi. **International Microbiology**, 2008; 11: 231–236.
16. Young J.M., Kuykendall L.D., Martinez-Romero E. et al. 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; 51: 89–103.

THE SURVIVAL OF LACTOBACILLI AND AGROBACTERIA INTRODUCED INTO PLANT PHYLLOSPHERE

**N. V. Korotaieva, N. V. Limanska, O. V. Basiul,
Zh. Yu. Sergieieva, V. O. Ivanytsia**

*Odessa National I.I. Mechnikov University, 2, Shampansky Lane Odessa 65058, Ukraine
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua*

The survival of bacteria *Lactobacillus plantarum* ONU 12 on leaf surfaces of *Kalanchoe daigremontiana* Mill., green shoots of grape *Vitis vinifera* L. cultivar Pinot noire, stems of tomato plants *Lycopersicon esculentum* Mill. cultivar Ballada, and the joint survival of *L. plantarum* ONU 12 and the phytopathogenic bacteria *Rhizobium radiobacter* C58 in case of the simultaneous inoculation of kalanchoe leaf surfaces was investigated. It was shown that the lactic acid bacteria survived on tomato and grape stems for 30 days and on kalanchoe leaves more than 30 days. In any variant of the simultaneous inoculations with lactic acid bacteria, *R. radiobacter* C58 was not found on the surfaces of plants already after the third day of the experiment. In case of the simultaneous application with the phytopathogen, lactic acid bacteria *L. plantarum* ONU 12 survived on plant surfaces for 8 days whereas being inoculated before or after the phytopathogen – survived for 14 days. The protective activity of lactic acid bacteria in inhibiting the crown gall on test plants was shown. Lactic acid bacteria *L. plantarum* ONU 12 appeared to be the perspective microorganisms for biological protection against infection caused by the phytopathogen *Rhizobium radiobacter* and *R. vitis*.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, *Rhizobium radiobacter*, introduction, plants, survival.

ВЫЖИВАНИЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ И АГРОБАКТЕРИЙ, ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ В ФИЛОСФЕРУ РАСТЕНИЙ

**Н. В. Коротаева, Н. В. Лиманская, Е. В. Басюл,
Ж. Ю. Сергеева, В. А. Иваница**

*Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова
Шампанский переулок, 2, Одесса 65058, Украина
e-mail: korotaeva.n@onu.edu.ua*

Исследовано выживание бактерий *Lactobacillus plantarum* ОНУ12 на поверхностях листа каланхоэ *Kalanchoe daigremontiana* Mill., зеленых стеблей винограда *Vitis vinifera* L. сорта Пино черный, стеблей растений томата *Lycopersicon esculentum* Mill сорта Баллада, а также сохранение жизнеспособности *L. plantarum* ОНУ12 и фитопатогенных бактерий *R. radiobacter* C58 при совместном нанесении на неповрежденный лист каланхоэ. Показано, что молочнокислые бактерии выжили на стеблях томата и винограда до 30 дней, а на листе каланхоэ – более 30 дней. Установлено, что бактерии *R. radiobacter* C58 при любом совместном способе нанесения с лактобактериями исчезали с поверхностей растений уже на третий день эксперимента. Молочнокислые бактерии *L. plantarum* ОНУ 12 в случае одновременного нанесения с фитопатогеном выделяли с поверхностей растений

в течении 8 дней, а при условии нанесения до или после суспензии фитопатогена – в течение 14 дней. Показано защитное действие молочнокислых бактерий в угнетении бактериального рака на тест-растениях. Молочнокислые бактерии *L. plantarum* ONU 12 оказались перспективными микроорганизмами для биологической защиты от инфекции, вызванной фитопатогенными *Rhizobium radiobacter* и *R. vitis*.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, *Rhizobium radiobacter*, интродукция, растения, выживание.

Одержано: 26.02.2015