

**РЕФЕРАТ**  
**циклу наукових праць**

**«Бактеріальні біоплівки як форма взаємодії бактерій із навколишнім середовищем»**

**Актуальність теми.** Біоплівка – форма агрегації бактеріальних клітин, де нерухливі бактерії вбудовані у позаклітинний полімерний матрикс, який формує у комплексі із клітинами високоорганізовану структуру, що являє собою стабільну екологічну нішу. Таким чином, біоплівка є надклітинним утворенням із певною структурою та функціональною активністю. Через утворення біоплівок відбувається переважна більшість взаємодій бактерій із усім навколишнім середовищем, зокрема, реалізується інфекційний процес та колонізація харчових продуктів, персистування збудників у навколишньому середовищі, колонізація рослин та співіснування із ними у фітосфері.

Бактеріальні біоплівки все частіше порівнюють із «мікробними містами», в яких бактерії співіснують, функціонують, реалізують всі свої біологічні властивості. За останні 20 років розвитку мікробіології наші уявлення про біоплівки суттєво рушили уперед від типової біоплівки до різноманітних некласичних агрегацій на кшталт активного мулу, скупчень, колонії, флокул, матів, слизу, шлаки, зооглеї тощо. Дослідження загальних рис біоплівок, вивчення їхньої структури та екології утворення допоможе у кращому розумінні взаємодії бактерій із їхніми хазяїнами – тваринами, зокрема, при інфекційному процесі, та рослинами у фітосфері.

У роботі було докладно проаналізовано феноменологію утворення біоплівок як природніх агрегацій мікробних клітин, зокрема, досліджено механізми утворення біоплівки модельною фітосферною бактерією

*Pseudomonas fluorescens* SBW25. Особливу увагу було приділено феномену утворення градієнту кисню при первинній колонізації еконіші та ролі целюлози як основного будівельного матеріалу у конструюванні біоплівки. Було досліджено адаптивний характер утворення біоплівки бактерією *P. fluorescens* SBW25 та запропоновано еволюційну модель для шкільного викладання еволюції. Також, було проаналізовано здатність *P. fluorescens* SBW25 до почуття кворуму та можливу роль почуття кворуму в утворенні біоплівки SBW25 Wrinkly Spreader (WS). Досліджено роль полісахариди целюлози у створенні матриксу біоплівок таких бактерій як *P. fluorescens* SBW25, *Bordetella avium*, *Pseudomonas* spp, ізольованих із порченого м'яса.

Запропоновано нові підходи у дослідженні мікробно-рослинних взаємодій *in situ*. Класичні методи лабораторного культивування на штучних поживних середовищах з наступним мікроскопічним аналізом, фізіологічне інкубування та молекулярно – генетичний аналіз, що активно впроваджується останніми роками, не дають повної інформації про реальну просторову структуру таких взаємодій через те, що є досить руйнівними. Тому, було розроблено метод плівок обростання, який є модифікацією методу скелець обростання М. Г. Холодного. Метод було застосовано для вивчення архітектури біоплівок *in vivo* у контексті мікробно-рослинних взаємодій у ризосфері рослин ріпаку та у ендосфері рослин бамбуку.

Мікробно-рослинні взаємодії у фітосфері відбуваються не тільки на структурному, але й на гормональному рівні. Було встановлено, що бактеріальні сигнальні молекули класу N-ацилгомосерин лактонів мають множинний вплив на фізіологію рослин, покращують проростання рослин пшениці, структуру врожаю, підвищують продуктивність та адаптивність до стресів різної природи.

*Гіпотеза:* бактеріальна біоплівка – форма агрегацій бактеріальних клітин. Бактерії утворюють біоплівку за допомогою полімерів, які вони самі продукують, та, таким чином, утворюють стабільну екологічну нішу, через яку взаємодіють із оточуючим середовищем.

**Мета та завдання дослідження.** Головною метою роботи було дослідити феноменологію утворення біоплівок на прикладі грам-негативних бактерій *P. fluorescens* SBW25, *B. avium*, *Pseudomonas* spp, дослідити роль позаклітинних полісахаридів та градієнту кисню в утворенні біоплівки та в адаптації до навколишнього середовища, дослідити мікробно-рослинні взаємодії у фітосферах ріпаку *Brassica napus* L. та бамбуків родів *Phyllostachys* і *Fragresia*, зокрема, запропонованим методом плівок обростання та встановити роль бактеріальних сигнальних молекул у стимуляції росту рослин пшениці озимої *Triticum aestivum* L.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. проаналізувати феноменологію утворення біоплівок як природної агрегації бактеріальних клітин в екониші на прикладі бактерії *P. fluorescens* SBW25;
2. дослідити утворенні біоплівки мутантом-суперпродуцентом целюлози *P. fluorescens* SBW25 WS;
3. дослідити роль целюлози і кисневого градієнта в утворенні біоплівок *P. fluorescens* SBW25;
4. дослідити формування біоплівки та роль продукції целюлози у збудника бордетельозу *B. avium* та штамів харчових патогенів *Pseudomonas* spp., ізольованих з порченого м'яса;
5. модифікувати метод скелець обростання М. Г. Холодного для прямого неруйнівного дослідження рослинно-мікробних взаємовідносин *in situ*;

6. дослідити можливості застосування методу плівок обростання для структурно-функціонального аналізу рослинно-мікробних ценозів;

7. вивчити зв'язок між ризо-, ендо- та філосферами ріпаку *B. napus* L. - екологічними мікронішами для бактерій *P. fluorescens* SBW25 із застосуванням класичних підходів і методу плівок обростання;

8. дослідити склад ендофітів бамбуків родів *Phyllostachys* і *Fragresia*;

9. дослідити архітектуру ендофітних ценозів бамбуку *P. atrovaginata* L. за допомогою методу плівок обростання.

10. дослідити ефекти бактеріальних сигнальних молекул, зокрема, гексаноїл гомосерин лактону (ГГЛ) на ріст і розвиток рослин озимої пшениці *T.aestivum*.

Об'єктами досліджень були біоплівки грам-негативних бактерій, рослинно-мікробні відносини у фітосферах ріпаку *B. napus* L. і бамбуків родів *Phyllostachys* і *Fragresia*, та ефекти бактеріальних сигнальних молекул на *T.aestivum* L.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Проведено ґрунтовний аналіз різних типів агрегацій бактеріальних клітин та системно класифіковано природні та штучні типи агрегацій бактерій на прикладі бактерії *P.fluorescens* SBW25. Досліджено та описано феномен утворення біоплівки суперпродуцентом целюлози *P.fluorescens* SBW25 WS, який з'являється внаслідок адаптації культури *P.fluorescens* SBW25 до стабільних умов, в яких утворюється первинний градієнт кисню, роль якого у колонізації еконіші бактеріями була вперше встановлена. Зокрема, показано, що первинні колонізатори встановлюють градієнт кисню, який регулює екологічну диференціацію в подальшій колонізації ніші. Вперше досліджено екологічну роль целюлози як будівельного матеріалу біоплівки та її розповсюдженість серед грам-негативних бактерій, зокрема, бордетел та псевдомонад, що було

ізолювано з психрофільних еконіш. Шляхом інтегрованого біоінформатичного аналізу встановлено, що целюлоза вельми поширена серед грам-негативних бактерій, оперони синтезу целюлози типові та подібні між собою не дивлячись на дистанційну спорідненість.

Вперше завдяки методу плівок обростання встановлено, що *S. P. fluorescens* SBW25 проявляє високу конкурентну спроможність у колонізації ризоплану та близьких до ризосфери ріпаку ділянок. Вперше досліджено характер колонізації філосфери та ендосфери ріпаку штамом *P. fluorescens* SBW25 у різних умовах; встановлено, що бактерії *P. fluorescens* SBW25 здатні до колонізації ендосфери ріпаку. Встановлено, що клітини *P. fluorescens* SBW25 колонізують корінці проростків ріпаку, утворюючи волокнуподібні біоплівки вздовж епідермальних клітин. Колонізація проходить неоднорідно: щільність біоплівок *P. fluorescens* SBW25 у зоні насінини найвища й зменшується в напрямку кінчика проростку. Встановлено, що при 100% вологості повітря колонізація поверхні листка носить дисперсний характер, тоді як в умовах кімнатної вологості біоплівки утворюються переважно у зонах продихів та вздовж прожилок.

Вперше досліджено ендофітні мікроорганізми бамбуку родів *Phyllostachys* і *Fragresia*. Визначено 18 видів ендофітних бактерій бамбуків. Вперше як ендофіти бамбуків встановлені *Agrobacterium/Rhizobium* sp., *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *Mycobacterium palustre*, *M. lentiflavum*, *M. avium* complex, *M. arosiense*, *P. fuscovaginae*, *P. fluorescens*, *P. chondroitinus*, *Microbacterium laevaniformans*, *Achromobacter* sp. і *A. calcoaceticus*. Встановлено, що мікробіота ендосфери підземної частини бамбуків більш різноманітна, ніж мікробіота ендосфери надземної частини. У верхній частині стебла (молодих тканинах) знайдені бактерії в LNA-формі. Мікробіота ендосфери бамбуків, які культивувались в ґрунтовому субстраті,

більш різноманітна ніж в умовах *in vitro*. Визначено, що мікробіота надземної частини бамбуків представлена грампозитивними мікроорганізмами родин *Bacillaceae* і *Mycobacteriaceae* і некультурабельними мікроорганізмами, в той час як мікробіота підземної частини бамбуків містила грампозитивні й грамнегативні бактерії. У бамбуків, які росли в умовах *in vitro*, знайдені два ізоляти грамнегативних бактерій - *Achromobacter* sp. і *A. calcoaceticus*, які не було виявлено в інших зразках. Вперше, за допомогою методу плівок обростання, досліджено структуру ендofітних асоціацій рослин бамбуків роду *Phyllostachys*, виявлені зони внутрішньо тканинної локалізації біоплівки ендofітів.

Досліджено роль сигнальних молекул класу ацил гомосерин лактонів у формуванні біоплівки *P.fluorescens* SBW25 та їхню можливу роль у взаємодії *P.fluorescens* SBW25 із рослиною. Вперше досліджено вплив бактеріальної сигнальної молекули гексаноїл гомосерин лактону (ГГЛ) на рослини озимої пшениці *Triticum aestivum* L. української селекції: жаростійкий сорт Ятрань 60 і морозостійкий Володарка. У результаті проведених досліджень виявлено прямий (на рослини пшениці) і непрямий (на ризосферну мікрофлору) ефекти праймування. Зафіксовані збільшення продуктивного кушіння, кількості і маси зерен в одному колосі, загальної біомаси рослин, надземної вегетативної маси і маси зерна, а також маси тисячі зерен. Дослідження непрямого ефекту праймування в умовах реальної екосистеми виявило якісні і кількісні зміни в складі екологічних груп ризосферної мікрофлори.

**Практичне значення одержаних результатів.** Дослідження біоплівки поглиблює наші фундаментальні уявлення про бактерії і їхню екологію. Це дозволяє знаходити нові вирішення прикладних питань, зокрема, розробляти нові методи діагностики і боротьби із бактеріальними інфекціями. Метод плівок обростання забезпечує неруйнівне інтегроване вивчення рослинно–

мікробних взаємовідносин *in situ*. Особливість методу полягає у максимальному наближеності характеристик поверхні пластикової плівки, на якій формуються рослинно-мікробні контакти, до граничних поверхонь мікрокосма при інкубації плівок в умовах цього мікрокосму протягом певного періоду. Це дозволяє вивчати у неруйнівний спосіб структуру рослинно-мікробних взаємовідносин із одночасним використанням комплексу методик: цитохімії *in situ*, скануючої електронної мікроскопії, молекулярно-генетичного аналізу. За результатами досліджень отримано патент на винахід №84948 «Основа субстрату для відтворення екологічних систем» (zareєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи 10.12.2008). Встановлено унікальний фітостимулюючий ефект бактеріальної сигнальної молекули гексаноїл гомосерин лактону на рослини озимої пшениці, на її продуктивність та врожайність. За цими дослідженнями було отримано патент на винахід №120310 «Спосіб обробки насіння та вегетативної маси рослин пшениці озимої» (zareєстровано в Державному реєстрі патентів України на винаходи 11.11.2019).

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконувалась у відділі регуляторних механізмів клітини Інституту молекулярної біології та генетики НАН України в рамках науково-дослідної роботи за грантом Державного космічного агентства України «Стабільність ризосферних та ендofітних бактерій, асоційованих з рослиною *Arabidopsis thaliana* L. Neunh, під впливом факторів космічного польоту» (номер державної реєстрації 0108U004089), за грантом МОН на виконання науково-дослідної роботи «Вивчення корелятивних зв'язків між архітектурою мікроценозів та врожайністю аграрних рослин» (номер державної реєстрації 0109U005899), за грантом НАН України на науково-технічні роботи «Розробка діагностикуму для експрес-аналізу спектра стійкості до антибіотиків у

мікроорганізмів-чинників ранніх інфекційних ускладнень в ортопедії та травматології» (0112U004027), за грантом НАН України в рамках цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» на науково-дослідну роботу «Розробка біотехнології праймування пшениці на основі бактерійних сигнальних молекул класу ацилгомосеринлактонів для підвищення стійкості і врожайності» (0115U004178), за грантом НАТО «Наука заради миру та безпеки» SPS 984834 “Fighting maritime corrosion and biofouling with task-specific ionic compounds”, проект Erasmus+ 2017-1-BE02-KA107-034651 для індивідуальної мобільності у рамках співробітництва між морською академією Антверпену та Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України та за грантом на виконання науково-дослідної роботи «Вплив бактеріальних сигнальних молекул на врожайність та рослинні мікробні асоціації» (0119U103436).

## ВИСНОВКИ

1. Біоплівки – домінуюча форма бактеріальних угруповань, в якій бактерії перебувають протягом життєвого циклу.
2. Біоплівки складаються із окремих бактерій, що прикріплені до позаклітинного полімерного матриксу.
3. Целюлоза має важливе екологічне значення як компонент позаклітинного матриксу біоплівок багатьох грамнегативних бактерій, зокрема, у *P. fluorescens* SBW25, *B. avium* та штамів *Pseudomonas* spp., ізольованих із зіпсованого м'яса.
4. Бактерійна целюлоза є фактором патогенезу, адже сприяє виживанню та розповсюдженню збудника бордетельозу *B. avium* та інших патогенів, в тому числі харчових патогенів *Pseudomonas* spp., ізольованих із зіпсованого м'яса.



5. В стаціонарній культурі *P. fluorescens* SBW25 раптово з'являється суперпродуцент целюлози WS, який конструює сильну біоплівку, що домінує в стаціонарних умовах.
6. *P. fluorescens* SBW25 WS є зручною моделлю для ілюстрації еволюції у педагогічній практиці.
7. Метод плівок обрастання – зручний спосіб дослідження мікробно-рослинних взаїмовідносин *in situ*.
8. Рослини бамбуків родів *Phyllostachys* і *Fragresia* містять велику кількість бактерій-ендофітів, які утворюють біоплівки у фітосферах цих рослин.
9. Бактеріальні сигнальні молекули важливі в утворенні біоплівки при взаємодії із навколишнім середовищем.
10. Сигнальна молекула гексаноїл гомосерин лактон впливає на ріст, розвиток та продуктивність рослин озимої пшениці *T.aestivum* різних сортів української селекції.

**Публікації.** У цикл робіт включено 54 праці, серед яких 2 монографії, видані за кордоном, 19 статей, серед яких 9 статей у міжнародних виданнях, 31 теза доповідей у збірниках матеріалів з'їздів і конференцій, що вийшли друком із 2006 по 2018 роки та два патенти на винаходи. Загальна кількість посилань на статті – 182 за Google Scholar, 78 за Scopus та 69 за Web of Science.

к.б.н., с.н.с. відділу регуляторних механізмів  
клітини, докторант Інституту молекулярної біології  
і генетики НАН України

О.В. Мошинець