

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

**КОРОТАЄВА НАДІЯ ВОЛОДИМИРІВНА**



УДК 579.64:579.22: 579.25:579.663: 632.937

**РОЗРОБКА БІОПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ МОЛОЧНОКИСЛИХ  
БАКТЕРІЙ ПРОТИ ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ РОСЛИН**

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

ОДЕСА – 2020

Дисертацією є рукопис

Дисертаційну роботу виконано на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології, в Біотехнологічному науково-навчальному центрі Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор,  
член-кореспондент НАН України,  
**ІВАНИЦЯ Володимир Олексійович**,  
Одеський національний університет імені І.І. Мечникова  
проректор з наукової роботи

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**ВОРОНКОВА Ольга Сергіївна**  
Дніпровський національний університет  
імені Олеся Гончара  
кафедра загальної медицини з курсом фізичної терапії

доктор біологічних наук, професор  
**МІЛКУС Борис Наумович**  
Одеський державний аграрний університет  
кафедра захисту, генетики і селекції рослин

Захист відбудеться «15» жовтня 2020 року об 11 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 41.051.06 Одеського національного університету імені І.І. Мечникова за адресою: м. Одеса, Шампанський провулок, 2, ауд. 27.

Поштова адреса: 65058, м. Одеса, Шампанський провулок, 2, спеціалізована вчена рада К 41.051.06.

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Одеського національного університету імені І.І. Мечникова за адресою: 65082, м. Одеса, вул. Преображенська, 24, e-mail: library@onu.edu.ua

Автореферат розісланий «9» вересня 2020 року.

Вчений секретар  
Спеціалізованої вченої ради,  
кандидат технічних наук, доцент

Г.В. Ямборко.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Однією із стратегій захисту рослин, сучасною і безпечною для навколишнього середовища, є біологічний контроль, який передбачає використання мікроорганізмів із корисними властивостями (Sharma et al. 2013). Введення у ґрунт та на рослинні поверхні бактерій-антагоністів дозволяє ефективно пригнічувати ріст фітопатогенів, а у багатьох випадках - також покращувати розвиток рослини завдяки стимулюючим речовинам, що синтезують бактерії. Біологічний контроль стає все більш привабливим через накопичення у навколишньому середовищі токсичних хімічних речовин, які активно застосовуються у сільському господарстві (Bazzi et al. 1999; Asghari et al. 2020). Стратегія “органічного землеробства” сьогодні набуває значного поширення у багатьох країнах світу і спонукає дослідників до пошуку та розробки нових ефективних засобів біологічного контролю сільськогосподарських культур (Nguyen et al. 2011; Dhanya and Adeline 2014).

В Україні та багатьох країнах світу поширеною хворобою рослин, яка наносить значні збитки аграрному комплексу, є бактеріальний рак (De la Riva et al. 1998; Cubero et al. 1999; Burr et al. 1999; Szegedi et al. 2005; Kawaguchi et al. 2009; Мілкус та ін. 2012). Проти збудників бактеріального раку – *Rhizobium vitis* та *R. radiobacter* у біологічному контролі застосовуються бактерії-представники різноманітних родів – *R. radiobacter* (Sharma et al. 2017), *R. vitis* (Herlache et al. 2002; Bazzi et al. 1999; Kawaguchi et al. 2007), *Enterobacter agglomerans*, *Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas sp.* (Khmel et al. 1998; Chen et al. 2007; Dandurishvili et al. 2011; Li et al. 2014).

Широкий спектр мікроорганізмів, що пригнічуються молочнокислими бактеріями роду *Lactobacillus*, і те, що вони відносяться до групи з найвищим рівнем безпеки для людини та навколишнього середовища, робить зазначені антагоністи привабливими не тільки з точки зору захисту слизових оболонок людини і тварин, але й для захисту рослин (Roselló et al. 2013; Zamani-Zadeh et al. 2013; Ліманська та ін. 2014). Так, відомо про застосування молочнокислих бактерій проти *Pseudomonas syringae* (Visser et al. 1986), *Ralstonia solanacearum* (Lwin and Ranamukhaarachchi 2006), *Xanthomonas campestris* (Trias et al. 2008; Dalirsaber et al. 2012), *Colletotrichum gloeosporioides* (El-Mabrok et al. 2012), *Fusarium* (Hoda et al. 2011), *Aspergillus niger* та *Penicillium expansum* (Corsetti et al. 1998; Trias et al. 2008).

Виходячи з наведеного вище, перспективним постає створення біологічного препарату від збудників бактеріального раку рослин на основі бактерій роду *Lactobacillus*.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційну роботу виконано в межах науково-дослідних тем кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології та Біотехнологічного науково-навчального центру Одеського національного університету імені І.І. Мечникова: держбюджетної теми «Розробити наукові підходи та нові засоби біологічного контролю за збудниками бактеріальних інфекцій рослин з використанням молочнокислих бактерій» (державний реєстраційний номер роботи 0111U001382),

держбюджетної теми «Вивчити різноманітність та механізми взаємодії лактобацил з різних географічних зон з іншими організмами та розробити біопрепарат для стимуляції росту рослин та їх ферментування» (державний реєстраційний номер роботи 0217U004354), міжнародного проєкту в межах міждержавної угоди Україна-Франція «Дніпро» «Взаємодія молочнокислих бактерій з сільськогосподарськими рослинами» (державний реєстраційний номер роботи 0115U003991),.

**Мета і задачі дослідження.** Метою дослідження було вивчення антагоністичної активності молочнокислих бактерій та створення на основі активного штаму лактобацил біопрепарату проти збудника бактеріального раку рослин.

Згідно з метою вирішували наступні завдання:

1. Дослідити загальну чисельність та склад мікробіоти пагонів та тканин пухлин винограду.
2. Виділити збудників бактеріального раку з пухлин винограду, вивчити їх властивості, встановити спектри генів патогенності.
3. Визначити спектр генів бактерій штамів *L. plantarum*, що відповідають за синтез бактеріоцинів.
4. Провести скрінинг антагоністично активних штамів лактобактерій проти збудника бактеріального раку.
5. Методом математичного аналізу з використанням неповної регресійної моделі оптимізувати склад поживного середовища для активного штаму молочнокислих бактерій.
6. Провести випробування антагоністично активного штаму молочнокислих бактерій в експериментальних умовах *in vivo*.
7. Розробити схему отримання біопрепарату та рекомендації стосовно умов та термінів його зберігання.

*Об'єкт дослідження* – антагоністична активність молочнокислих бактерій *L. plantarum* проти фітопатогенних ризобій.

*Предмет дослідження* – створення на основі антагоністично активного штаму *L. plantarum* біопрепарату проти збудника бактеріального раку рослин.

*Методи дослідження* – мікробіологічні, генетичні, молекулярно-біологічні, біохімічні; комп'ютерна обробка даних.

### **Наукова новизна одержаних результатів**

Вперше визначено чисельність ендоефітної мікробіоти винограду, яка складала в пагонах від  $10^4$  до  $10^8$  КУО/г, в пухлинах винограду - від  $10^3$  до  $10^5$  КУО/г, а чисельність бактерій роду *Rhizobium* у пухлинах - від  $10^2$  КУО /г до  $10^4$  КУО /г.

Встановлено, що видовий склад мікробіоти пагонів винограду, визначений за допомогою методу газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот та автоматичної системи MIDI Sherlock, включав в себе представників *Rhizobium radiobacter*, *Xanthobacter agilis*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pantoea addlomerans*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Yersinia aldovae*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter globiformis*, *Kluyvera intemedia*, *Kluyvera cryocrescens*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Photobacterium luminescens*. ПЛР-

аналіз генів патогенності показав, що в пухлинах рослин переважають авірулентні бактерії *R. vitis* і *R. radiobacter*.

Встановлено, що ізольовані штами патогенних ризобій *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 та *R. vitis* ONU390, крім фрагменту гена *virC* Ті-плазмиди, містять у геномі послідовність гена *virD<sub>2</sub>*, яка кодує сайт-специфічну ендонуклеазу та послідовність гена *tmr(ipt)* – ізопентенилтрансферази, відповідальної за синтез цитокінінів, що спричиняє неконтрольовану проліферацію рослинних клітин та утворення корончатого галу. Вперше показано, що однією з ознак відмінностей видів є наявність у *R. radiobacter* та відсутність у *R. vitis* 10,11-метилен-октадеканової кислоти, а також значна відмінність в кількості ізомерів 9-гексадеканової кислоти та 10-гексадеканової кислоти: 7,5% у *R. vitis* та 1,6% у *R. radiobacter*.

У досліджених штамів молочнокислих бактерій виявлено від 2 до 6 генів плантарицинового оперону, кількість яких варіює в залежності від штаму. Встановлено, що антагоністично активні до ризобій бактерії штаму *L. plantarum* ONU87 містять 6 генів, задіяних у синтезі плантарицину та потенційно можуть синтезувати два типи бактеріоцинів – двопептидні плантарицини EF-типу і одиночні пептиди з бактеріоцинною активністю N-типу, а також домени АВС-транспортної системи, яка в свою чергу забезпечує процесинг та вивільнення готового бактеріоцину з клітини в середовище.

У дослідах *in vivo* на дисках моркви та на тест-рослинах каланхое *K. daigremontiana* вперше показано здатність лактобацил суттєво інгібувати процес розвитку бактеріального раку, обумовлений інфікуванням патогенними ризобіями.

Вперше встановлено, що одночасна обробка рослин винограду патогенними бактеріями ризобій і лактобацил призводить до покращення росту піддослідних рослин винограду.

### **Практичне значення одержаних результатів**

У результаті проведених досліджень розроблено біопрепарат на основі молочнокислих бактерій відібраного штаму *L. plantarum* ONU87 проти збудника бактеріального раку винограду. Розроблено технологічну схему отримання біопрепарату та рекомендації стосовно умов та термінів його зберігання.

Визначено оптимальні умови культивування бактерій штаму *L. plantarum* ONU87 та розроблено оптимальне поживне середовище, що дає можливість отримати концентрацію життєздатних клітин бактерій не менше  $1,16 \times 10^{10}$  КУО/мл.

Дослідження показали, що обробка бактеріями *L. plantarum* ONU87 чубуків винограду за штучного інфікування *R. radiobacter* C58 призводила до зменшення на 76,8% кількості заражених зразків. Застосування бактерій штаму *L. plantarum* ONU87 дозволить мінімізувати використання хімічних пестицидів і отримати екологічно чисті продукти рослинного походження.

За результатами роботи отримано 6 патентів на корисну модель, у тому числі патент України на корисну модель № 95966. 2015-01-12 "Спосіб захисту рослин від бактеріального раку з використанням суміші штамів *Lactobacillus plantarum* зі стимулюючою активністю" та патент України на корисну модель № 959662015-

01-12 "Спосіб захисту рослин від бактеріального раку з використанням суміші штамів *Lactobacillus plantarum* зі стимулюючою активністю".

Матеріали роботи використано при викладанні курсів «Прикладна мікробіологія», «Мікробні біотехнології», «Антибіотики» на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

**Особистий внесок здобувача.** Основний обсяг експериментальної роботи, комп'ютерну обробку даних та аналіз одержаних результатів досліджень здійснено безпосередньо здобувачем.

Планування роботи, формулювання основних положень і висновків дисертаційної роботи проведено під керівництвом д.б.н. Іваниці В.О. Дослідження мікробіоти в пагонах та пухлинах винограду, виділення штамів фітопатогенних ризобій, ПЛР-аналіз штамів *L. plantarum* для визначення генів, що беруть участь у синтезі плантаринів, вивчення антагоністичної активності штамів лактобацил проти збудників бактеріального раку *in vivo* та розробку технології отримання біопрепарату виконано спільно з доцентом к.б.н. Ліманською Н.В. (Одеський національний університет імені І.І. Мечникова), дослідження умов зберігання препарату – спільно з к.б.н. Басюл О.В. Математичний аналіз та оптимізацію складу поживного середовища для штаму *L. plantarum* ONU87 виконано у співпраці з к.б.н. Васильєвою Н.Ю. (Одеський національний університет імені І.І. Мечникова). Вищезазначені співробітники є співавторами відповідних публікацій.

**Апробація результатів дисертації.** Результати проведеної роботи доповідались на конференціях та з'їздах: XIII з'їзді Товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського (Ялта, 1–6 жовтня 2013), 5-th Polish - Ukrainian Weigl Conference on Microbiology (Chernivtsi, 23-25 May 2013), VI Міжнародній конференції молодих науковців "Біологія: від молекули до біосфери" (Харків, 22-25 листопада 2011), міжнародній конференції "Молодь у вирішенні екологічних та соціально-економічних проблем сьогодення" (15-20 жовтня 2012, Кам'янець-Подільський), IX міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 16-19 квітня 2013), міжнародній конференції "Современное состояние и перспективы инноваций биометода в сельском хозяйстве" (Одеса, 9-12 вересня 2013), міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів і молодих учених "Захист рослин у XXI столітті проблеми та перспективи розвитку" (Харків, 24-25 жовтня 2013), VIII Міжнародній конференції молодих учених "Біологія: від молекули до біосфери" (Харків, 3-6 грудня 2013), IX науковій конференції молодих вчених "Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві" (Чернігів, 26-27 листопада 2013), III Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених "Фундаментальні та прикладні дослідження в біології" (Донецьк, 24-27 лютого 2014), V Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих учених і студентів "Біологічні дослідження - 2014" (Житомир, 4-5 березня 2014).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 24 наукові праці, із них 8 статей у фахових виданнях, у тому числі 1 стаття у виданні, що входить до

наукоментричної бази даних Scopus, 10 тез доповідей та матеріалів конференцій та отримано 6 патентів України на корисну модель.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини, яка має 6 розділів, аналізу та узагальнення результатів досліджень, списку використаних літературних джерел з 204 найменувань. Дисертацію викладено на 147 сторінках машинописного тексту. Фактичний матеріал дисертації подано у вигляді 32 рисунків, 17 таблиць.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Цей розділ дисертації складається з трьох глав, у яких викладено огляд вітчизняної та зарубіжної літератури стосовно збудників, патогенезу та симптомів бактеріального раку рослин, методи діагностики та захисту рослин від захворювання, а також розглянуто низку питань щодо застосування молочнокислих бактерій у біоконтролі фітопатогенів. На основі аналізу літературних даних обґрунтовано актуальність проведення досліджень за темою дисертаційної роботи, визначено напрямки та основні завдання роботи.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В роботі використано фітопатогенний штам *R. radiobacter* C58, отриманий з пухлин вишні (*Prunus sp cv Montmorency*), який характеризується високою вірулентністю (Goodner B et al. 2001), штамми *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389, *R. vitis* ONU390, виділені нами з пухлин винограду, а також 7 штамів молочнокислих бактерій антагоністів: *L. plantarum* ONU311, *L. plantarum* ONU313, *L. plantarum* ONU12, *L. plantarum* ONU312, *L. plantarum* ONU87, *L. plantarum* ONU206, *L. plantarum* ONU991 з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології ОНУ імені І.І. Мечникова.

Для виділення і культивування бактерій з виноградної лози *Vitis vinifera* L. сортів Піно чорний, використовували середовища: PSA (Kawaguchi et al., 2007), YEM (Wang, 2006), PYGA (Cubero et al. 1999), YMA (Bishop et al. 1988), LB (Bertani 1951), TY (McClure et al. 1998), YPGA (Lelliot and Stead 1987), PA (Гвоздяк та ін. 1981), для виділення бактерій *R. vitis* з пухлин винограду – середовище Рой і Сасера (Roy and Sasser 1983).

Патогенні штами ризобій виявляли методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з відповідними праймерами до послідовності *virC* (Suzaki et al. 2004), PGF/PGR (Szegedi and Bottka 2002), *ipt* (Haas et al. 1995), *virC* (Kumagai and Fabritius 2008) та *virD<sub>2</sub>* (Haas et al. 1995). ДНК виділяли методом теплового лізису бактерій (Haas et al. 1995; Szegedi and Bottka 2002). Реакційну суміш та протокол проведення ПЛР використовували згідно з методикою Haas et al. (1995).

Біохімічну ідентифікацію виділених ризобій проводили за допомогою системи API® 20 NE (Biomerieux, Франція). Визначення жирнокислотних спектрів виконували методом газової хроматографії за стандартною методикою

(Sasser 1990) з використанням автоматичної системи ідентифікації мікроорганізмів MIDI Sherlock на базі газового хроматографа з полум'яно-іонізаційним детектором Agilent 7890 (Agilent Technologies, США). Для ідентифікації досліджуваних штамів використовували бібліотеку RSTBA6 6.2.

ПЛР-дослідження штамів *L. plantarum* на наявність генів, задіяних у синтезі плантарицинів проводили з дотриманням параметрів ПЛР як у Omar et al. (2008). Для цього ДНК лактобацил виділяли за допомогою набору "DNAeasy" згідно з інструкцією виробника ("Qiagen") та використовували ампліфікатор "BioRad" (США). Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу у 1% агарозному гелі, забарвленому бромідом етидію, у трисборатному буфері (ТВЕ).

Антагоністичну активність проти тест-штамів *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389, *R. vitis* ONU390, *R. radiobacter* C58 вивчали в дослідах *in vitro*, використовуючи модифікований лунково-дифузійний метод (Tagg and McGiven 1971; Егоров 1975; Тюрин та др. 1989; Busarcevic et al. 2008).

Вивчення *in vivo* інгібувального впливу лактобактерій на пухлиноутворення *R. radiobacter* C58 було проведено на тест-моделях: дисках моркви *Daucus carota* L та рослинах каланхое *Kalanchoe daigremontiana* Mill. Лактобактерії вирощували протягом 24 год у рідкому середовищі MRS (De Man et al. 1960) при 37 °C (10<sup>9</sup> КУО/мл). Для зараження використовували бактерії *R. radiobacter* C58, які вирощували продовж 24 год в рідкому середовищі LB (Bertani 1951) при 28 °C (10<sup>8</sup> КУО/мл). Інфікування щойно нарізаних базальних частин дисків здійснювали бактеріями по Ryder et al. 1985, рослин каланхое - методом ін'єкції бактерій у листок рослини (Limanska et al. 2015). Через 21 день на дисках моркви та через 45 днів на каланхое рахували кількість зразків з симптомами бактеріального раку, масу пухлинних тканин та характер некрозів.

Склад середовища для штаму *L. plantarum* ONU87 оптимізували за допомогою центрального композиційного ортогонального експерименту (Мухачев 2007). Критерієм оптимізації слугувала концентрація життєздатних клітин.

Для збереження життєздатності лактобацил за температури -20 °C у кріопробірці з препаратом вносили гліцерин у кількості 25% від загального об'єму (Головач та Гром 2004). Вихідну культуру лактобактерій готували шляхом внесення до рідкого оптимізованого поживного середовища OLP бактерій штаму *L. plantarum* ONU87 у кількості 5% і вирощування у ферментері BioFlo 310 New Brunswick Scientific (США) за 200-250 об/хв з перемішуванням за 37±2 °C упродовж 24 год.

Експериментальне випробування *in vivo* біопрепарату на розвиток інфекції бактеріального раку проводили на чубуках винограду сорту Піно чорний, які інфікували збудником бактеріального раку. Через 90 днів з оброблених чубуків виділяли ризобії, які ідентифікували як патогенні з застосуванням пари праймерів до послідовності гену *ipt*. Реакційну суміш та протокол проведення ПЛР використовували згідно з методикою Naas et al. (1995). Облік результатів ПЛР проводили за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі.



Всі експериментальні дані оброблено статистично з використання програмного забезпечення “Microsoft Excel”. У таблицях наведено середньоарифметичні значення та їхні стандартні похибки.

## СКЛАД ЕНДОФІТНОЇ МІКРОБІОТИ РОСЛИН ВИНОГРАДУ

Проведене вивчення ендоефітної мікробіоти судин винограду показало, що кількість її коливається в діапазоні від  $2,0 \times 10^4$  до  $2,1 \times 10^8$  КУО/г. Середня чисельність представників мікробіоти у пухлинах винограду рослин складала від  $2,3 \times 10^3$  до  $7,3 \times 10^5$  КУО/г, а чисельність бактерій роду *Rhizobium* у пухлинах коливалась від  $10^2$  КУО/г до  $10^4$  КУО/г, що в цілому відповідає даним літератури (Belanger et al. 1995). У рослин, де вже спостерігали здерев'яніння пухлинної тканини внаслідок старіння, а також підсихання через посушливу погоду, чисельність мікроорганізмів у внутрішніх тканинах пухлин була меншою. Таких рослин було більше на винограднику Миколаївської області, отже, ймовірно, саме тому у зразках, відібраних на даному винограднику, загальна чисельність мікробіоти була менша на 1-2 порядки від такої на винограднику Одеської області, де пухлини були більш молодими.

Встановлено, що видовий склад мікробіоти пагонів винограду складався з представників порядку *Rhizobiales*: *Rhizobium radiobacter*(20,7%), *Xanthobacter agilis*(6,9%), *Ochrobactrum anthropi* (24,1%) та інших видів гетеротрофних бактерій: *Pantoea addlomerans* (20,7%), *Pseudomonas putida*(10,3%), *Stenotrophomonas maltophilia* (10,3%), *Yersinia aldovae* (10,3%), *Arthrobacter globiformis* (6,9%), *Photobacterium luminescens* (6,9%), *Alcaligenes faecalis* (3,4%), *Kluyvera intemedia* (3,4%), *Kluyvera cryocrescens* (3,4%), *Xanthomonas axonopodis* (3,4%), *Erwinia chrysanthemi*(3,4%).

У 2016 році Faist et al. провели 16S rRNA секвенування мікроорганізмів з корончатих галів, лози та кореня винограду. Мікробіота зразків з пухлинами містила більшу різноманітність видів бактерій у всі сезони, ніж зразки без пухлин. Це може свідчити про те, що *R. vitis* можуть сприяти колонізації певними ендоефітами у місці зараження (Faist et al. 2016) завдяки синтезу опінів, ІОК та інших поживних речовин.

Внаслідок подальшого тестування методом ПЛР виявлено (рис.1), що серед 41 ізолята, виділеного із зразків, відібраних з виноградника Одеської області, патогенними виявилися 2 штами (*R. vitis* ONU388 та *R. vitis* ONU389), а серед 32 ізолятів, відібраних з рослин виноградника Миколаївської області – один штамп (*R. vitis* ONU390). Відомо, що переважна більшість ризобій у пухлинних тканинах є авірулентними (Belanger et al. 1995).



Рис. 1. Електрофореграма продуктів ПЛР з праймерами до послідовності гена *virC*: 1, 2, 4, 6-10 – ДНК непатогенних ізолятів; 3 – ДНК штаму *R. vitis* 390; 5 – ДНК контрольного штаму *R. radiobacter* C58; М – маркери молекулярної маси (908 п.о.; 659 п.о.; 521 п.о.; 403 п.о.; 281 п.о.; 257 п.о.; 226 п.о.; 100 п.о.; 90

Дослідження показали (рис 2.), що штами *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 та *R. vitis* ONU390, крім фрагменту гена *virC* Ті-плазмиди, несуть у геномі послідовності, що властиві патогенним штамам: послідовності гена *virD<sub>2</sub>*, яка кодує сайт-специфічну ендонуклеазу, що відповідає за утворення одноланцюгової Т-ДНК, та послідовність гена *tmr* – ізопентенилтрансферази, відповідальної за синтез цитокінінів у рослинних клітинах, що спричиняє неконтрольовану проліферацію рослинних клітин і утворенню корончатого галу (Tzfira et al. 2008).

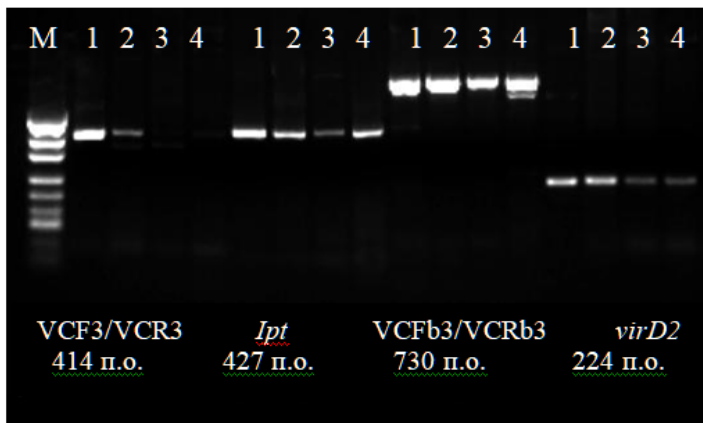


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ПЛР штамів *R. radiobacter* C58 (1), *R. vitis* ONU388 (2), *R. vitis* ONU389 (3) та *R. vitis* ONU390 (4) з праймерами до послідовностей генів *virC*, *virD<sub>2</sub>* та *ipt*. М - маркери молекулярної маси (501 п.о.; 404 п.о.; 331 п.о.; 242 п.о.; 190 п.о.; 147 п.о.; 111 п.о.; 110 п.о.; 67 п.о.).

За фізіолого-біохімічними ознаками, визначеними за допомогою АРІ-систем (BioMerieux, Франція), виділені штами було віднесено до виду *R. vitis*. Хроматографічний аналіз жирнокислотних профілів ризобій досліджуваних штамів виявив характерний високий вміст (71,46–76,62%) розгалужених ненасичених ізомерів 18:1 w7c/ 18:1 w6c. Також показано наявність гексадеканової кислоти від 8,50% до 8,96% в залежності від штаму, 2-гідрокси-гексадеканової кислоти - від 1,91% до 2,50% та ізомерів 12-нонадеканової кислоти та 13-нонадеканової кислоти від 0,23% до 0,61% від загальної суми площ піків (табл. 1). Високі індекси подібності досліджуваних штамів (*R. vitis* - 0,719-0,512) з показниками цих видів з бази даних бібліотеки RTSBA 6 версія 6.2 (MIDI SHERLOCK) підтвердили ідентифікацію їх до виду *R. vitis*.

**Жирнокислотний профіль патогенних ризобій**

| IUPAC формула         | Систематична назва жирної кислоти (IUPAC)             | <i>R. radiobacter</i> C58 | <i>R. vitis</i> ONU388 | <i>R. vitis</i> ONU389 | <i>R. vitis</i> ONU390 |
|-----------------------|---|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 18:1 w7c/<br>18:1 w6c | 11-октадекенова кислота<br>12-октадекенова кислота    | 76.62                     | 71.46                  | 72.12                  | 71.57                  |
| 16:0                  | Гексадеканова кислота                                 | 8.85                      | 8.50                   | 8.57                   | 8.54                   |
| 12:0 aldehyde         | додеканол   | 3.67                      | 5.49                   | 5.35                   | 5.38                   |
| 19:0 cyclo w8c        | 10,11-метилен-<br>октадеканова кислота                | 3.46                      | -                      | -                      | -                      |
| 16:0 3ОН              | 2- гідрокси-гексадеканова<br>кислота                  | 1.93                      | 2.50                   | 2.48                   | 2.50                   |
| 16:1 w7c/16:1<br>w6c  | 9- гексадекенова кислота<br>10- гексадекенова кислота | 1.63                      | 7.53                   | 7.56                   | 7.54                   |
| 18:0                  | Октадеканова кислота                                  | 1.48                      | 0.33                   | 0.37                   | 0.35                   |
| 19:1w7c/19:1<br>w6c   | 12- нонадекенова кислота<br>13- нонадекенова кислота  | 0.25                      | 0.61                   | 0.61                   | 0.60                   |

Вперше встановлено, що одною з ознак відмінностей видів є наявність у *R. radiobacter* та відсутність у *R. vitis* 10,11-метилен-октадеканової кислоти, а також значна відмінність в кількості ізомерів 9-гексадекенової кислоти та 10-гексадекенової кислоти: 7,5% у *R. vitis* та 1,6 % у *R. radiobacter*.

### **АНТАГОНІСТИЧНА АКТИВНІСТЬ ШТАМІВ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ПРОТИ ЗБУДНИКА БАКТЕРІАЛЬНОГО РАКУ**

Для біологічного контролю за збудником бактеріального раку вбачається доцільним використання молочнокислих бактерій. Ці бактерії представляють інтерес як основа для створення безпечних для здоров'я людини біологічних препаратів для захисту рослин від фітопатогенів. Особливо цікавим в цьому відношенні є бактерії виду *Lactobacillus plantarum*, які мають міжнародний статус "GRAS" ("Generally recognized as safe"), та визнані як абсолютно безпечні для здоров'я людини. Саме тому використання *L. plantarum* у захисті рослин можуть бути безпечною заміною хімічних препаратів проти фітопатогенів (Roselló et al. 2013; Zamani, Zadeh et al. 2013; Ліманська та ін. 2014). Одним із факторів, що вказує на високий антагоністичний потенціал штамів *L. plantarum*, є наявність генів, які відповідальні за синтез плантарицинів.

З метою пошуку штамів антагоністів проти бактеріального раку рослин ДНК бактерій досліджуваних штамів *L. plantarum* протестовано на наявність 11

генів, що відповідають за синтез бактеріоцинів (*plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnEF*, *plnI*, *plnJ*, *plnK*, *plnG*, *plnN*, *plnW*). Генетичні детермінанти синтезу бактеріоцинів інтенсивно вивчалися лише для декількох штамів *L. plantarum* C11, *L. plantarum* V90, *L. plantarum* NC8, *L. plantarum* WCFSI, *L. plantarum* J23, *L. plantarum* J5I, *L. plantarum* SLG10 (Diep et al. 1996; Anderssen et al. 1998; Torriani et al. 2000; Holo et al. 2001; Kleerebezem et al. 2003; Johnsen et al. 2004; Moreno et al. 2008; Diep et al. 2009; Navarro et al. 2008; Jabbar et al. 2020).

Нами показано, що бактерії досліджених штамів *L. plantarum* містять гени (таб.2), відповідальні за синтез плантарицинів (від 2 до 6 генів), що вказує на їх високий антагоністичний потенціал. Основним потенціальним продуцентом бактеріоцину було відібрано штам *L. plantarum* ONU87, бактерії якого містять 6 генів, задіяних у синтезі плантарицину, і це була найбільша кількість таких генів, знайдених у геномах досліджених штамів.

Таблиця 2

**Гени синтезу бактеріоцинів,  
виявлені у геномах досліджуваних штамів *L. plantarum***

| Штам                       | Джерело виділення     | Виявлені гени  |
|----------------------------|-----------------------|--|
| <i>L. plantarum</i> ONU87  | кисломолочні продукти | <i>plnD</i> , <i>plnEF</i> , <i>plnG</i> , <i>plnJ</i> , <i>plnI</i> , <i>plnN</i> |
| <i>L. plantarum</i> ONU12  | виноградне сусло      | <i>plnD</i> , <i>plnEF</i> , <i>plnI</i> , <i>plnJ</i> , <i>plnN</i>               |
| <i>L. plantarum</i> ONU311 | виноградне сусло      | <i>plnD</i> , <i>plnEF</i> , <i>plnI</i> , <i>plnJ</i>                             |
| <i>L. plantarum</i> ONU313 | виноградне сусло      | <i>plnEF</i> , <i>plnI</i>   |
| <i>L. plantarum</i> ONU312 | виноградне сусло      | <i>plnD</i> , <i>plnI</i> , <i>plnEF</i> , <i>plnJ</i>                             |
| <i>L. plantarum</i> ONU206 | кисломолочні продукти | <i>plnD</i> , <i>plnI</i> , <i>plnEF</i> , <i>plnJ</i>                             |
| <i>L. plantarum</i> ONU991 | кисломолочні продукти | <i>plnN</i> , <i>plnD</i> , <i>plnEF</i> , <i>plnI</i>                             |

Встановлено, що бактерії штамів *L. plantarum* ONU87 можуть синтезувати меншою мірою два типи бактеріоцинів (рис.3) – дипептидні плантарицини EF-типу і одиночні пептиди з бактеріоцинною активністю N-типу (Diep et al. 2009). Наприклад, інший штам *L. plantarum* C11 також виробляє не тільки пептидний плантарицин А (Diep et al. 1994; Hauge et al. 1998), а ще два додаткових плантарицини дипептидного типу EF та JK (Anderssen et al. 1998).

Також штам *L. plantarum* ONU87 має ген *plnG*, що відповідає за синтез доменів АВС-транспортної системи, яка в свою чергу забезпечує процесинг та вивільнення готового бактеріоцину з клітини в середовище (Diep et al. 2009). В досліді з нейтралізацією рН встановлено, що антагоністична активність *L.*

*plantarum* ONU87 проти ризобій обумовлена не лише дією органічних кислот, а також продукцією ним бактеріоцину, активного проти грамнегативних ризобій.

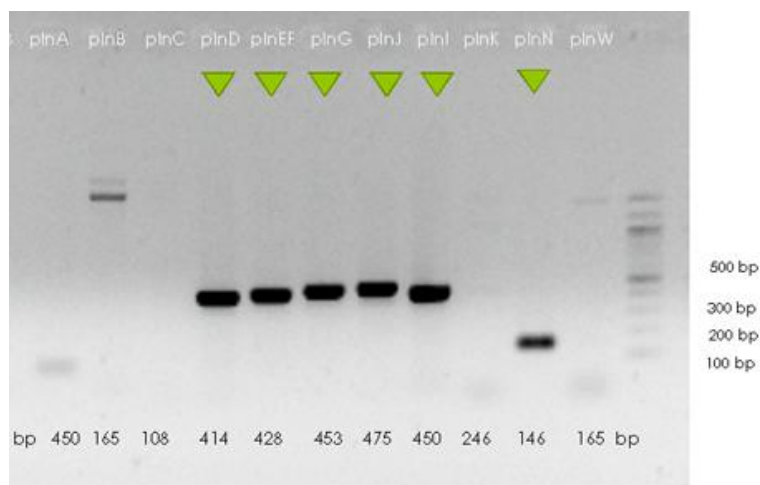


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ПЛР *L. plantarum* ONU87: написи вгорі – назви праймерних ділянок, написи внизу – необхідні розміри ампліконів, зелені стрілки вказують на наявність генів, стовпчик справа – розміри маркерів молекулярної ваги у парах основ

Дослідження *in vivo* на дисках моркви (рис.4) показало, що серед семи протестованих штамів *L. plantarum* чітку інгібуючу активність до утворення пухлин показали шість штамів молочнокислих бактерій. Найбільшу активність продемонстрували *L. plantarum* ONU312, *L. plantarum* ONU12 і *L. plantarum* ONU87. Проведені дослідження вказують на те, що здатність зменшувати рівень розвитку захворювання на бактеріальний рак є штам-специфічною характеристикою лактобацил.

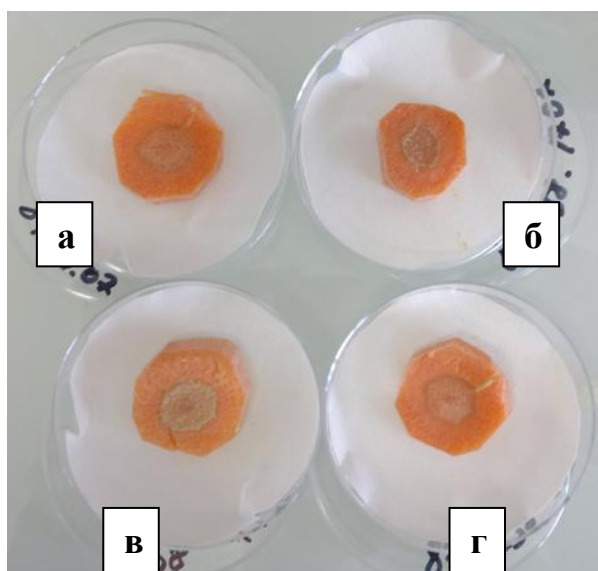


Рис. 4. Диски моркви, а - інокульовані *L. plantarum* ONU87 (негативний контроль); в - *R. radiobacter* C58 (позитивний контроль); б, г – оброблені сумішшю *R. radiobacter* C58 з *L. plantarum* ONU87 (б – диск з пухлинами, г – здорові рослинні тканини моркви).

Аналогічні результати отримано також у дослідах на тест-рослинах каланхое *K. daigremontiana*. Бактерії штамів *L. plantarum* ONU87, *L. plantarum* ONU206, *L. plantarum* ONU991 зменшували кількість зразків із симптомами бактеріального раку на 75,0-95,2%. Встановлено, що у випадку штаму *L. plantarum* ONU87 проти збудника бактеріального раку *in vivo* можуть бути застосовані добові культури, як з низьким так і нейтральним рН.



Рис. 5. Пухлини, що утворилися в разі обробки тільки бактеріями *R. radiobacter* C58 та відсутність пухлин внаслідок обробки *L. plantarum* ONU87 та *R. radiobacter*

*L. plantarum* ONU87  
*R. radiobacter* C58

Контроль  
*R. radiobacter* C58

За результатами наших досліджень для створення біопрепарату було відібрано *L. plantarum* ONU87, що містить найбільшу кількість генів, задіяних у синтезі плантарицину та високу антимікробну активність проти збудника бактеріального раку. Бактерії *L. plantarum* ONU87 можуть синтезувати меншою мірою два типи бактеріоцинів – дипептидні плантарицини EF-типу і одиночні пептиди з бактеріоцинною активністю N-типу, а також ген *plnG*, що відповідає за синтез доменів ABC-транспортної системи.

## РОЗРОБКА БІОПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ШТАМУ *L. PLANTARUM* ONU87

З метою створення біопрепарату на основі молочнокислих бактерій проти збудника бактеріального раку за результатами проведеного центрального композиційного ортогонального експерименту розроблено оптимальне поживне середовище, що сприяє росту лактобактерій та підвищенню їх антимікробної активності по відношенню до збудників бактеріального раку.

За розрахунковими показниками оптимізоване поживне середовище (OLP) для збільшення загальної кількості клітин *L. plantarum* ONU87 має наступний склад (г/л): глюкоза - 22,5, дріжджовий екстракт - 4,5, пептон - 8,5, натрій оцтовокислий - 25,0, гідроортофосфат калію - 6,0, цитрат амонію 3-х заміщений - 2,0, амоній лимоннокислий - 2,2; сульфат магнію - 0,6; сульфат марганцю - 0,2.

Показано, що при культивуванні *L. plantarum* ONU87 на оптимізованому середовищі OLP концентрація бактерій досягала значення  $3,51 \pm 0,10 \times 10^{10}$  КОУ/мл у порівнянні з  $5,7 \pm 0,4 \times 10^9$  КОУ/мл на MRS. При цьому питома швидкість росту складала  $0,34 \text{ год}^{-1}$ .

Розроблено рекомендації стосовно умов та термінів зберігання біопрепарату. За кімнатної температури (+22 °C) біопрепарат небажано зберігати більше двох діб, за температури +4 °C – до двох тижнів. За температури -22 °C бактерії зберігають життєздатність впродовж 30 діб.

Результати проведених досліджень було використано для розробки схеми отримання біопрепарату на основі штаму *L. plantarum* ONU87 проти збудника бактеріального раку рослин (рис. 6).

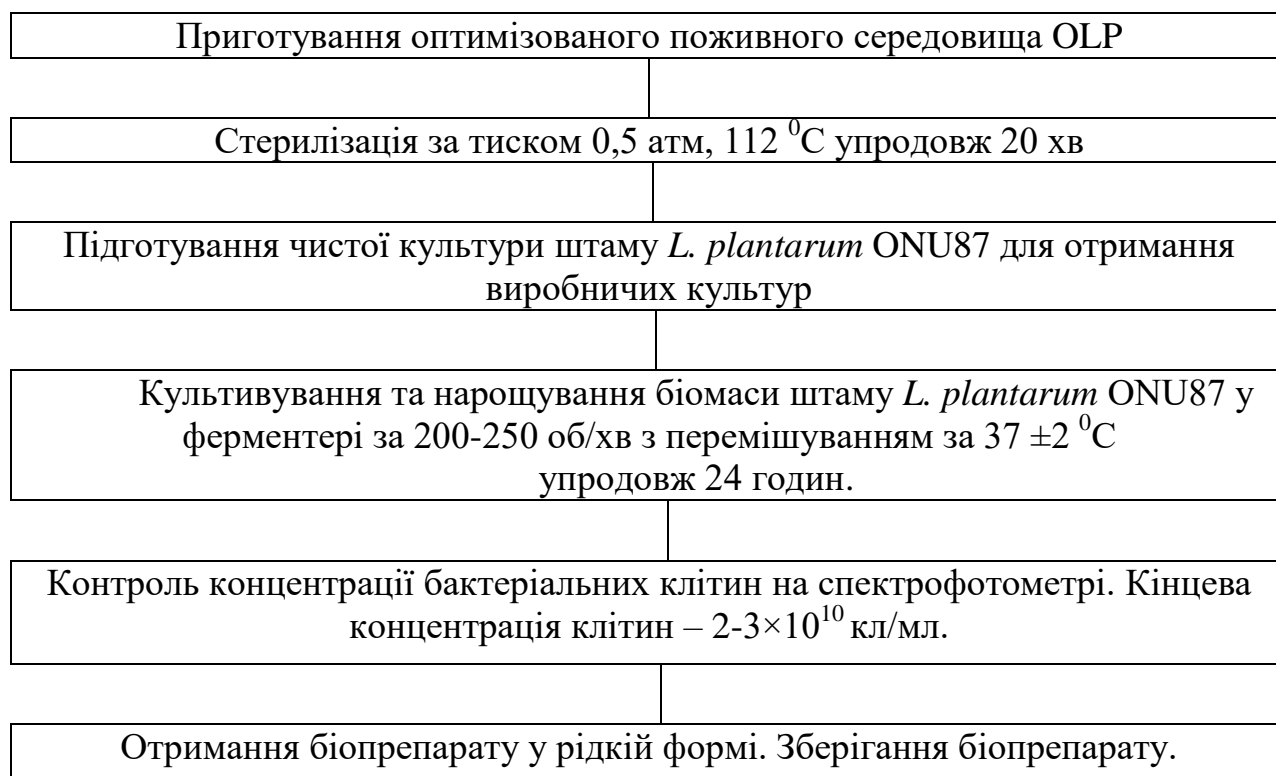


Рис. 6. Схема виготовлення біопрепарату на основі *L. plantarum* ONU87

## ВПЛИВ БІОПРЕПАРАТУ НА РОСЛИНИ ВИНОГРАДУ ЗА ІНФІКУВАННЯ ПАТОГЕННИМИ РИЗОБІЯМИ

Експериментальне випробування *in vivo* біопрепарату на основі штаму *L. plantarum* ONU87 на розвиток інфекції бактеріального раку проводили на рослинах винограду.

Встановлено, що стан чубуків винограду, які підлягали вкоріненню після обробки лактобактеріями, різнився в залежності від варіанту досліду, та його показники вказували на позитивний ефект молочнокислих бактерій у пригніченні розвитку інфекції бактеріального раку рослин (рис. 7).

Загальне підвищення життєздатності чубуків, оброблених молочнокислими бактеріями, у порівнянні із зараженими фітопатогенними бактеріями, можна розділити на окремі морфологічні показники рослин винограду, як то: кількість життєздатних пагонів, кількість бруньок, що розпустилися, кількість пагонів на чубук, приріст пагонів на чубук, середня довжина пагона, площа листків на чубук і середня площа листка.

Рослинний матеріал з насаджень Одеської області характеризувався доброю приживлюваністю, оскільки відсоток життєздатних чубуків, які були вимочені у воді, на момент обліку результатів становив 100% (рис. 7).

Чубуки, вимочені у суспензії лактобацил, також характеризувалися 100% виживанням. Вимочування у суспензії штаму *R. radiobacter* C58 призвело до значного зменшення кількості чубуків, що прижились – 76,2% (рис. 7). Це свідчить про негативний вплив метаболітів фітопатогенних ризобій на життєздатність чубуків винограду.

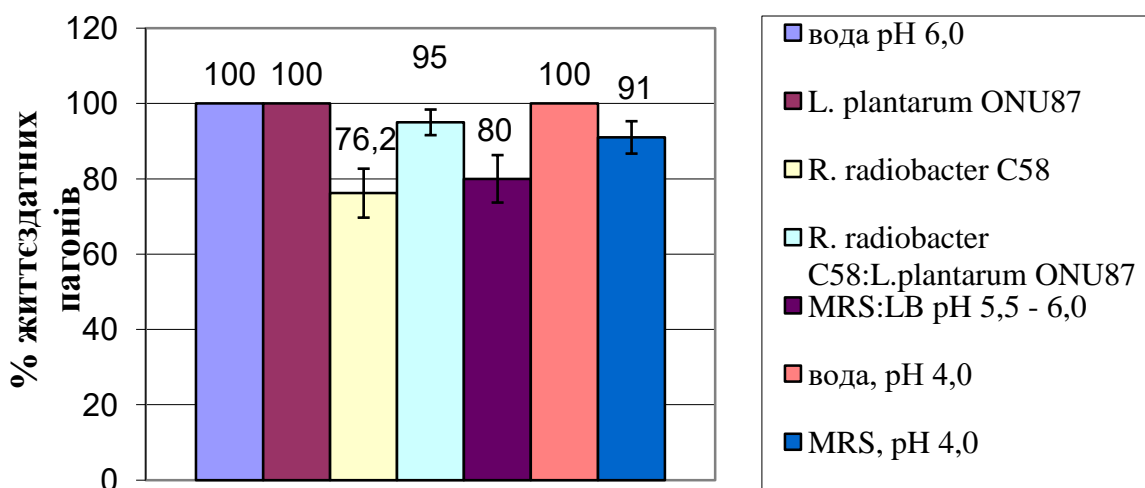


Рис. 7. Вплив на життєздатність пагонів сорту Піно чорний різних дослідних обробок лактобацилами та ризобіями

Як видно з рисунка 7, одночасне застосування патогенних ризобій та лактобацил призвело до значного покращання показника життєздатності оброблених чубуків – кількість чубуків, що вижили, складала 95%.

Через три місяці з оброблених чубуків проводили виділення збудників бактеріального раку. Методом ПЛР встановлено (таб.3), що обробка біопрепаратом за штучного інфікування винограду *R. radiobacter* C58 призводила до значного зменшення кількості чубуків, в які потрапив збудник бактеріального раку (на 76,8%).

Таблиця 3

#### Інфікованість чубуків винограду ризобіями (%)

| Варіант досліджу   | Кількість інфікованих чубуків, % |
|--|----------------------------------|
| Суміш “ <i>R. radiobacter</i> C58: <i>L. plantarum</i> ONU87 ” | 23,2 %                           |
| Позитивний контроль – <i>R. radiobacter</i> C58                | 100,0 %                          |
| Негативний контроль – вода, <i>L. plantarum</i> ONU87          | 0                                |

Отже, проведені дослідження показали, що у поєднанні з кращим станом піддослідних рослин винограду з певних ознак (кількість бруньок, що розпустилися, середня довжина зелених пагонів, середня площа листків) і відсутністю видимого негативного впливу привнесеної мікробіоти, обробка біопрепаратом на основі лактобацил як метод для захисту рослин винограду від бактеріального раку дає позитивний ефект.



## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі теоретично і експериментально обґрунтовано створення біопрепарату на основі штаму *L. plantarum* ONU87 і доведено його ефективність проти збудника бактеріального раку рослин винограду.

1. Визначено, що загальна чисельність мікробіоти в пагонах винограду складала від  $10^4$  до  $10^8$  КУО/г, а кількість бактерій роду *Rhizobium* у пухлинних тканинах коливалась від в межах  $10^2$  -  $10^4$  КУО/г в залежності від дослідженої рослини.

2. Встановлено, що видовий склад мікробіоти пагонів винограду включав представників: *Rhizobium radiobacter*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pantoea addlomerans*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthobacter agilis*, *Yersinia aldovae*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter globiformis*, *Kluyvera intemedia*, *Kluyvera cryocrescens*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Photorhabdus luminescens*.

3. Показано, що бактерії штамів *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 та *R. vitis* ONU390, крім фрагменту гена *virC* Ті-плазмід, несуть у геномі послідовності патогенних ризобій ген *virD<sub>2</sub>*, який кодує сайт-специфічну ендонуклеазу, що відповідає за утворення одноланцюгової Т-ДНК, та гена *ipt (tmr)* – ізопентенилтрансферази, відповідальної за синтез цитокінінів у рослинних клітинах.

4. Вперше показано, що відмінністю видів ризобій є наявність у *R. radiobacter* та відсутність у *R. vitis* 10,11-метилен-октадеканової кислоти та суттєва різниця в кількості ізомерів 9-гексадекенової кислоти та 10-гексадекенової кислоти (7,5% у *R. vitis* та 1,6% у *R. radiobacter*).

5. За фізіолого-біохімічними ознаками та спектром жирних кислот ізольовані патогенні штами ризобій ідентифіковано до виду *R. vitis*, що підтверджується високими індексами подібності (0,731-0,512) з показниками цих видів з бази даних бібліотеки RTSBA 6 версія 6.2 (MIDI SHERLOCK).

6. Показано, що усі досліджувані на наявність генів синтезу плантарицинів (*plnA*, *plnB*, *plnC*, *plnD*, *plnEF*, *plnI*, *plnJ*, *plnK*, *plnG*, *plnN*, *plnW*) бактерії штамів *L. plantarum*, містять від 2 до 6 генів, а найбільшу кількість генів (6) - бактерії штаму *L. plantarum* ONU87, які можуть синтезувати щонайменше два типи бактеріоцинів – двопептидні плантарицини EF-типу і одиночні пептиди з бактеріоцинною активністю N-типу та домени ABC-транспортної системи, що забезпечують процесинг та вивільнення готового бактеріоцину.

7. Встановлено, що у більшості випадків ріст ризобій пригнічуються внаслідок низького рН, обумовленого продукцією досліджуваними лактобацилами органічних кислот, за виключенням бактерій *L. plantarum* ONU87, антагоністична активність якого також обумовлена наявністю виявлених генів, що відповідають за синтез бактеріоцину.

8. Показано, що бактерії досліджуваних штамів *L. plantarum* уповільнювали активність розвитку бактеріального раку *in vitro* на моделі дисків моркви, а в дослідах на рослинах *K. daigremontiana* незалежно від вихідного значення рН

обробка добовою культурою зменшувала кількість зразків із симптомами бактеріального раку в залежності від штаму лактобацил до 5-25%.

9. Обробка біопрепаратом за експериментального інфікування винограду *R. radiobacter* C58 призводить до значного зменшення кількості чубуків, у які потрапив збудник бактеріального раку (на 76,8%), та покращує стан піддослідних рослин винограду за показниками кількості бруньок, що розпустилися, середньою довжиною зелених пагонів, середньою площею листків.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України

(\* – особистий внесок здобувача)

1. Limanska N, Ivanytsia T, Choiset Y, Korotaeva N, Sergeeva Zh, Chobert J-M, Ivanytsia V, Haertle T. Effect of *Enterococcus durans* bacteriocin on bacterial wilt agent. Мікробіологія і біотехнологія. 2012; №2(18);30-40. (\**проведено дослідження впливу бактеріоцину Enterococcus durans на бактеріальний вілт на тест-рослинах*).

2. Васильєва НЮ, Коротаєва НВ, Панченко ММ, Іваниця ВО Математичний аналіз та оптимізація складу поживного середовища для штаму *Lactobacillus plantarum* ONU87// Мікробіологія і біотехнологія. 2013; 2(22):52-65. (\**проведено експериментальну оптимізацію середовища та перевірку антагоністичної активності штаму L. plantarum ONU87*).

3. Korotaeva NV, Kondratiuk TV, Basiul OV, Krylova KD, Yamborko GV, Ivanytsia VO, Limanska NV. Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU87 in mixture with autolysate of erwinias on formation of tumors caused by *Rhizobium radiobacter* C58. Мікробіологія і біотехнологія. 2013; №2(22): 6-14. (\**досліджено вплив штаму L. plantarum ONU87 та автолізу ервіній на пухлиноутворення на тест-рослинах, проведено аналіз даних та підготовлено статтю до друку*).

4. Merlich AG, Ivanytsia VO, Korotaeva NV, Zlatogurska MA, Vasylieva NYu, Babenko DO, Limanska NV. *Lactobacillus plantarum* from berries of grape cultivated in the south of Ukraine// Мікробіологія і біотехнологія. 2013; №3(23): С. 31-39. (\**проведено виділення штамів L. plantarum*).

5. Limanska NV, Korotaeva NV, Yamborko GV, Ivanytsia VO. Effect of *Lactobacillus plantarum* on tumor formation caused by *Rhizobium radiobacter*. Мікробіологія і біотехнологія. 2014; №1(25): 8-18. (\**досліджено вплив штаму L. plantarum ONU87 на пухлиноутворення збудником бактеріального раку на тест-рослинах, проведено аналіз даних*).

6. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Merlich A, Franco BDGM, Chobert JM, Ivanytsia V and Haertle T. Study of the potential application of lactic acid bacteria in the control of infection caused by *Argobacterium tumefaciens*. J Plant Pathol Microb. 2015; №6(8) (\**досліджено вплив штамів молочнокислих бактерій на збудник бактеріального раку рослин in vitro та in vivo*).

7. Коротаєва НВ, Ліманська НВ. Виявлення патогенних бактерій *Rhizobium vitis* на виноградниках півдня України . Мікробіологічний журнал.2015; 77(2): 28–32. (\**проведено виділення штамів R. vitis, ПЛР-аналіз штамів патогенних ризобій, проведено аналіз даних та підготовлено статтю до друку*).

8. Коротаєва НВ, Ліманська НВ, Басюл ОВ, Сергєєва ЖЮ, Іваниця ВО. Вживання лактобацил і агробактерій, інтродукованих у філосферу рослин. Біологічні студії. 2015; 9(2): 23-30. (\*досліджено адгезію *L. plantarum* до тест-рослин, проведено аналіз даних та підготовлено статтю до друку).

### **Патент України на корисну модель**

1. Ліманська НВ, Іваниця ВО, Ертле Т, Басюл ОВ, Сергєєва ЖЮ, Коротаєва НВ, Ямборко ГВ. Одеський національний університет імені І.І Мечникова. Спосіб захисту рослин від бактеріального раку з використанням лактобацил. Патент України на корисну модель № 75360. 2018-11-27.

2. Сергєєва ЖЮ, Крилова КД, Ліманська НВ, Васильєва НЮ, Іваниця ВО, Товкач ФІ, Басюл ОВ, Коротаєва НВ. Одеський національний університет імені І.І Мечникова. Спосіб захисту коренеплодів та бульб від м'якої гнилі з використанням лактобацил та автолізу ервіній. Патент України на корисну модель № 82922. 2013-08-27.

3. Сергєєва ЖЮ, Крилова КД, Ліманська НВ, Васильєва НЮ, Іваниця ВО, Товкач ФІ, Басюл ОВ, Коротаєва НВ. Одеський національний університет імені І.І Мечникова. Спосіб захисту рослин від хвороби "чорна ніжка" з використанням лактобацил та автолізу ервіній. Патент України на корисну модель № 82921. 2013-08-27.

4. Васильєва НЮ, Коротаєва НВ, Ліманська НВ, Іваниця ВО. Одеський національний університет імені І.І Мечникова. Спосіб стабілізації рН поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій. Патент України на корисну модель № 84665. 2013-10-25.

5. Коротаєва НВ, Ліманська НВ, Маринова ІІ, Іваниця ВО. Одеський національний університет імені І.І Мечникова. Спосіб модифікації середовища УМА для виділення ендоситної мікробіоти винограду. Патент України на корисну модель № 95964. 2015-01-12.

6. Ліманська НВ, Коротаєва НВ, Мерліч АГ, Ямборко ГВ, Іваниця ВО. Одеський національний університет імені І.І Мечникова. Спосіб захисту рослин від бактеріального раку з використанням суміші штамів *Lactobacillus plantarum* зі стимулюючою активністю. Патент України на корисну модель № 95966. 2015-01-12.

### **Тези доповідей та матеріали конференцій, з'їздів**

1. Ніколова НІ, Коротаєва НВ. Кількість представників мікробіоти винограду у пухлинних тканинах на виноградниках сорту Каберне Совіньон півдня України. Матеріали ІХ Міжнародної наукової конференції студентів та аспірантів "Молодь і поступ біології", 16-19 квітня 2013, Львів, Україна: 331-332.

2. Korotaeva N, Limanska N, Ivanytsia V. Effect of *Lactobacillus plantarum* strains on crown gall infection in *Kalanchoe daigremontiana*. Abstracts of the 5-th Polish - Ukrainian Weigl Conference on Microbiology, May 23-25 2013, Chernivtsi, Ukraine: 32.

3. Іваниця ВО, Ліманська НВ, Коротаєва НВ, Сергєєва ЖЮ, Крилова КД, Басюл ОВ, Кондратюк ТВ, Ямборко ГВ, Товкач ФІ. Біологічний контроль

бактеріальних захворювань за допомогою бактеріоцинів, бактеріофагів та антагоністичних бактерій. Матеріали докладов Міжнародної конференції "Современное состояние и перспективы инноваций биометода в сельском хозяйстве", 9-12 сентября 2013, Одесса, Украина: 47-48.

4. Limanska N, Korotaeva N, Biscola V, Ivanytsia T, Basiul O, Choiset Y, Merlich A, Kondratiuk T, Yamborko G, Nazarenko G, Chobert J-M, Ivanytsia V, Naertle T. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* against crown gall agent. Тези доповідей XIII з'їзду товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського, 1-6 жовтня 2013, Ялта, Україна: 352.

5. Коротаєва НВ. Поширення *Rhizobium vitis* на виноградниках півдня України. Матеріали міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених "Захист рослин у ХХІ столітті проблеми та перспективи розвитку", 24-25 жовтня 2013, Харків, Україна: 48.

6. Маринова І, Коротаєва НВ. Численість мікробіоти винограду при висівах на середовище YPGA. Матеріали VIII Міжнародної конференції молодих учених "Біологія: від молекули до біосфери", 3-6 грудня 2013, Харків, Україна: 120-121.

7. Коротаєва НВ, Маринова І, Задерей ОВ, Ковальчук ДВ, Назаренко ГМ. Поширення збудників бактеріального раку на виноградниках півдня України. Матеріали VIII Міжнародної конференції молодих учених "Біологія: від молекули до біосфери", 3-6 грудня 2013, Харків, Україна: 118-119.

8. Коротаєва НВ, Остапчук АМ. Визначення профілю жирних кислот фітопатогенних бактерій представників родів *Rhizobium*, *Ralstonia*, *Erwinia* (*Pectobacterium*). Матеріали IX наукової конференції молодих вчених "Мікробіологія в сучасному сільськогосподарському виробництві", 26-27 листопада 2013., Чернігів, Україна: 21-22.

9. Коротаєва НВ, Задерей ОВ, Іваниця АВ, Маринова І, Ліманська НВ. Вивчення можливостей захисту рослин від бактеріального раку штамми *Lactobacillus plantarum*. Матеріали III Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів та молодих вчених "Фундаментальні та прикладні дослідження в біології", 24-27 лютого 2014, Донецьк, Україна: 116.

10. Маринова І, Коротаєва НВ. Численність збудників бактеріального раку винограду у інфікованому рослинному матеріалі. Збірник наукових праць V Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених і студентів "Біологічні дослідження - 2014", 4-5 березня 2014, Житомир, Україна: 71-73.

## АНОТАЦІЯ

**Коротаєва Н.В. Розробка біопрепарату на основі молочнокислих бактерій проти збудника бактеріального раку рослин – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.20 – «Біотехнологія» (091 – Біологія) – Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, Одеса, 2020.

Дисертаційну роботу присвячено вивченню ендофітної мікробіоти судин та тканин пухлин винограду, збудника бактеріального раку, пошуку його активних антагоністів серед молочнокислих бактерій та створенню на їх основі біопрепарату проти збудника бактеріального раку рослин.

Встановлено чисельність ендофітної мікробіоти судин винограду, середню чисельність представників мікробіоти та бактерій роду *Rhizobium* у пухлинах винограду. За результатами видової ідентифікації мікроорганізмів, виділених з пагонів винограду, за допомогою газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот та автоматичної системи MIDI Sherlock (MIS) визначено, що видовий склад мікробіоти пагонів винограду включав представників: *Rhizobium radiobacter*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pantoea addlomerans*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthobacter agilis*, *Yersinia aldovae*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter globiformis*, *Kluyvera intemedia*, *Kluyvera cryocrescens*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Photorhabdus luminescens*. ПЛР-аналіз генів патогенності показав, що у пухлинах рослин переважають авірулентні бактерії *R. vitis* і *R. radiobacter*. Було ізольовано та ідентифіковано штами патогенних ризобій *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 та *R. vitis* ONU390.

З метою пошуку штамів антагоністів проти збудників бактеріального раку винограду серед штамів *Lactobacillus plantarum* ПЛР-дослідження показало, що усі досліджені штами *L. plantarum* містять від 2 до 6 генів, відповідальних за синтез плантарицинів, що вказує на рівень їх антагоністичного потенціалу. Дослідження антагоністичної активності лактобацил *in vitro* проти збудників бактеріального раку рослин показало, що у 100% випадків ризобії пригнічувалися внаслідок утворення органічних кислот досліджених штамів (рН 3,5-4,0) та лише бактерії *L. plantarum* ONU87 є продуцентом бактеріоцину, який формує на агарі зони пригнічення росту патогенних ризобій у варіанті з надосадовою культуральною рідиною з нейтральним рН.

Дослідження *in vivo* на моделі дисків моркви у випадку обробки ризобіями з бактеріями досліджуваних штамів *L. plantarum* показало, що серед семи протестованих штамів *L. plantarum* найкращі результати пригнічення росту пухлин показали шість штамів лактобацил, що свідчить про високу антагоністичну активність цих лактобактерій відносно ризобій. Зараження тест-рослин каланхое *Kalanchoe daigremontiana* фітопатогеном *R. radiobacter* C58 одночасно з обробкою лактобацилами та їх метаболітами в різній мірі впливає на утворення пухлин, в залежності від варіанта обробки. Обробка надосадовою рідиною з нативним рН добової культури (рН 4,1–4,3) *L. plantarum* зменшила кількість зразків із симптомами бактеріального раку на 68,1%–84,0%. Бактерії

добової культури, як з нативним рН, так і з нейтральним рН зменшували кількість зразків із симптомами бактеріального раку на 75,0–86,0%.

За ступенем антагоністичної активності, пригнічення утворення, росту пухлин і спектром генів, що відповідають за синтез бактеріоцинів, для подальших досліджень було відібрано перспективний штам *L. plantarum* ONU87.

Методом математичного аналізу з використанням неповної регресійної моделі розроблено оптимальне поживне середовище, що дає можливість отримати концентрацію життєздатних клітин бактерій  $1,16 \times 10^{10}$  КУО/мл. Розроблено технологічну схему отримання біопрепарату та рекомендації стосовно умов та термінів зберігання біопрепарату.

Встановлено, що обробка бактеріями *L. plantarum* ONU87 рідкої форми біопрепарату за штучного інфікування чубуків винограду *R. radiobacter* C58 призводила до зменшення на 76,8% кількості заражених зразків, в які потрапив збудник бактеріального раку та стимулювала ріст і розвиток рослин винограду.

**Ключові слова:** біоконтроль, бактеріальний рак рослин, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, антагоністична активність, *Lactobacillus plantarum*.

## АНОТАЦИЯ

**Коротаева Н.В. – разработка биопрепарата на основе молочнокислых бактерий против возбудителей бактериального рака растений – Квалификационная научная работа на правах рукописи.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата наук по специальности 03.00.20 – «Биотехнология». (091 – Биология). – Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, Одесса, 2020.

Диссертационная работа посвящена изучению эндофитной микробиоты сосудов и тканей опухолей винограда, возбудителей бактериального рака, поиску их активных антагонистов среди молочнокислых бактерий и созданию на их основе биопрепарата против возбудителей бактериального рака растений.

Установлено численность эндофитной микробиоты сосудов винограда, среднюю численность представителей микробиоты и бактерий рода *Rhizobium* в тканях опухолей винограда. По результатам видовой идентификации микроорганизмов, выделенных из побегов винограда, с помощью газовой хроматографии метиловых эфиров жирных кислот и автоматической системы MIDI Sherlock (MIS) определено, что видовой состав микробиоты побегов винограда состоял из представителей: *Rhizobium radiobacter*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pantoea addlomerans*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthobacter agilis*, *Yersinia aldovae*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter globiformis*, *Kluyvera intemedia*, *Kluyvera cryocrescens*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Photorhabdus luminescens*. ПЦР-анализ генов патогенности показал, что в опухолях растений доминируют авирулентные бактерии *R. vitis* и *R. radiobacter*. Было выделено и идентифицировано штаммы патогенных ризобий *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 та *R. vitis* ONU390.

С целью поиска антагонистов против возбудителей бактериального рака винограда среди штаммов *Lactobacillus plantarum* был проведен ПЦР-анализ, который показал, что все исследуемые штаммы *L. plantarum* содержат от 2 до 6

генов, ответственных за синтез плантарицинов, что указывает на уровень их антагонистического потенциала. Исследование антагонистической активности лактобацилл *in vitro* против возбудителей бактериального рака растений показало, что в 100% случаев ризобии угнетались вследствие синтеза органических кислот исследуемых штаммов (рН 3,5-4,0), и только бактерии *L. plantarum* ONU87 являются продуцентом бактериоцина, который формирует на агаре зоны угнетения роста патогенных ризобий в варианте с надосадочной жидкостью с нейтральным рН.

Исследование *in vivo* на модели дисков моркови в случае обработки ризобиями с бактериями исследуемых штаммов *L. plantarum* показало, что среди семи протестированных штаммов *L. plantarum* лучшие результаты угнетения роста опухолей показали шесть штаммов лактобацилл, что говорит про высокую антагонистическую активность этих лактобактерий по отношению к ризобиям. Заражение тест-растений каланхое *Kalanchoe daigremontiana* бактериями *R. radiobacter* C58 одновременно с обработкой лактобациллами и их метаболитами в разной мере влияет на образование опухолей в зависимости от варианта обработки. Обработка надосадочной жидкостью с нативным рН суточной культуры (рН 4,1-4,3) *L. plantarum* уменьшила количество образцов с симптомами бактериального рака на 68,1%-84,0%.

По степени антагонистической активности, угнетения образования и роста опухолей и спектру генов, что отвечают за синтез бактериоцинов, для дальнейших исследований был отобран перспективный штамм *L. plantarum* ONU87.

Методом математического анализа с использованием неполной регрессийной модели разработана оптимальная питательная среда, что дает возможность получить концентрацию жизнеспособных клеток бактерий  $1,16 \times 10^{10}$  КОЕ/мл. Разработана технологическая схема получения биопрепарата и рекомендации насчет условий и терминов его хранения.

Установлено, что обработка бактериями *L. plantarum* ONU87 жидкой формы биопрепарата при инфицировании черенков винограда *R. radiobacter* C58 уменьшила на 76,8% количество зараженных образцов, в которые попал возбудитель бактериального рака, и стимулировала рост и развитие растений винограда.

**Ключевые слова:** биоконтроль, бактериальный рак растений, *Rhizobium vitis*, *Rhizobium radiobacter*, антагонистическая активность, *Lactobacillus plantarum*.

## SUMMARY

**Korotaieva N.V. Development of the biological formulation against crown gall disease in plants based on lactic acid bacteria – Qualifying scientific work on the rights of a manuscript.**

The thesis is submitted for acquisition of a candidate's degree in biological science (doctor of philosophy) in specialty 03.00.20 – biotechnology (091 – Biology). – Odesa I.I.Mechnikov National University, Odesa, Ukraine, 2020.

The dissertation is devoted to the study of endophytic microbiota of vessels and tissues of the crown gall of grapes, the search for active antagonists among lactic acid

bacteria and to the development of the biological formulation based on lactic acid bacteria for prevention of the crown-gall disease in plants.

The quantitative and qualitative composition of the endophytic microbiota of grapes and crown gall tissues was determined. The species identification of microorganisms isolated from grape shoots was carried out using gas chromatography of fatty acid methyl esters and the automatic system MIDI Sherlock (MIS). It was established that the species of the microbiota of grape shoots included the representatives: *Rhizobium radiobacter*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pantoea addlomerans*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Xanthobacter agilis*, *Yersinia aldovae*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter globiformis*, *Kluyvera intermedia*, *Kluyvera cryocrescens*, *Xanthomonas axonopodis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Photorhabdus luminescens*. PCR analysis of pathogenicity genes demonstrated that avirulent bacteria *Rhizobium vitis* and *Rhizobium radiobacter* predominated in crown galls. Pathogenic strains *R. vitis* ONU388, *R. vitis* ONU389 and *R. vitis* ONU390 were isolated.

In the search of antagonistic strains against bacteria causing crown-gall disease in plants, all of the studied strains of *Lactobacillus plantarum* were found to contain from 2 to 6 genes which code for the synthesis of plantaricins. This correlates with the level of their antagonistic potential. An *in vitro* study of the antagonistic activity of lactobacilli against pathogenic bacteria causing the crown-gall disease demonstrated that 100% of rhizobia growth was inhibited by the lactobacilli synthesising organic acids (pH 3.5-4.0). However, only *L. plantarum* ONU87 produced a bacteriocin active against gram-negative rhizobia and formed growth inhibition zones of pathogenic rhizobia on agar in the experiment with supernatant with neutral pH.

The *in vivo* study based on the carrot discs model co-inoculation with rhizobia and the studied strains of *L. plantarum* demonstrated that among seven tested strains of *L. plantarum* the best results for tumor growth inhibition were shown by six strains of lactobacilli, suggesting high antagonistic activity of the mentioned lactobacteria. Depending on the treatment type, co-inoculation of kalanchoe leaf tissues by the *R. radiobacter* C58 together with lactobacilli and their metabolites affected tumor growth differently. The treatment with supernatant with native pH (pH 4.1–4.3) inhibited tumor development by 68,1%–84,0%. Bacterial cultures of lactobacilli both with native pH and with neutral pH inhibited tumor development by 75.0–86.0%.

According to the degree of antagonistic activity, inhibition of tumor formation and the present spectrum of genes which code for bacteriocins, a promising strain of *L. plantarum* ONU87 was selected for further studies.

The method of mathematical analysis based on the partial regression model was used to develop the optimal culture medium composition. With this medium the concentration of lactic acid bacteria in the stationary phase of growth increased to  $3,51 \pm 0,103 \times 10^{10}$  CFU/ml. A biotechnological production plan for the biological formulation was developed and the recommendations for storage were provided.

It was established that treatment of grape shoots artificially infected by *R. radiobacter* C58 with the *L. plantarum* ONU87 strain reduced the amount of infected samples by 76,8% and stimulated growth and development of grapes.

**Key words:** crown gall, *R. vitis*, *R. radiobacter*, antagonism, biological formulation, *L. plantarum*.