

## ЗДАТНІСТЬ *ESCHERICHIA COLI* ДО ПРИКРІПЛЕННЯ НА ПОВЕРХНЯХ РОСЛИН І КОНКУРЕНТНОЇ АДГЕЗІЇ З ПРЕДСТАВНИКОМ ЕНДОФІТНОЇ МІКРОБІОТИ *ALCALIGENES FAECALIS*

Показано здатність штаму *Escherichia coli* pKEN, який синтезує білок GFP, що світиться, прикріплюватися до поверхонь коренів паростків крес-салату *Lepidium sativum* L. і утворювати сформовані біоплівки з розвинутим матриксом. За обробки насіння крес-салату 2% добової культури *E. coli* pKEN GFP за лабораторних умов спостерігалось підвищення середньої довжини коренів та стебел на 30,0%. Представник ендоефітної мікробіоти *Alcaligenes faecalis* ОНУ 452 пригнічував ріст модельного штаму *E. coli* pKEN GFP на поживному середовищі LB за дослідження методом дифузії в агар. За рівного співвідношення або меншої кількості клітин кишкової палички *A. faecalis* ОНУ 452 перешкоджав прикріпленню *E. coli* pKEN GFP, а за більшої кількості клітин останнього спостерігалась їх інтеграція у біоплівку антагоніста.

**Ключові слова:** *Escherichia coli*, *Alcaligenes faecalis*, антагоніст, прикріплення, поверхня рослин.

**Постановка проблеми.** Здатність патогенних штамів *Escherichia coli* спричиняти низку важких захворювань, таких як гастроентерити, запалення сечостатевої системи, сепсис, менінгіт та інші, робить необхідним пошук способів запобігання поширення даних патогенів у навколишньому середовищі [1]. Існують відомості про те, що резервуарами *E. coli*, у тому числі – патогенних, можуть бути рослини [2; 3]. Питання постає в тому, чи можна за допомогою представників мікробіоти рослин запобігти прикріпленню та виживанню кишкових паличок на рослинних поверхнях або у судинах рослин. Мікробіота рослин на дійсний час залишається недостатньо вивченою, хоча її представники представляють значний інтерес з точки зору біотехнології. Вивчення антагоністичного потенціалу ендоефітної мікробіоти дозволить створювати ефективні біологічні препарати для боротьби з патогенами. Науковий і практичний інтерес представляють дослідження антагоністичного потенціалу такого представника ендоефітної мікробіоти рослин як *A. faecalis*, відомого за здатністю до пригнічення фітопатогенної мікробіоти [4; 5] та деяких патогенів людини [5].

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Дослідження показали здатність кишкових паличок мігрувати по судинах рослин і потрапляти у плоди томатів [2]. Патогенні *E. coli* були здатними до прикріплення і утворення біоплівок на раневих та непошкоджених поверхнях плодів яблук [3]. Що стосується непатогенних штамів, то дослідження вказали на можливість *E. coli*, первинно виділених з ґрунту, навіть стимулювати ріст паростків кукурудзи [6].

Бактерії *Alcaligenes faecalis* зустрічаються у ґрунті, кишковому тракті, а також – у судинах рослин [7]. Використовуються у біотехнології для виробництва курдлану [8] та очищення стічної води [9]. Zahir et al. (2013) у дослідженнях методом дифузії в агар показали слабку антагоністичну активність екстракту культуральної рідини штаму *A. faecalis* у етилацетаті проти *Escherichia coli* [5]. Досліджений попередніми авторами штам *A. faecalis* було виділено з промислових стічних вод [5].

**Мета статті:** дослідити здатність *E. coli* до прикріплення до поверхні рослин і можливість пригнічення даних бактерій антагоністичним штамом *A. faecalis* ОНУ 452.

### Матеріал та методи

Штам *A. faecalis* ОНУ 452, первинно виділений з мікробіоти судин винограду, було надано з колекції кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Для моделювання здатності кишкової палички до заселення рослинних поверхонь та можливості її пригнічення представником ендofітної мікробіоти *A. faecalis* ОНУ 452 нами було застосовано штам *E. coli* з GFP-плазмідом рKEN, що кодує білок з флуоресценцією зеленого кольору [10], люб'язно наданий доктором біологічних наук Ігорем Романовичем Головльовим.

Культуру *E. coli* рKEN GFP для дослідів вирощували у бульоні LB [11] протягом доби при 37°C до щільності культури 10<sup>8</sup> КУО/мл.

Крес-салат (*Lepidium sativum* L.) було обрано як модельну рослину через швидке проростання та ріст. З добової культури *E. coli* рKEN GFP готували 2% суспензії та обробляли нею насіння крес-салату, поверхню якого попередньо стерилізували 25% розчином H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> протягом 30 сек, а потім відмивали три рази у стерильній воді. Інокуляція насіння тривала одну годину. Контрольне насіння вимочували одну годину у стерильній дистильованій воді. Насіння пророщували у стерильних чашках Петрі на фільтрувальному папері за температури 25°C. Через 5 днів проводили облік схожості та середніх довжин коренів та стебел паростків. Статистичну обробку (середнє значення і довірчі інтервали) обраховували за допомогою програми Excel. Проводили п'ять незалежних експериментів по три повторності з 30 насінинами у кожній.

Для дослідження прикріплення *E. coli* рKEN GFP до поверхонь коренів крес-салату трьох-денні паростки занурювали у добову культуру кишкової палички та інкубували добу при 37°C. Далі біоплівки фіксували протягом 15 хв у 96° етиловому спирті та фарбували 0,1% акридиновим помаранчевим протягом 10 хв. Корінці паростків розташовували на склі і після висихання мікроскопували за допомогою світлового мікроскопа Zeiss (x600).

Для вивчення конкурентної адгезії добову культуру *E. coli* рKEN GFP додавали до попередньо сформованих біоплівок штама *A. faecalis* ОНУ 452 на поверхні стерильних пластикових полістиролових планшетів у різних співвідношеннях (1:1; 1:0,5; 1:2; 1:5). Кількість клітин в інокуляції штамів-антагоністів (10<sup>8</sup> КУО/мл) приймали за одиницю. У якості контролю використовували добові моновидові біоплівки досліджених штамів. Дослідження проводили у п'яти незалежних експериментах у 6 повторностях кожний. Мікроскопію біоплівок за конкурентної адгезії проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа Zeiss з використанням синього фільтру із довжиною хвилі 420 нм при збільшенні x600.

### Результати та обговорення

Обробка насіння крес-салату культурою *E. coli* рKEN GFP показала покращення деяких ростових характеристик сіянців у порівнянні з такими показниками у паростків з насіння, вимоченому лише у воді (Табл. 1).

Таблиця 1

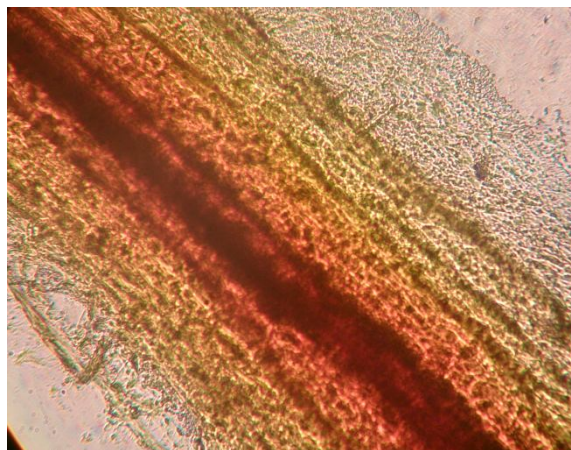
Ростові характеристики паростків крес-салату

Варіант обробки	Схожість, %	Середня довжина стебла, см	Середня довжина кореня, см
Стерильна дистильована вода	82,0 ± 2,7	1,73 ± 0,11	2,76 ± 0,31
1% добової культури <i>E. coli</i> рKEN GFP	82,5 ± 3,1	2,46 ± 0,15	3,93 ± 0,25

Середні довжини стебел і коренів у оброблених сіянців збільшилися однаково – на 29,6% і 30,0%, відповідно. Схожість насіння не змінилася. Отже, отримані нами результати підтверджують дані Nautiyal et al. (2010) про можливу стимуляцію росту рослин культурою *E. coli*, але на відміну від описаних попередніми авторами штамів з ґрунту, нами подібний ефект було виявлено для лабораторного модельного штама кишкової палички.

Отже, ймовірно, окремі штами даного мікроорганізму можуть проявляти стимулюючий вплив на ріст рослин за неописаними досі механізмами.

Вочевидь, цьому сприяє і виражена здатність до прикріплення до рослинних поверхонь: бактерії штама *E. coli* pKEN GFP утворювали біоплівку на коренях крес-салату (Рис. 1).

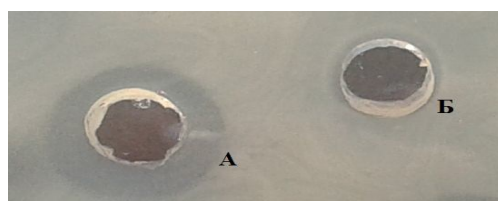


**Рис. 1.** Корінь паростка крес-салату з прикріпленими клітинами штаму *E. coli* pKEN, які утворюють біоплівку (x600).

Біоплівка була повністю сформована, з розвинутим матриксом, який оточував бактерії рівномірним шаром. Отже, бактерії модельного штаму так само, як і патогенні *E. coli*, описані у досліджах Burnett et al. (2000), були здатними до прикріплення до рослинних тканин.

Надалі нами було проведено спробу використати ендоефітну бактерію-антагоніста *A. faecalis* ОНУ 452 проти прикріплення бактерій штаму *E. coli* pKEN GFP на етапі адгезії до поверхні.

Попереднє дослідження антагоністичної активності *A. faecalis* ОНУ 452 щодо *E. coli* pKEN GFP методом дифузії в агар показало пригнічення росту кишкових паличок, яке проявлялося у вигляді зони інгібування навколо лунки з культурою бактерій (Рис. 2).

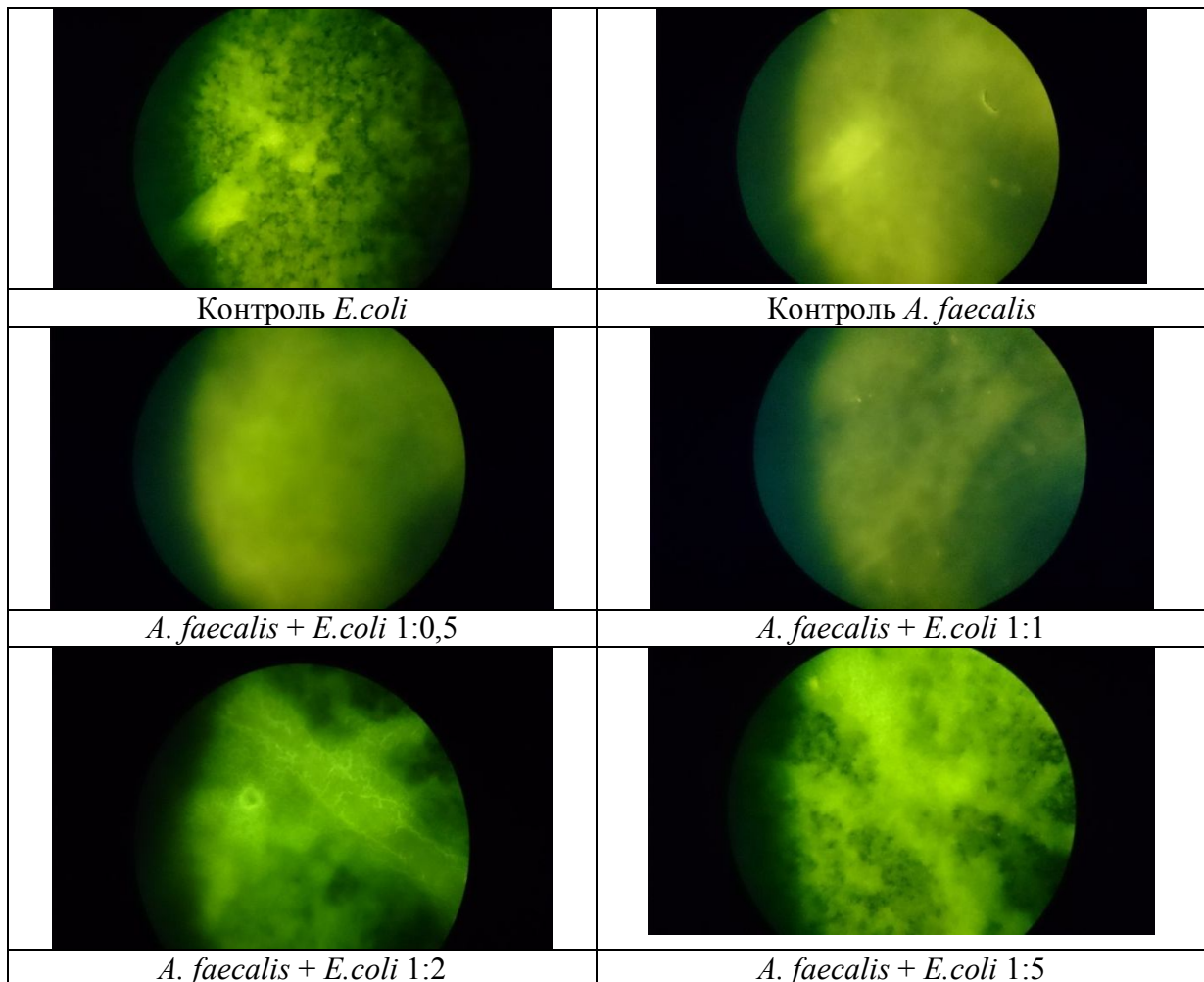


**Рис. 2.** Вплив *A. faecalis* ОНУ 452 на газон *E. coli* pKEN GFP: А – зона затримки росту під впливом культури *A. faecalis* ОНУ 452; Б – відсутність ефекту надосадової рідини культури *A. faecalis* ОНУ 452.

Фільтрована безклітинна рідина не спричиняла затримки росту, отже, пригнічення відбувалося лише за наявності бактерій *A. faecalis*. Антагоністичний ефект *A. faecalis*, описаний у літературі, проявлявся за рахунок виділення гідроксиламіну [12]

і сидерофорів [13]. Ймовірно, що досліджений нами штам *A. faecalis* ОНУ 452 не виділяв у культуральну рідину антагоністичні речовини у концентраціях, достатніх для пригнічення кишкової палички, і для інгібування *E. coli* рKEN GFP потребувалася присутність саме клітин *A. faecalis* ОНУ 452.

Оскільки не спостерігалось активного виділення та накопичення антагоністичних речовин у навколишньому середовищі, нами було зроблене припущення, що пригнічення бактеріями *A. faecalis* ОНУ 452 інших видів мікроорганізмів відбувається за безпосереднього контакту клітин між собою, наприклад, на рівні прикріплення до субстрату і формування біоплівки. Для перевірки цього припущення нами було вивчено здатність *A. faecalis* ОНУ 452 протидіяти прикріпленню до субстрату клітин *E. coli* рKEN. Використання штама *E. coli* з плазмідом рKEN, що несе ген, який кодує білок GFP, що світиться зеленим кольором у синьому спектрі флуоресцентного мікроскопа [10], дозволило оцінити рівень формування змішаних біоплівок. Так, контрольні біоплівки *E. coli* рKEN GFP при спостереженні з використанням флуоресцентного мікроскопу склалися з добре сформованих мікроколоній, що світилися темно-зеленим кольором (Рис. 3).



**Рис. 3.** Біоплівки досліджених штамів під флуоресцентним мікроскопом (x600).

На відміну від *E. coli* рKEN GFP, біоплівки штама *A. faecalis* ОНУ 452 не мали темно-зеленого забарвлення і на мікрофотографіях був присутнім лише порожній фон салатного кольору (Рис. 3).

Дослідження здатності біоплівки *A. faecalis* ОНУ 452 протидіяти прикріпленню тест-штаму *E. coli* до лунок планшетів не виявило повного захисного ефекту біоплівки за умов експерименту.

За співвідношення *A. faecalis* + *E. coli* 1:0,5 та 1:1, біоплівки *A. faecalis* виявили здатність до протидії прикріпленню клітин *E. coli* рKEN GFP до субстрату та інтеграцію у біоплівку. З підвищенням концентрації клітин *E. coli* біоплівки *A. faecalis* втрачали свої захисні властивості. Так, за співвідношення *A. faecalis* + *E. coli* 1:2 клітини *E. coli* інтегрувалися до біоплівки *A. faecalis* і її характер змінювався на полівидову. За співвідношення *A. faecalis* + *E. coli* 1:5 *E. coli*, вочевидь, повністю заміщає *A. faecalis* у біоплівці. Отримані результати свідчать про те, що біоплівки *A. faecalis* не здатні протистояти масованій інфільтрації клітин іншого виду, і можна припустити, що можлива заміна клітин *A. faecalis* на клітини *E. coli* рKEN GFP у біоплівці при співвідношенні 1:5, ймовірно, може бути наслідком швидкої активації системи *quorum sensing* у останнього мікроорганізму та підвищення біосинтезу деяких вторинних метаболітів, зокрема біосурфактантів та факторів розпаду біоплівки таких як *цис-2*-додеканова кислота та інших [14].

Отже, біоплівки *A. faecalis* ОНУ 452 мають захисний потенціал за рівного співвідношення клітин штама-конкурента у середовищі, але не здатні протистояти включенню до свого складу бактерій іншого виду за умов масованої інфільтрації клітин останніх. Але, оскільки у природних умовах така велика концентрація патогенів виявляється рідко, то з вивчення конкурентного прикріплення на вищеописаній моделі «кишкова паличка: антагоніст» можна висловити припущення, що наявності антагоністів на поверхні може бути достатньо для протистояннї колонізації поверхонь патогеном.

### Висновки

1. Бактерії модельного штаму *E. coli* рKEN GFP утворювали сформовані біоплівки на коренях крес-салату і стимулювали ріст стебел та коренів паростків на 30,0% у порівнянні з контрольними рослинами.

2. Представник ендоефітної мікробіоти *A. faecalis* ОНУ 452 пригнічував ріст *E. coli* рKEN GFP на поживному середовищі і за конкурентної адгезії був здатним протистояти прикріпленню клітин кишкової палички до поверхні, якщо їх концентрація не перевищувала кількість клітин *A. faecalis* ОНУ 452.

3. Якщо кількість клітин *E. coli* рKEN GFP перевищувала таку у *A. faecalis* ОНУ 452, бактерії кишкової палички були здатними до конкурентної адгезії з антагоністом та інтеграції в його біоплівку.

### Література

1. Croxen M. A. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity // M. A. Croxen, B. B. Finlay // Nature Review Microbiology. – 2010. – Vol. 8, №1. – P. 26-38.
2. Deering A. J. Movement of *Salmonella* serovar *typhimurium* and *E. coli* O157:H7 to ripe tomato fruit following various routes of contamination // A. J. Deering, D. R. Jack, R. E. Pruitt, L. J. Mauer // Microorganisms. – 2015. – №3. – P. 809-825.
3. Burnett S. L. Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy // S. L. Burnett, J. Chen, L. R. Beuchat // Applied and Environmental Microbiology. – 2000. – Vol. 66, №11. – P. 4679-4687.
4. Yokoyama S. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against pathogens // S. Yokoyama, Y. Adachi, S. Asakura, E. Kohyama // Journal of General and Applied Microbiology. – 2013. – Vol. 59, №2. – P. 89 - 95.
5. Zahir I. A novel *Alcaligenes faecalis* antibacterial-producing strain isolated from a Moroccan tannery waste // I. Zahir, A. Houari, W. Bahafid, M. Iraqui, S. Ibsouda // African Journal of Microbiology Research. – 2013. – Vol. 7, №47. – P. 5314-5323.

6. Nautiyal C. S. Environmental *Escherichia coli* occur as natural plant growth-promoting soil bacterium // C. S. Nautiyal, A. Rehman, P. S. Chauhan // Archives of Microbiology. – 2010. – Vol. 192, № 3. – P. 185-193.
7. Pradeepa V. Screening and characterization of endophytic bacteria isolated from *Tabernaemontana divaricata* plant for cytokinin production // V. Pradeepa, M. Jennifer // Advanced Biotech. – 2013. – Vol. 13, № 4. – P. 12-17.
8. Wu J. Enhanced production of curdlan by *Alcaligenes faecalis* by selective feeding with ammonia water during the cell growth phase of fermentation // J. Wu, X. Zhan, H. Liu, Z. Zheng // Chinese Journal of Biotechnology. 2008. – Vol. 24. – P. 1035-1039.
9. Joo H.-S. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification // H.-S. Joo, M. Hirai, M. Shoda // Water Research. – 2006. – Vol. 40, № 16. – P. 3029-3036.
10. Cormack B. P. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) // B. P. Cormack, R. H. Valdivia, S. Falkow // Gene. – 1996. – Vol. 173. – P. 33 – 38.
11. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // Journal of bacteriology. – 1951. – Vol. 62, № 3. – P. 293-300.
12. Honda N. Antifungal effect of a heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis* // N. Honda, M. Hirai, T. Ano, M. Shoda // Biotechnology Letters. – 1998. – Vol. 20, № 7. – P. 703–705.
13. Sayyed R.Z. Siderophore production of *Alcaligenes faecalis* and its application for growth promotion in *Arachis hypogaea* // R.Z. Sayyed, N.S. Gangurde, P.R. Patel, S.A. Joshi, S.B. Chincholkar // Indian Journal of Biotechnology. – 2010. – Vol. 9. – P. 302-307.
14. Davies D. G. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms // D. G. Davies, C.N.H. Marques // Journal of bacteriology. – 2009. – Vol. 191. – P. 1393–1403.

#### References

1. Croxen, M. A. & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Review Microbiology*, 8 (1), 26-38.
2. Deering, A. J., Jack, D. R., Pruitt, R. E. & Mauer, L. J. (2015). Movement of *Salmonella* serovar *typhimurium* and *E. coli* O157:H7 to ripe tomato fruit following various routes of contamination. *Microorganisms*, 3, 809-825.
3. Burnett, S. L., Chen, J. & Beuchat, L. R. (2000). Attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to the surfaces and internal structures of apples as detected by confocal scanning laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (11), 4679-4687.
4. Yokoyama, S., Adachi, Y., Asakura, S. & Kohyama, E. (2013). Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against pathogens. *Journal of General and Applied Microbiology*, 59 (2), 89-95.
5. Zahir, I., Houari, A., Bahafid, W., Iraqui, M. & Ibsouda, S. (2013). A novel *Alcaligenes faecalis* antibacterial-producing strain isolated from a Moroccan tannery waste. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (47), 5314-5323.
6. Nautiyal, C.S., Rehman, A. & Chauhan, P.S. (2010). Environmental *Escherichia coli* occur as natural plant growth-promoting soil bacterium. *Archives of Microbiology*, 192, (3), 185-193.
7. Pradeepa, V. & Jennifer, M. (2013). Screening and characterization of endophytic bacteria isolated from *Tabernaemontana divaricata* plant for cytokinin production. *Advanced Biotechnology*, 13 (4), 12-17.
8. Wu, J., Zhan, X., Liu, H. & Zheng, Z. (2008). Enhanced production of curdlan by *Alcaligenes faecalis* by selective feeding with ammonia water during the cell growth phase of fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*, 24, 1035-1039.
9. Joo, H.-S., Hirai, M. & Shoda, M. (2006). Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Water Research*, 40 (16), 3029-3036.
10. Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173, 33-38.
11. Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 62 (3), 293-300.
12. Honda, N., Hirai, M., Ano, T. & Shoda, M. (1998). Antifungal effect of a heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters*, 20 (7), 703-705.
13. Sayyed, R. Z., Gangurde, N. S., Patel, P. R., Joshi, S. A. & Chincholkar, S. B. (2010). Siderophore production of *Alcaligenes faecalis* and its application for growth promotion in *Arachis hypogaea*. *Indian Journal of Biotechnology*, 9, 302-307.
14. Davies, D. G. & Marques, C. N. H. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 191, 1393-1403.

**Summary.** *Limanska N. V., Marynova I. I., Korotaieva N. V., Kruchanova A. V., Galkin M. B. Ability of Escherichia coli to attach to plant surfaces and to compete for adhesion with the endophytic microbiota representative Alcaligenes faecalis*

**Introduction.** *Plants can be the possible reservoirs of Escherichia coli in nature, and it is necessary to study the possibility of these bacteria to attach to plant surfaces and compete with representatives of epiphytic and endophytic microbiota. Such studies will help to develop some biological preparations to minimize the spread of E. coli strains in environment. Taking into account the high danger of pathogenic E. coli strains, any perspective strategies for competing with E. coli on an adhesion stage should be evaluated.*

**Purpose.** *To study the ability of E. coli to attach to plant surface and the possibility to inhibit these bacteria by the antagonistic strain A. faecalis ONU 452.*

**Methods.** *To model the competition adhesion of the endophytic microbiota representative A. faecalis ONU 452 and E. coli, the strain E. coli pKEN carrying a plasmid encoding GFP-protein, has been used. Effect of E. coli pKEN GFP on plant growth was studied by inoculation of garden cress (Lepidium sativum L.) seeds with sterilized surfaces with 2% suspension of overnight culture. Germination and growth of seedlings were evaluated. Ability of E. coli pKEN to form biofilms was studied by incubation of bacterial culture with seedling roots overnight and subsequent staining of plant tissues with acridine orange (0,1%). Biofilms were observed under the light microscope (x600). Antagonistic activity of A. faecalis ONU 452 against E. coli pKEN GFP was initially found by diffusion-in-agar method. Competition for adhesion was studied under fluorescent microscope with exposition to blue range light 420 nm (x600). Cells of E. coli pKEN GFP exhibited green fluorescent opposite to non-fluorescent A. faecalis ONU 452.*

**Results.** *Growth characteristics of garden cress seedlings such as mean lengths of stems and roots increased in 30,0% when the seeds were inoculated with E. coli pKEN GFP and germinated under laboratory conditions. Percentage of germinated seeds was not changed as compared with the control. Stimulation activity was likely to be associated with the ability to attach to plant surfaces: bacteria of E. coli pKEN GFP strain formed developed biofilms on garden cress seedlings with the extensive matrix regularly covering the root surfaces. A. faecalis ONU 452 was found to be antagonistic against E. coli pKEN in a diffusion-in-agar assay. Only overnight culture inhibited E. coli pKEN GFP growth but not the filtrated cultural liquid. Due to absence of active secretion of antagonistic compounds in cultural liquid we suggested that A. faecalis ONU 452 inhibit E. coli pKEN GFP by direct cell-to-cell interactions - probably - at the stage of attachment to surfaces and biofilm formation. To test this hypothesis, we added the overnight culture of E. coli pKEN GFP diluted in different ratio to A. faecalis ONU 452 biofilms on polystyrol plates. Antagonistic strain could prevent the attachment of E. coli pKEN GFP if the ratio of A. faecalis ONU 452 : E. coli pKEN cells was 1 : 0,5 or 1 : 1. But if the number of E. coli pKEN GFP cells was higher than the concentration of antagonistic cells, E. coli could be intercalated in a formed A. faecalis ONU 452 biofilm. But as in nature the massive infiltration of certain microbial species is rarely to be occurred, it could be suggested that the present amount of antagonistic A. faecalis on plant surfaces may be sufficient for protection against E. coli penetration.*

**Conclusions.** *Bacteria of the model strain E. coli pKEN GFP attached to Lepidium sativum L. surfaces, formed developed biofilms and stimulated plant growth. Endophytic antagonistic bacterium A. faecalis ONU 452 inhibited E. coli pKEN GFP and could prevent its attachment.*

**Key words:** *Escherichia coli, Alcaligenes faecalis, antagonist, attachment, plant surface*

**Одеський національний університет імені І. І. Мечникова**

Одержано редакцією

05.03.2017

Прийнято до публікації

23.11.2017