Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Цикл наукових праць
на здобуття щорічної Премії Президента України для молодих вчених

Бактеріальні біоплівки як форма взаємодії бактерій із навколишнім середовищем

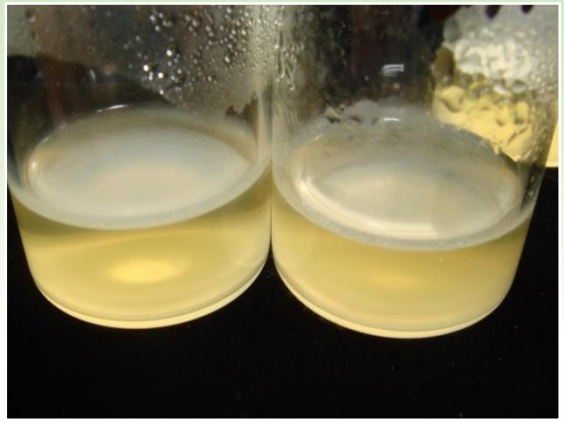
Автор: Мошинець Олена Володимирівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник відділу регуляторних механізмів клітини, докторант Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

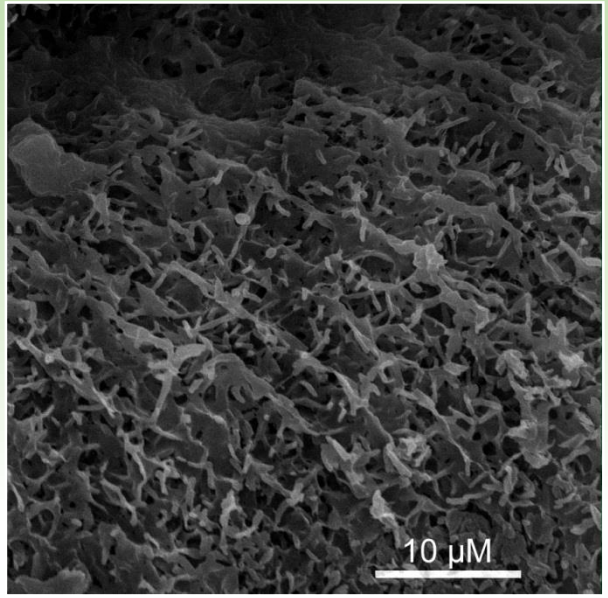
КИЇВ - 2020

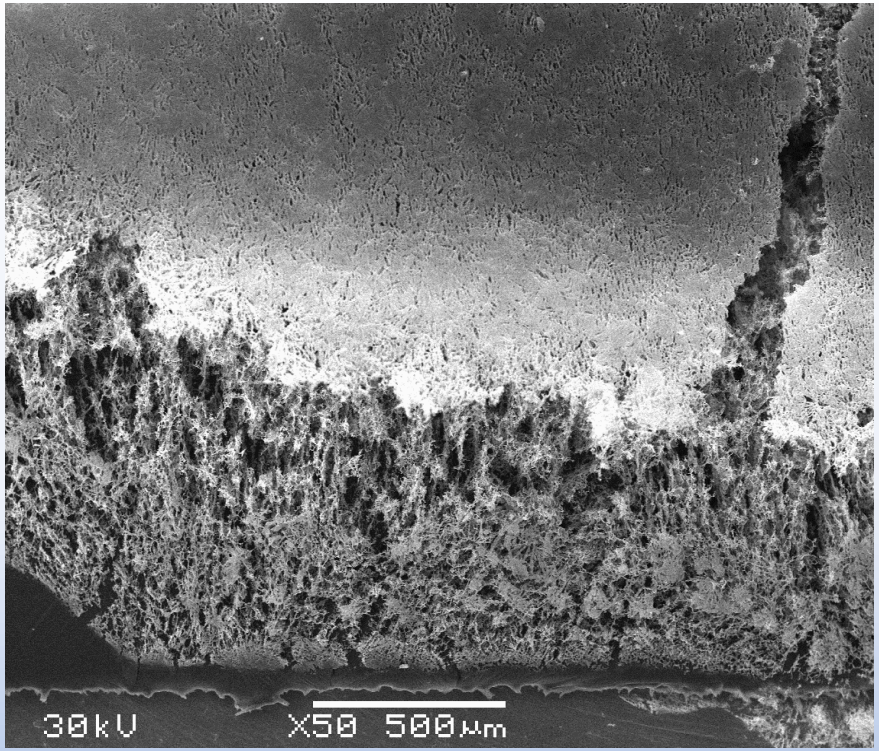
Актуальність теми

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 рослини та співіснування із ними у фітосфері.

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.







Головною метою роботи було дослідити феноменологію утворення біоплівок та роль позаклітинних полісахаридів та градієнту кисню в утворенні біоплівки та в адаптації до навколишнього середовища на прикладі грам-негативних бактерій *Pseudomonas fluorescens* SBW25, *Bordetella avium*, *Pseudomonas* spp, 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 зіпсованого 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, N-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.

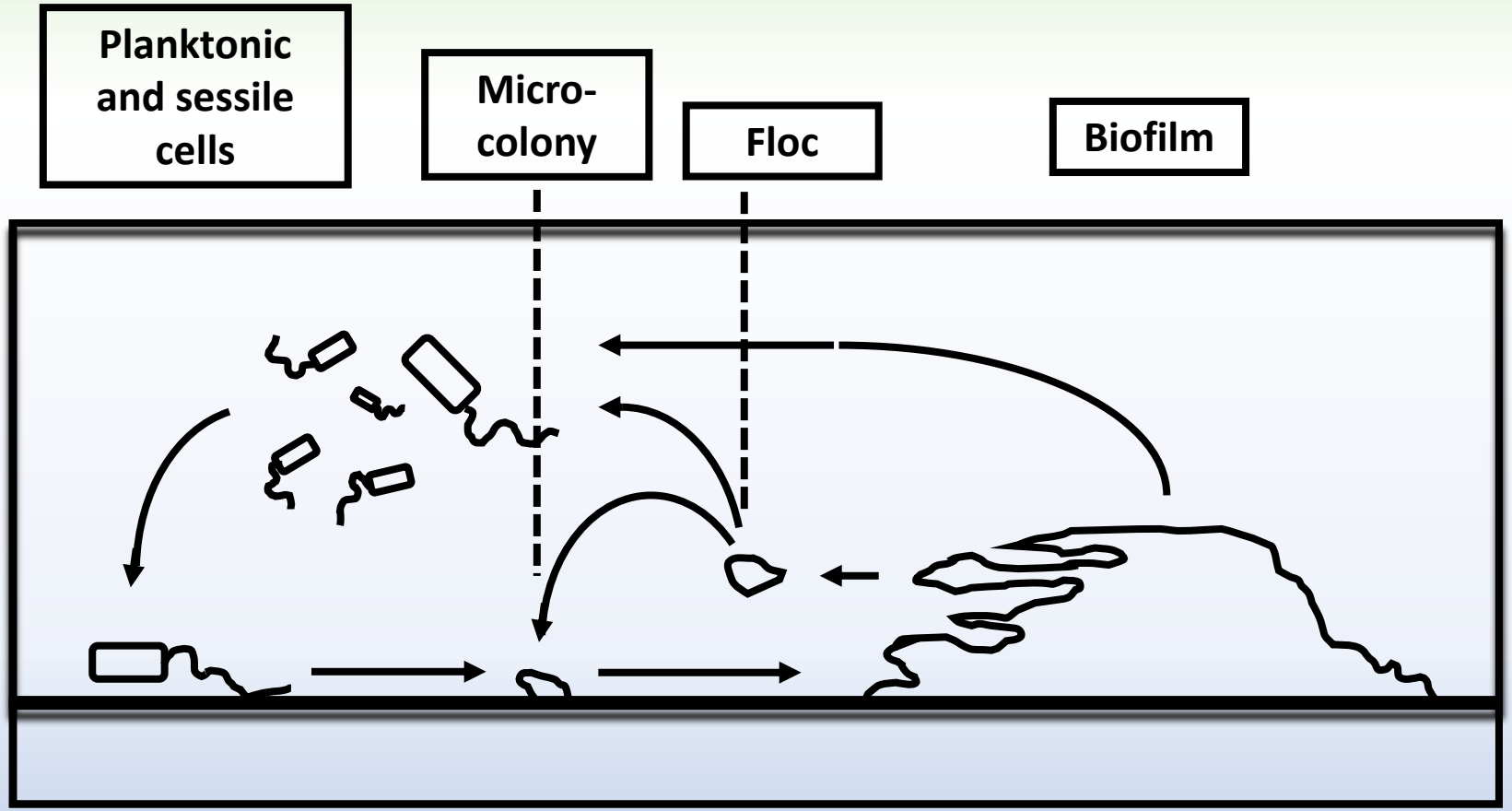
Біоплівки надзвичайно розповсюджені у природі

Різноманіття термінів, що описують біоплівки

Abscesses, inclusion bodies and metastasis
Active fluids
Active sludge
Aggregates, blobs, clumps, colloids, lumps and masses
Bacterial plates
Biofilms
Biolaminites, microbialites, stratifera and stromatolites
Clusters
Collapsed cakes
Communities and consortia
Crusts, dust particulates and aerosols
Deposits and sediments
Desert varnish
Filamentous structures and zones
Flocs and snow
Floaters
Foams
Granules
Jellies and zooglea (or zoogloea)
Laminae
Mats
Meniscus growth
Microcenosis, microbial cenosis
Micro-zones and pelogens
Pellicles
Phlegm balls
Plaque
Rafts
Remains and remnants
Sediments
Slimes, glycocalyx and мiscous liquids
Snottites and snoticles
Swarms

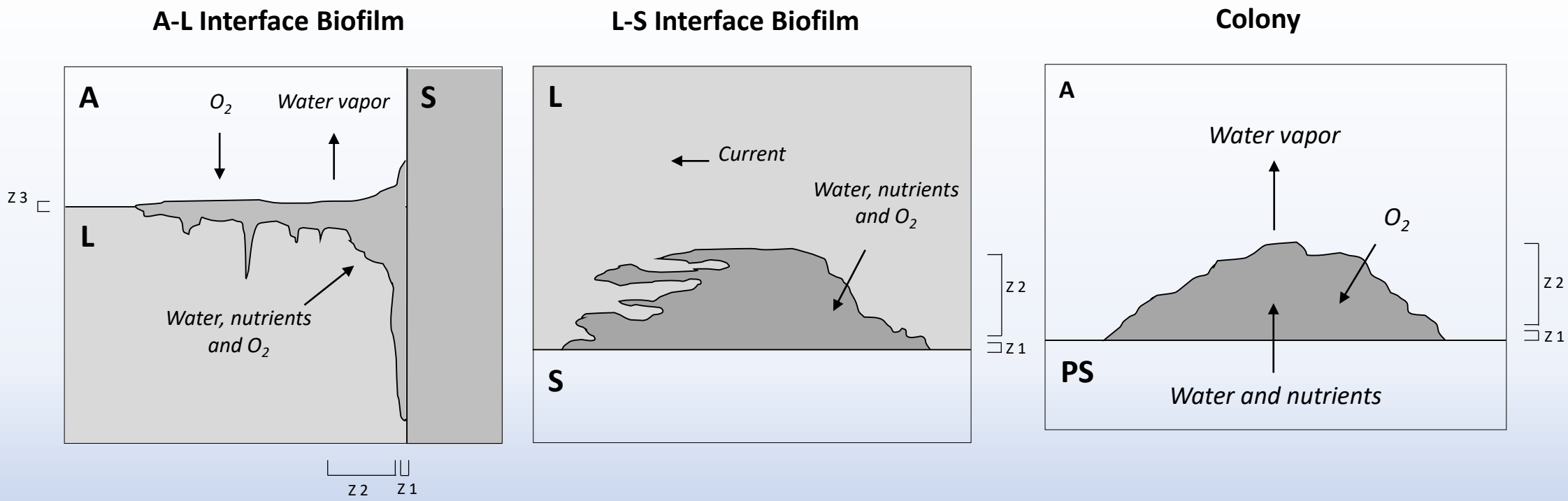
Біоплівки (прикріплені) і вільноіснуючі (планктонні) бактерії представляють собою два альтернативні стани бактерії

Кожна бактерія в кожний момент часу існує або у вигляді окремої клітини із рухливістю, яка вільно існує та активно або пасивно переміщається, або у прикріпленій формі у вигліді надклітинного угруповання – біоплівки.

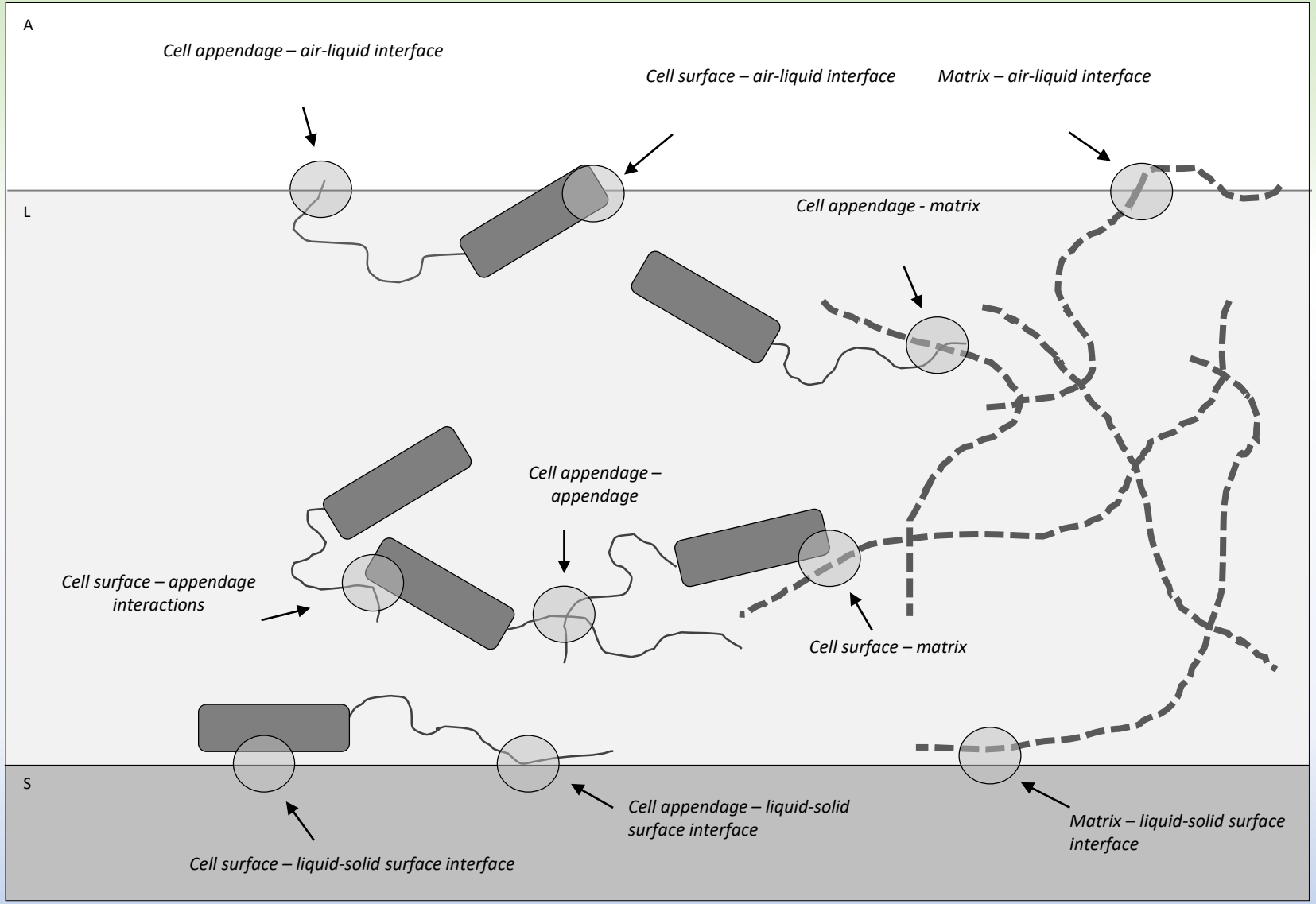


Агрегати бактерій: біоплівка vs колонія

Колонії бактерій, що утворюються на твердому поживному середовищі, є штучно формою бактеріальних угруповань, які суттєво відрізняються від природних угруповань - біоплівок.

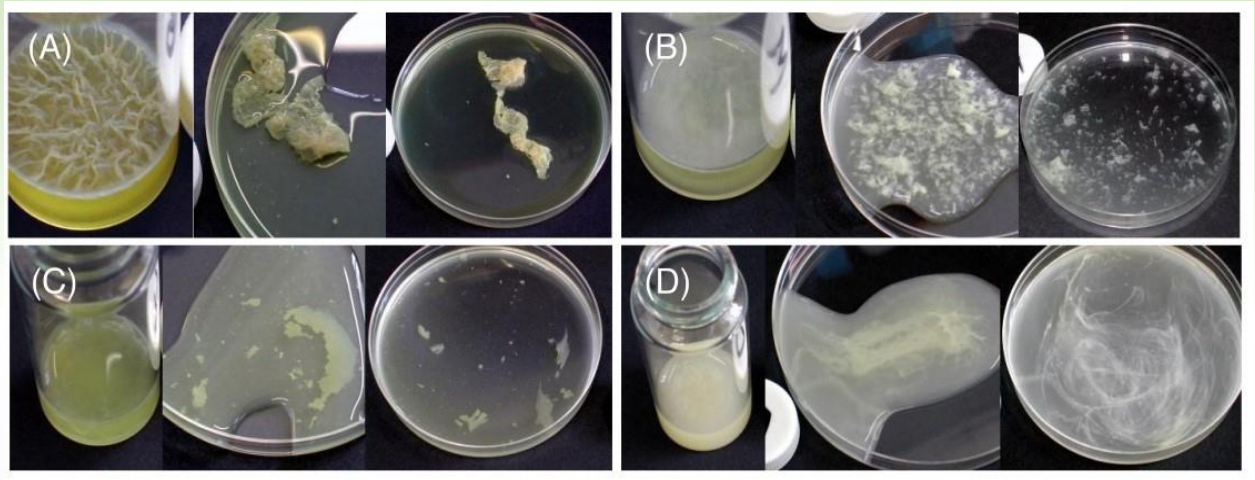


Біоплівки утворюються в різних екологічних нішах та стабілізуються сукупністю взаємодій різних полімерних макромолекул.



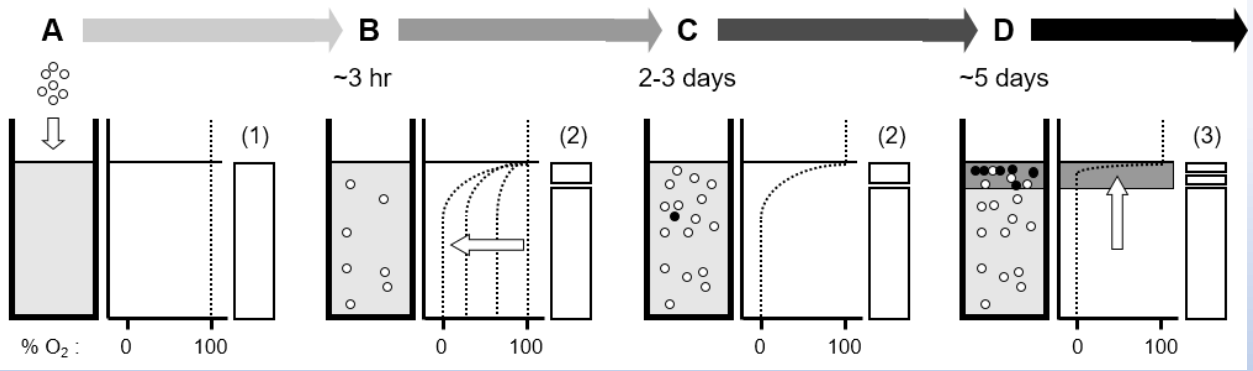
Утворення біоплівки – стратегія формування екологічної ніші бактеріями

Псевдомонади формують декілька типів біоплівок на границі розподілу фаз повітря-рідина (A-L біоплівки).

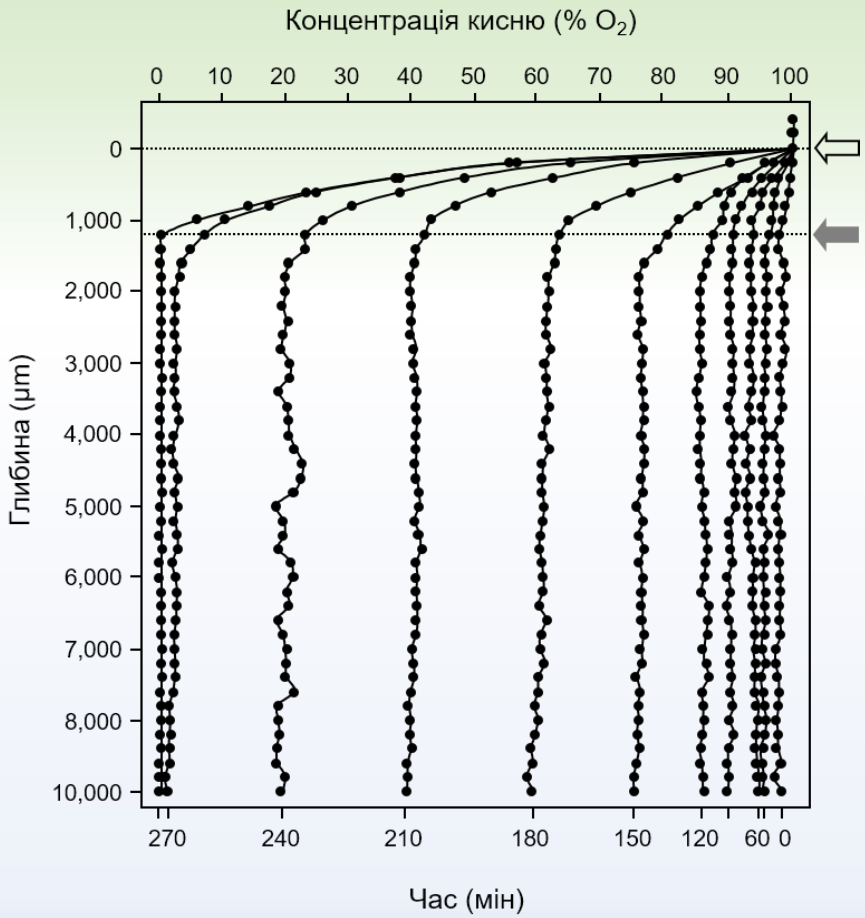


A-L біоплівки, що продукуються псевдомонадами із навколішнього середовища, можуть бути систематизовані у наступний спосіб: **(A)** Physically cohesive (PC), **(B)** Floccular mass (FM), **(C)** Waxy aggregate (WA), and **(D)** Viscous mass (VM).

Колоністи статичних мікрокосмів модифікують початкове середовище і створюють нові ніші для своїх нащадків.



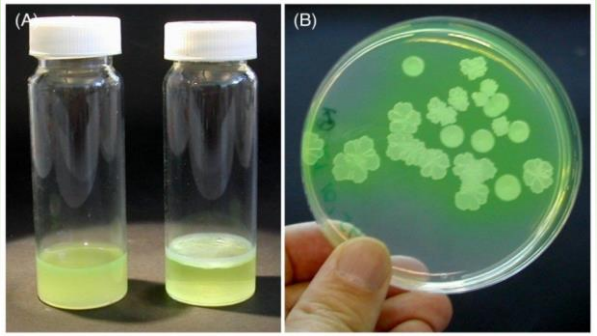
Утворення кисневого градієнту первинними колонізаторами є ключовим етапом утворення A-L біоплівки.



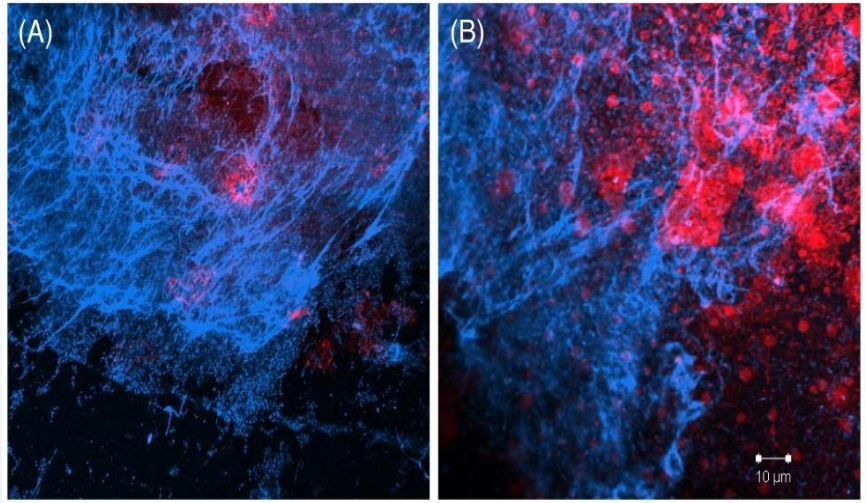
Колоністи SBW25 у статичному мікрокосмі швидко встановили кисневий градієнт.

Целюлоза – важливий компонент матриксу біоплівок *P. fluorescens* SBW25

***P. fluorescens* SBW25 є типовою ризосферною псевдомонадою, яка здатна формувати два типа AL біоплівок: VM (дикий тип) та WS (суперпродуцент целюлози)**

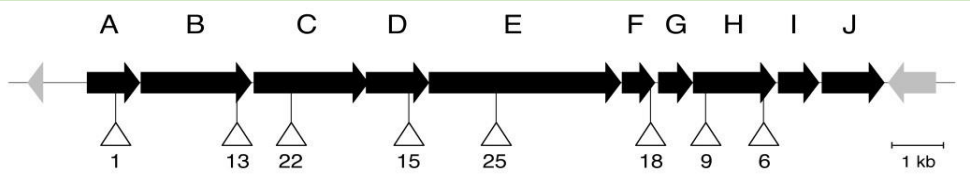


Типові A-L біоплівки двох штамів *P. fluorescens* SBW25, зокрема на A: ліворуч – дикий тип, праворуч – похідний WS штам-суперпродуцент целюлози. B: колонії двох штамів у змішаній популяції.

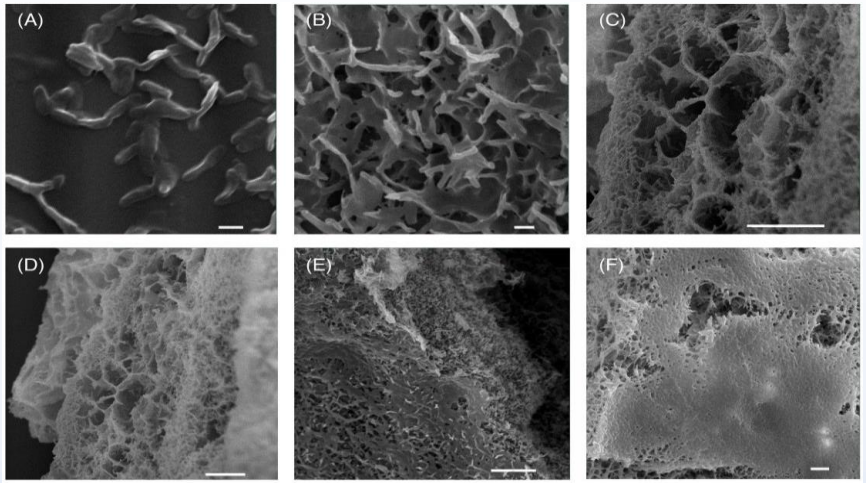


Індукування експресії целюлози c-di-GMP. Підвищення рівня c-di-GMP може викликати експресію целюлози в деяких псевдомонадах. Показані конфокальні лазерні скануючі мікроскопії (CLSM) зображення матеріалу колоній з (A) *Pseudomonas fluorescens* SBW25 та (B) P. *syringae* DC3000, що підвищену активність DGC WspR19, що призводить до підвищення рівеня c-di-GMP, візуалізується за допомогою калькофлуору для целюлози (блакитний) та бромістого етидію для бактерій (червоний).

Структура оперону біосинтезу целюлози у *P. fluorescens* SBW25

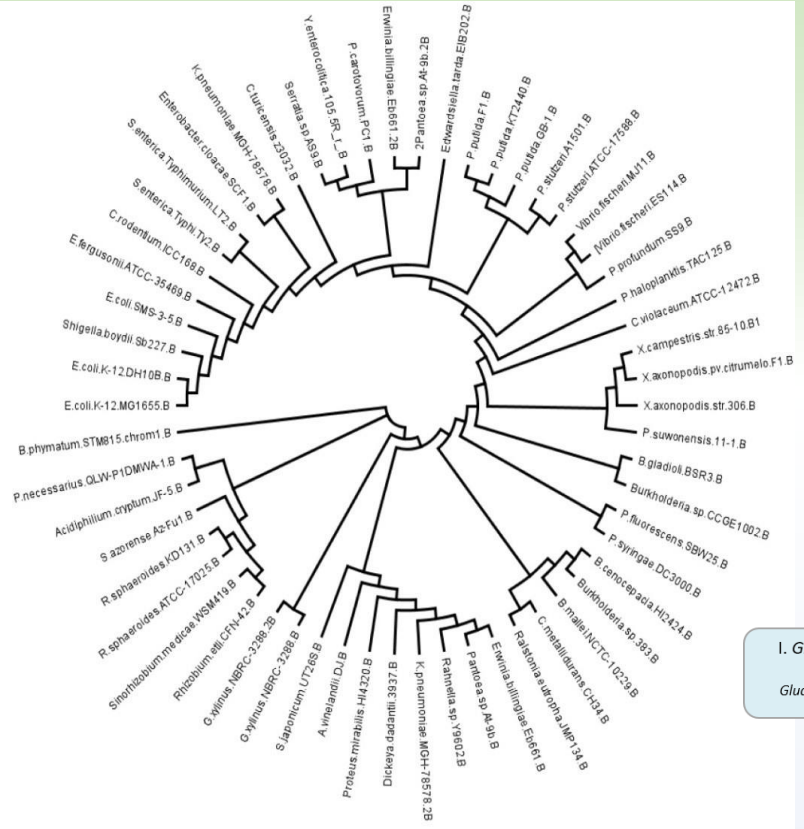


Синтаза целюлози *P. fluorescens* SBW25 кодується *wss* опероном (*wssA-J*, чорні стрілки). Основна синтаза складається з субодиниць WssBCDE і пов'язаної з цим ацетилюючої активності, що виробляється WssFGHI. WssA та WssJ можуть бути залучені до правильної клітинної локалізації комплексу Wss, хоча WssJ є функціонально надмірною. Вказуються місця ключових вставки міні-Tn5 транспонзону (відкриті трикутники). Мутанти WS-1, 13, 22, 15 і 25 не здатні експресувати целюлозу. Мутанти WS-18, 9 і 6 експресують неацетильовану целюлозу. Вгору від оперону *wss* знаходиться tRNAThr, а нижче за течією гіпотетичний білок невідомої функції (сірі стрілки). Шкала масштабу: 1 кб.

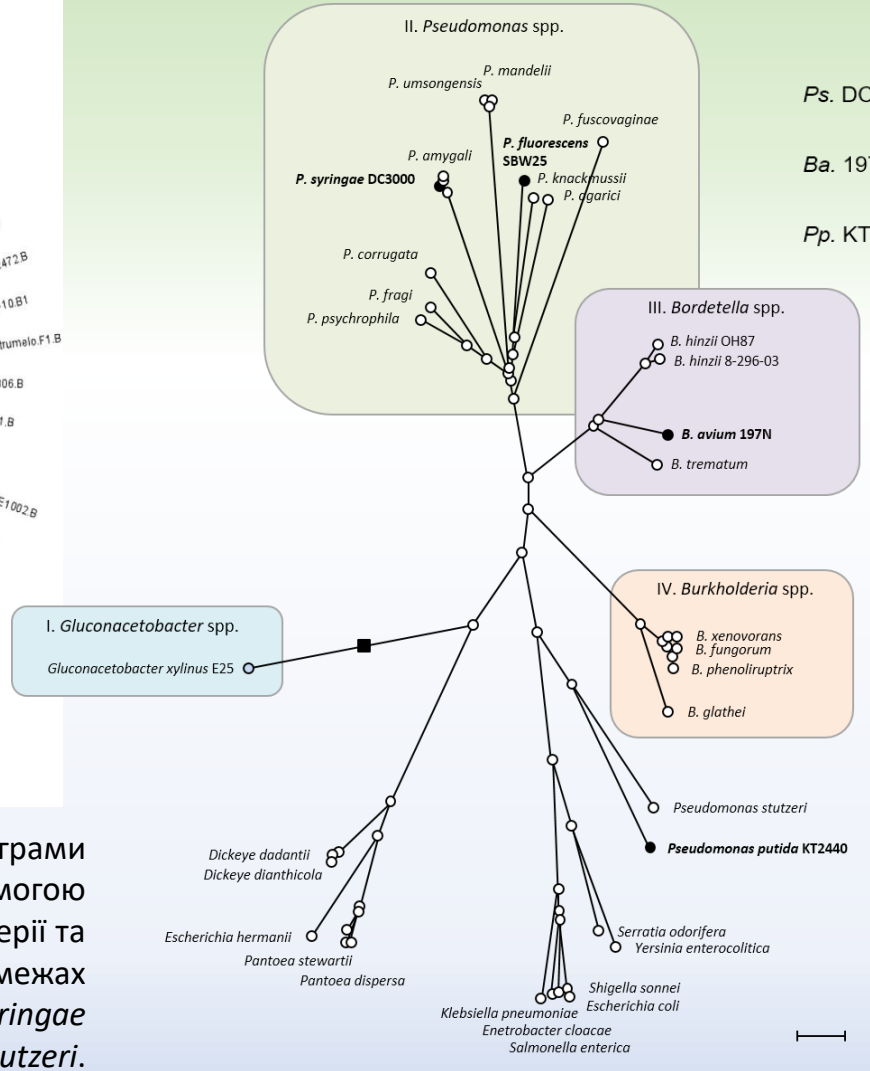


Ультраструктура біоплівки WS. Скануючі зображення електронної мікроскопії (SEM) біоплівки Wrinkly Spreader (WS) свідчать про пористу, але міцну структуру. Тут показано серію SEM-зображень зменшення збільшення - від (A) одиничних клітин до (F) великих фрагментів біоплівки. Зображення були отримані після ліофілізації та затінення золотом. Масштабні риски: A&B, 1µm; C - F, 10 мкм.

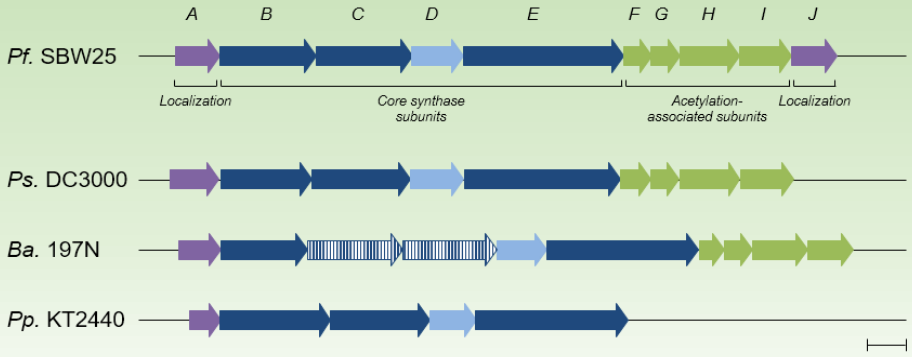
Оперон продукції целюлози є поширеним серед бактерії



Кладограма гомологів WssB. Структура кладограми WssB схожа на структуру, побудовану за допомогою послідовностей рРНК 16s, при цьому кишкові бактерії та псевдомонади утворюють два чіткі кластери. У межах псевдомонад комплекс *P. fluorescens-syringae* розходився раніше, ніж група *P. putida-stutzeri*. Кладограма була побудована з використанням стандартних параметрів Geneious 5.5.5 (Biomatters Ltd, NZ) після багаторазового вирівнювання послідовностей 58 WssB білків ClustalW 2.0.



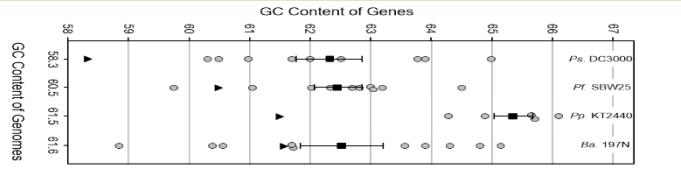
Філогенетичні аналізи репрезентативних гомологів WssB.



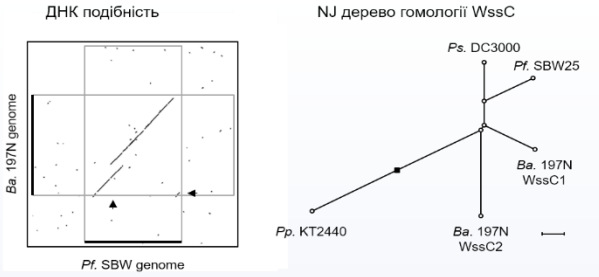
Бактеріальні целюлозні оперони. Оперони Bcs були ідентифіковані в цілих геномних послідовностях широкого спектру бактерій. В *P.fluorescens* SBW25 гени анотуються як wssA - J і, де утворюють основний комплекс синтази целюлози (темно-синій), включаючи ендоглюканазу (світло-блакитний), асоційовані субодиниці ацетилювання (зелений), і беруть участь у локалізації комплексу в периплазмі мембрани (лиловий) (верхній відділ). Показані також оперони *P. putida* KT2440, *P. syringy*, DC3000 і *Bordetella avium* 197N, який також містить дублювання усіченої версії wssC (сині смуги). Шкала шкали вказує на 1 кб.

Целюлоза – екзополімер біоплівок у бордетел та псевдомонад

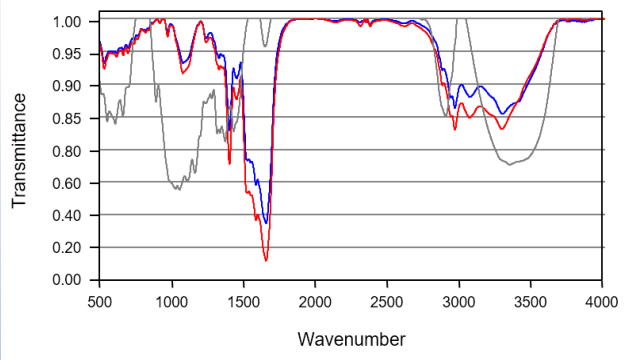
Порівняння вмісту GC у генах *bcs* в окремих представниках *Proteobacteria*.



Порівняльний аналіз ДНК-подібності та гомологів WssC генів.

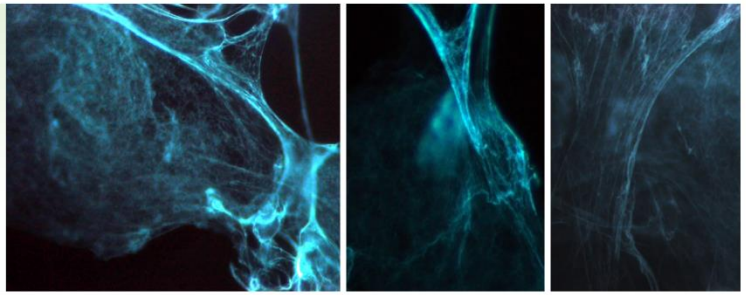


FTIR спектроскопія екстракту позаклітинного матриксу *B. avium* 197N (червоний сигнал) та *B. avium* 197N CD-мутанта, дефіцитного за продукцією целюлози (синій сигнал).



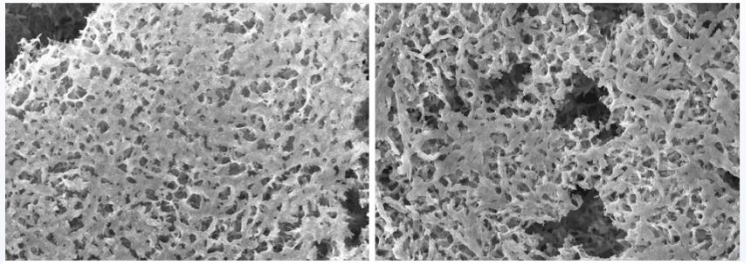
Целюлоза, що синтезується *B. avium* 197N, не є важливою для утворення біоплівки.

Флуорисцентна мікроскопія



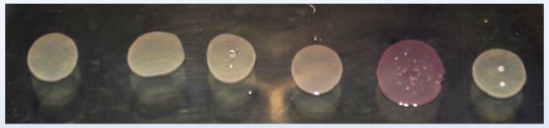
40x

Скануюча електронна мікроскопія



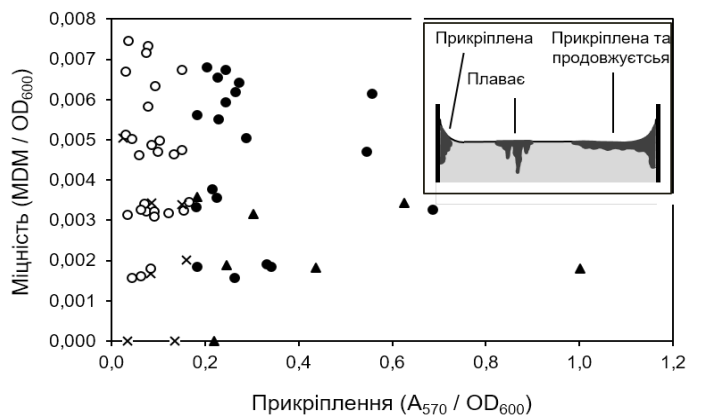
Ba. 197N CD mutant 500x

Агар з конго ред

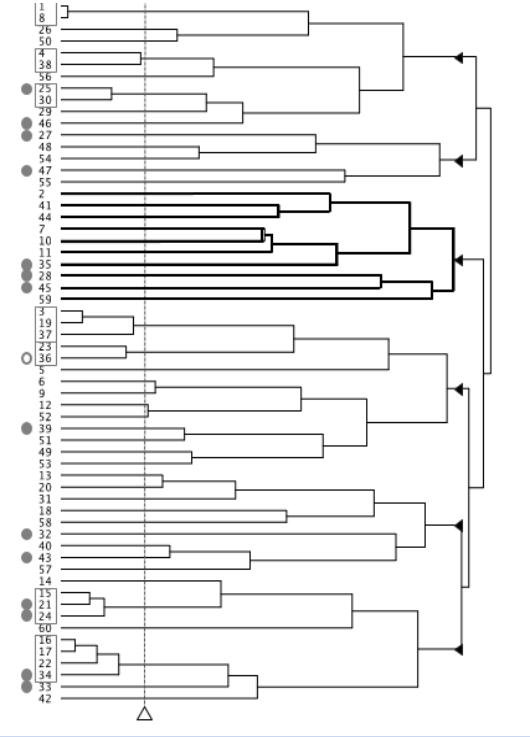


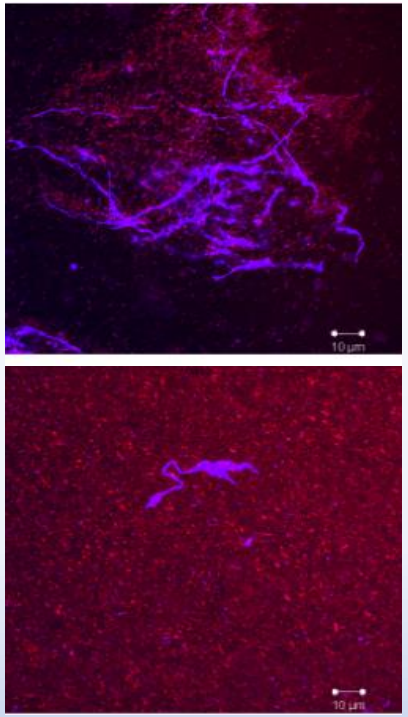
Ba. 197N pVSP61 WspR9 WspR12 WspR19 CD

Роль целюлози у виживанні та колонізації харчовими патогенами роду *Pseudomonas*.



Штами колекції SVP (від spoilt venison pseudomonad, псевдомонади-харчові патогени) продукують різні біоплівки за міцністю та прикріпленням.

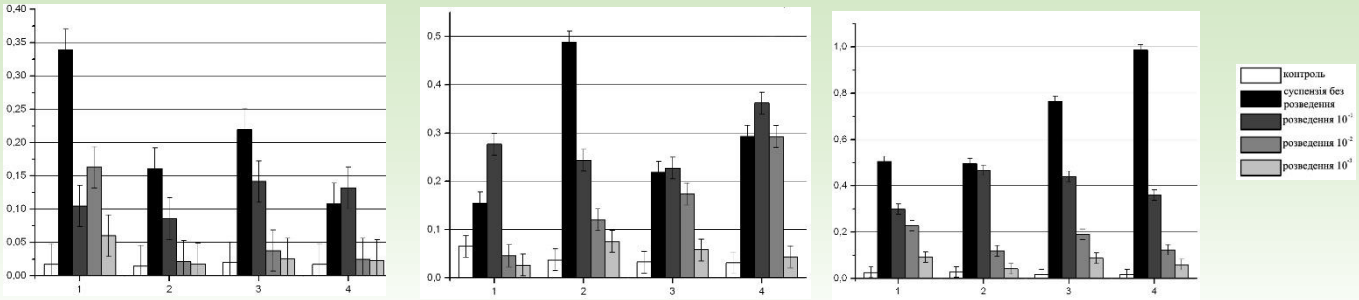




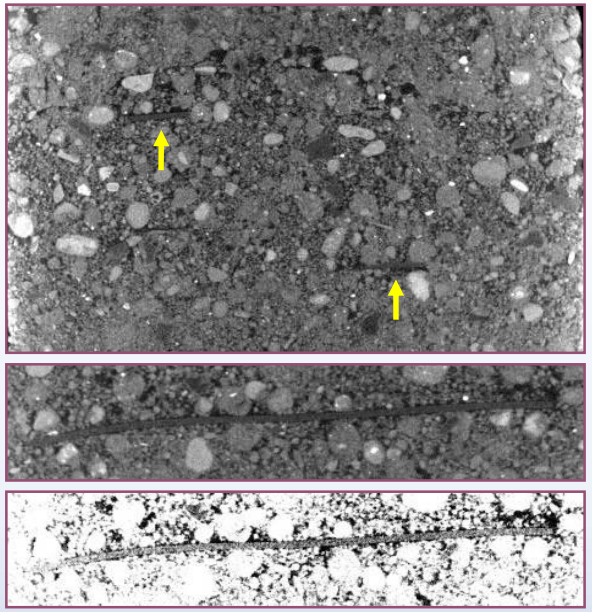
Фенотипове різноманіття штамів колекції SVP (ліворуч) і вироблення целюлози ізолятами SVP (праворуч).

Метод плівок обрастання для дослідження мікроценозів на рівні мікроніші

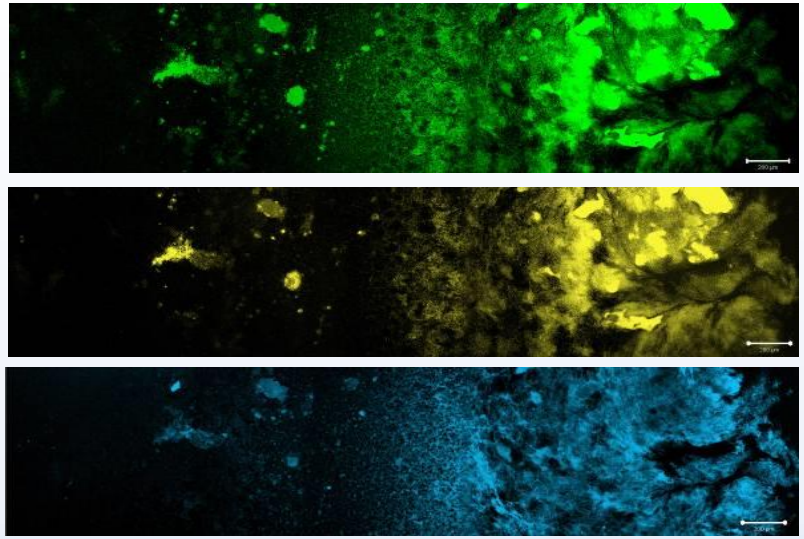
Прикріплення і відкріплення бактерій від ПЕТ плівок.



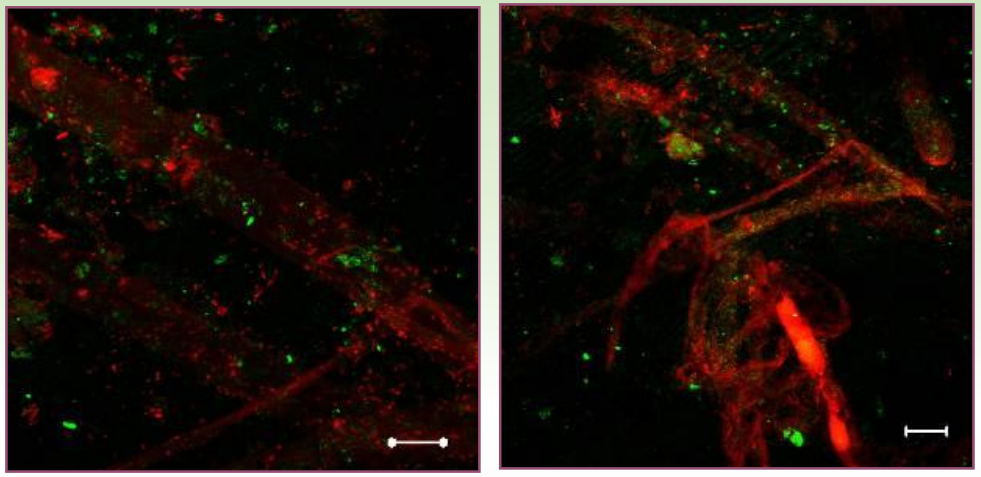
Прикріплення клітин *P. putida* KT2440, ресуспендованих у натрій-фосфатному буфері (ліворуч), культуральній рідині (всередині), свіжому середовищі КВ (праворуч) до поверхні ПЕТ плівки.



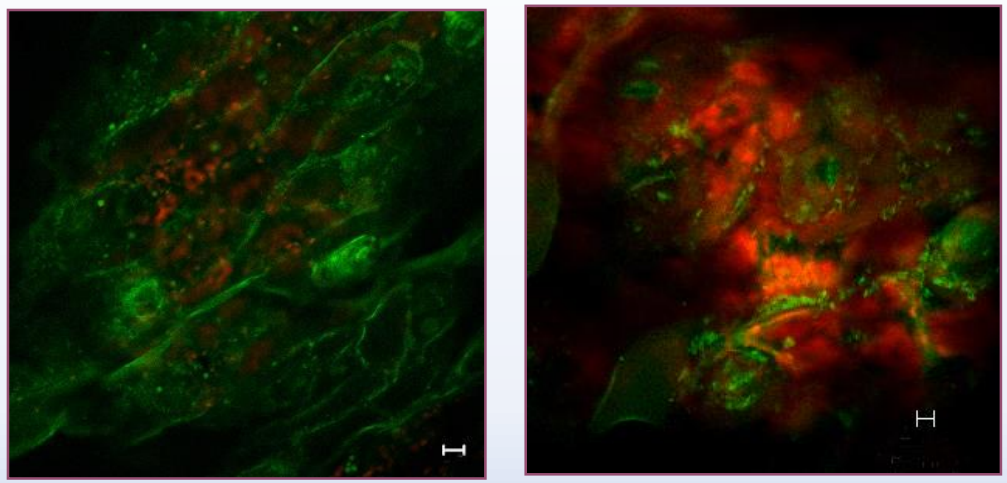
Рентгенівська мікрофокусна комп'ютерна томографія зрізу ґрунту. Показані сагітальні зрізи ґрунтової системи, яка містить дві короткі (А) і одну довгу (Б) ПЕТ плівки



Панорамне зображення біоплівки *P. fluorescens* SBW25 WS-GFP, сформованої в умовах статичного культивування у рідкому поживному середовищі. Візуалізація GFP сигналу (зелений), забарвлення білків тіазіновим редом (жовтий) і забарвлення целюлозного матриксу калькофлуором (синій), КЛСМ. Масштаб: 200 мкм.



Колонізація ризосфери ріпаку (мікроценози сформовані на ПЕТ плівках). КЛСМ. Масштаб: 10 мкм.



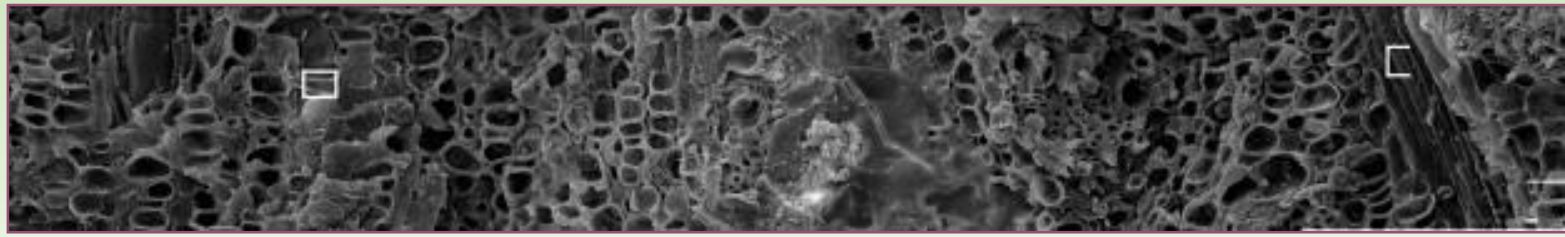
Колонізація філосфери ріпаку бактерією *P.fluorescens* SBW25-GFP у нестерильних умовах. Листкова поверхня тритижневої рослини. КЛСМ. Масштаб: 5 мкм.

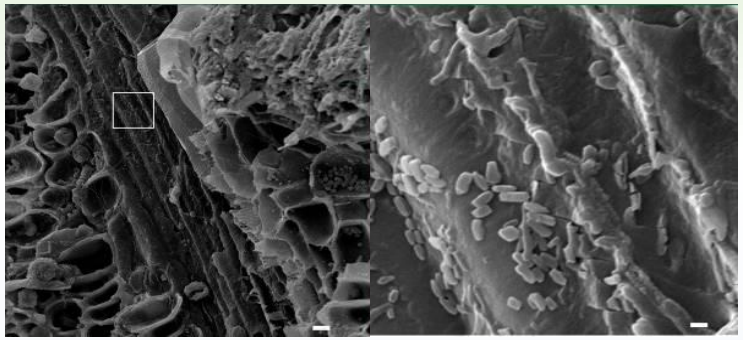
Ендосфера бамбуку як еконіша для бактерій

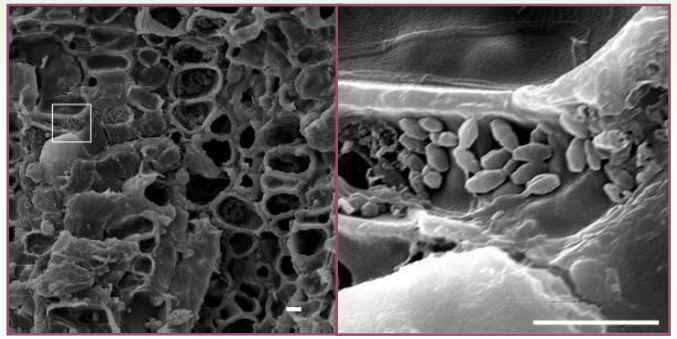
Ідентифіковані культивовані і некультивовані Ендофітні бактерії бамбуків *P. atrovaginata, P. nigra* і *P. humilis*

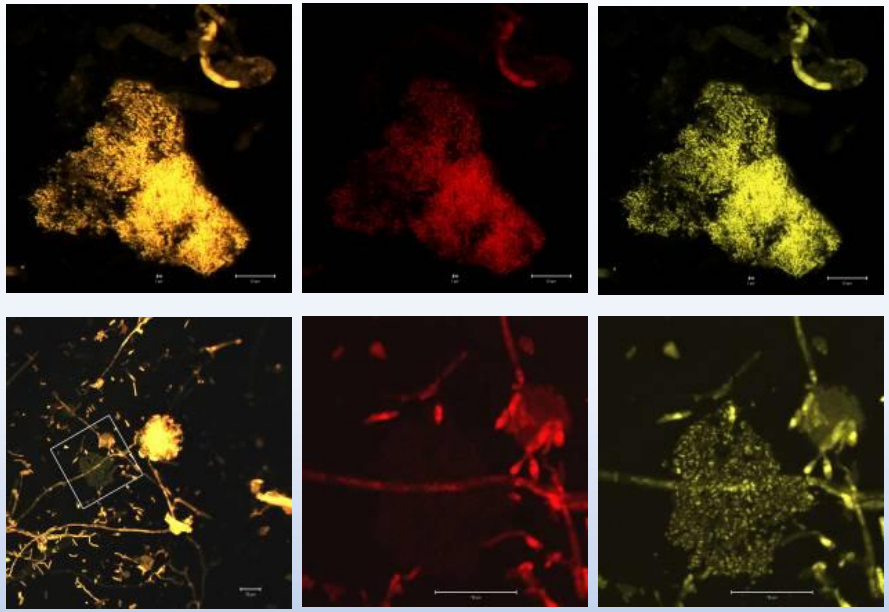
Частина	Філогенетична група	Рід	Вид	Вид бамбуку
Стебло	Firmicutes	*Bacillus*	*B.amyloliquefaciens*	*P. humilis* *F. rufa*
			B. subtilis	
			B.mojavensis	*P. humilis*
	Actinobacteria	*Mycobacterium*	*M. palustre*	*P. atrovaginata*
			M.lentiflavum	
			M. avium complex	*P. nigra*
			M. arosiense	
	Некультивовані бактерії			*P. humilis*
Коріння, кореневища	Alphaproteo-bacteria	*Agrobacterium /Rhi-zobium*	sp.	*P. humilis*
	Betaproteo-bacteria	*Burkholderia*	sp.	
			B. cepacia complex	
	Gammaproteo-bacteria	*Pseudomonas*	*P. fuscovaginae*	
			P. fluorescens	
	Firmicuts	*Paenibacillus*	sp.	
			P. chondroitinus	
	Actinobacteria	*Microbacterium*	*M.laevaniformans*	
		Leifsonia	sp.	

Панорамний зріз і мікроколонія ендофітів бамбуку







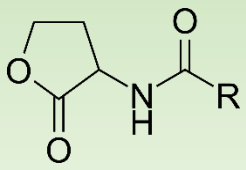


Ендофітні угруповання верхньої частини стебла бамбуку, сформовані на ПЕТ плівці. Забарвлення нуклеїнових кислот етидіум бромідом (ліворуч, посередині) і білків тіазіновим редом (ліворуч, праворуч), КЛСМ. Масштаб: 10 мкм

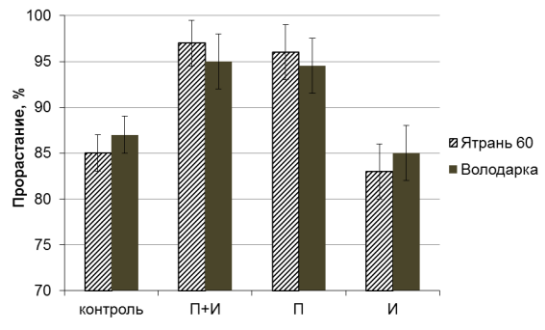
Бактеріальні сигнальні молекули як джерело нових стимуляторів росту рослин

N-ацилгомосерінлактони (АГЛ) – бактеріальні сигнальні молекули.

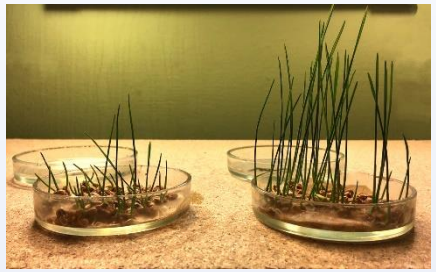
АГЛ - регулятори відносяться до класу молекул медіаторів бактеріального походження, задіяних в дистанційній трансдукції сигналів між бактеріями-колонізаторами фітосфери, що утворюють біоплівки, і безпосередньо між бактеріями і рослиною



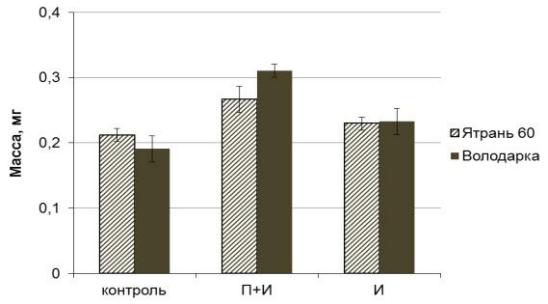
N-гексаноїлгомосеринлактон (ГГЛ) було використано для праймування насіння пшениці.



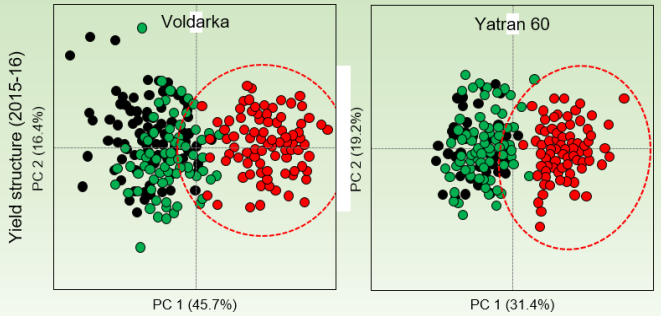
Схожість насіння *Triticum aestivum* L. сортів Ятрань 60 і Володарка (24 год). К - контроль (не праймірованние ГГЛ насіння), П + И - праймування ГГЛ в поєднанні з иінкрустацією; П - праймування; И -інкрустація.

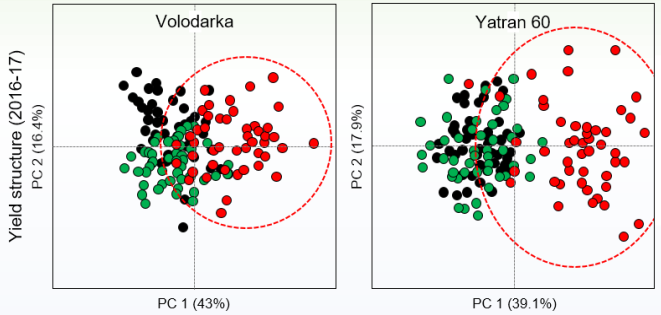


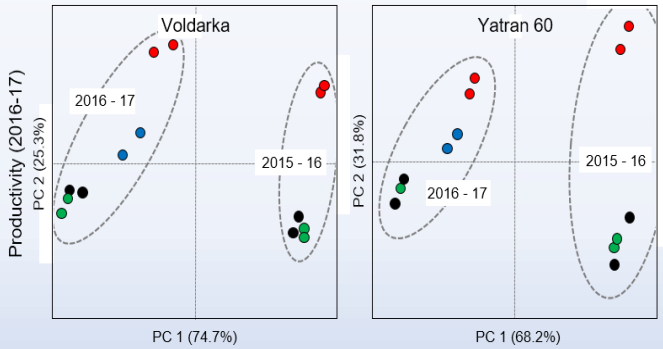
Схожість насіння *Triticum aestivum* L. сортів Ятрань 60 (72 год). Контроль (не праймірованние ГГЛ насіння) – ліворуч, праймуванне насіння – праворуч.



Суха біомаса (мг) двомісячних рослин *Triticum aestivum* L. сортів Ятрань 60, Володарка. К - контроль (непраймірованние ГГЛ насіння), П + І - праймування ГГЛ в поєднанні з інкрустацією; І – інкрустація.







Вплив обробки насіння ГГЛ на структуру врожаю озимої пшениці (по всій висоті рослин, кущистість, довжина колоса та кількість колосків, зернівок у колосі та масі зерна на рослину) можна уявити за допомогою аналізу основних компонентів (PCA) за 2015 - 2016 та 2016 – 2017 вегетаційні періоди. Рослини вирощували з інкрустованих та праймованих (червоний та пунктирний овал), інкрустованих (зелений) чи необроблених (чорний) насіння. Ваги осей однакові для кожного біплота, і кумулятивна процентна коваріація показана для обох головних осей

Ефекти на насіннєве праймування ГГЛ передаються наступному поколінню. Аналіз основних компонентів (PCA) продуктивності врожаю озимої пшениці (загальна надземна біомаса, біомаса соломи та зернова маса) дозволяє диференціювати рослини, вирощені з насіння F1, отримані від праймованих та інкрустованих та праймованих рослин у 2015 - 2016 роках та посіяних у 2016 - 2017 (зелений колір) від рослин, вирощених з інкрустованих та праймованих (червоний колір), інкрустованих (зелений колір) або необроблених (чорний колір) насіння. У цих аналізах виявляється сильний річний ефект також для обох сортів пшениці (вказується штриховими овалами). Ваги осей однакові для кожного біплота, і кумулятивна процентна коваріація показана для обох головних осей

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.
5. В стаціонарній культурі *P. fluorescens* SBW25 раптово з'являється суперпродуцент целюлози WS, який конструює сильну біоплівку, що домінує в стаціонарних умовах культивування.
6. *P. fluorescens* SBW25 WS є зручною моделлю для ілюстрації еволюції у педагогічній практиці.
7. Метод плівок обростання – зручний спосіб дослідження мікробно-рослинних взаємовідносин *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 N-гексаноїл гомосерин лактон впливає на ріст, розвиток та продуктивність рослин озимої пшениці *T.aestivum* різних сортів української селекції.

Кількість публікацій: 54, в т.ч. 2 закордонні монографії, 19 статей (7 – у англомовних журналах з імпакт-фактором), 31 теза доповідей. Загальна кількість посилань на публікації авторів/h-індекс роботи згідно баз даних складає відповідно: Web of Science – 69/5; Scopus – 78/5; Google Scholar –182/7. Отримано два патенти України на винахід. Загальний IF журналів, де опубліковані праці, дорівнює 19,172.