

... МІКРОБІОЛОГІЯ ... MICROBIOLOGY ...

УДК: 631.46:579.64:574.34:574.38

Особливості колонізації фітосфери проростків пшениці інтродукованими штамми *Escherichia coli***О.О. Авксентьєва, О.І. Віннікова, В.В. Жмурко**

В роботі представлені результати дослідження здатності інтродукованих штамів *Escherichia coli* колонізувати різні ніші фітосфери – ризосферу, ендосферу та філосферу проростків озимої м'якої пшениці сорту Мерсія та впливати на ростову реакцію рослин за цих умов. Матеріалом дослідження служили ATCC 8739 та клінічний штам *E. coli*, а також ізолят, виділений з ґрунту агроценозу під пшеницею. Вегетаційні досліди проводили у факторостатній камері кафедри фізіології та біохімії рослин і мікроорганізмів ХНУ ім. В.Н.Каразіна. Дослідні рослини інокулювали суспензіями штамів та ґрунтового ізоляту *E. coli*, проводячи полив у вегетаційні посудини, де вирощували проростки протягом 10 діб. Паралельно методом послідовних змивів проводили аналіз динаміки чисельності КУО *E. coli* в ризо-, ендо- та філосфері проростків. Після завершення експерименту аналізували ростову реакцію за показниками лінійного росту та інтегральним показником ростових і біосинтетичних процесів – накопиченням біомаси. Результати експериментів показали, що за інокуляції ATCC 8739 та клінічним штамом *E. coli* знижується схожість насіння пшениці та гальмується ростова реакція. Інокуляція ґрунтовым ізолятом *E. coli* практично не впливає на схожість насіння, лінійний ріст та накопичення біомаси проростками пшениці сорту Мерсія. Встановлено, що чисельність бактерій *E. coli* у фітосфері рослин пшениці залежить від інокульованого штаму та різниться у різних частинах фітосфери проростків. Максимальну кількість КУО *E. coli* у фітосфері виявлено за інокуляції рослин клінічним штамом, втричі меншу – за впливу ґрунтового ізоляту, майже в 6 разів меншу – за інокуляції стандартним штамом. Виявлені розбіжності за ступенем колонізації різних частин фітосфери при інокуляції дослідних проростків різними штамми та ґрунтовым ізолятом *E. coli*: у контрольному варіанті та за впливу ATCC 8739 розподіл між ризо- та ендосферою приблизно однаковий, за дії клінічного штаму – переважно колонізується ендосфера рослин, за інокуляції ґрунтовым ізолятом – ризосфера. У філосфері дослідних проростків в незначній кількості виявлено клітини виключно клінічного штаму, що свідчить про його підвищені адгезивні властивості. Обговорюються рослинно-мікробні взаємовідносини та здатність умовно-патогенних бактерій *E. coli* колонізувати різні сфери рослинного організму та використовувати проростки пшениці як альтернативного хазяїна.

Ключові слова: ATCC 8739, клінічний штам, ґрунтовий ізолят *E. coli*, *Triticum aestivum* L., ростова реакція, колонізація фітосфери, ризосфера, ендосфера, філосфера.

Про авторів:

О.О. Авксентьєва – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

О.І. Віннікова – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

В.В. Жмурко – Харківський національний університет імені В.Н.Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, Україна, 61022, zhmurko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3898-3087>

Вступ

Відомо, що рослина, як і будь-який багатоклітинний організм, представляє собою екологічну нішу (фітосферу) для існування різноманітних мікроорганізмів (Мошинець, Косаківська, 2010а). Ця екологічна ніша – фітосфера – є неоднорідною та складається з різних зон: ризосфера – найбільш чисельна та продуктивна, ендосфера, або гітосфера, переважно представлена асоціативними мікроорганізмами, та дуже екстремальна для мікроорганізмів – філосфера (Мошинець, Косаківська, 2010а). Рослинно-мікробні взаємовідносини є дуже складними. Мікроорганізми, що асоційовані з рослиною, можуть бути корисними, патогенними або нейтральними. Дослідження взаємовідносин рослин та мікроорганізмів переважно спрямовані на вивчення ролі мутуалістичних та фітопатогенних взаємодій. Нейтральні мікроорганізми, як правило, досліджують як потенційні фітопатогени – умовно-патогенні для рослинного організму або як потенційно корисні мікроорганізми – представники бактерій групи PGPR (Мошинець, Косаківська, 2010б; Соловьева, Алещенкова, 2018). Однак в останні роки показано, що рослини можуть виступати як джерело умовно-патогенної або патогенної мікрофлори для людини, бути альтернативним господарем або

переносником до людського організму (Алексеев, 2010; Маркова, Турская, 2012; Hofmann et al., 2014; Holden et al., 2009).

Як відомо, шлях сільськогосподарської продукції від поля до споживача може мати декілька точок дотику з патогенними чи умовно-патогенними бактеріями, і актуальним завданням сучасності є мінімізація даних контактів з метою зниження ризику інфікування організму людини (Hofmann et al., 2014; Eibenbergera et al., 2018; Jo, Park, 2019).

На сьогодні в Україні та багатьох інших країнах працюють програми органічного землеробства (Органічне виробництво..., 2013). В рамках виробництва екологічно чистої «органічної» сільськогосподарської продукції використовуються органічні добрива, до складу яких можуть входити бактерії кишкової групи, а за умов отримання таких добрив від хворої худоби чи забруднених харчових відходів у них можуть міститися й патогенні штами різних видів ентеробактерій (Murphy et al., 2016; Eibenbergera et al., 2018; Jo, Park, 2019; Jechalke et al., 2019). Окрім того, значної популярності набуває вживання в їжу термічно не обробленого мікрогрину. Він являє собою молоді рослини різних сільськогосподарських культур, у тому числі й злаків (Рибалка, 2011; Riggio et al., 2019). Модельними експериментами було показано, що за умов обробки простерилізованого насіння патогенними штамми бактерій з подальшим вирощуванням мікрогрину в неґрунтовій культурі відбувається потрапляння цих бактерій всередину тканин проростків (Liu et al., 2018; Wright, Holden, 2018).

Щорічно у світі реєструється близько мільярда діарейних захворювань, при цьому більшість з них викликано умовно-патогенними бактеріями з родини Enterobacteriaceae (Поздеев, Федоров, 2007). Особливо небезпечним стає потрапляння патогенних ентеробактерій до рослинних тканин, а також їхня здатність до полігостальності та горизонтального перенесення генів (Іванова и др., 2013; Liu et al., 2018; Frank et al., 2017; Jo, Park, 2019). Однією з причин епідеміологічних негараздів, які пов'язані з умовно-патогенними мікроорганізмами, є їхня висока екологічна пластичність. Здатність бактерій колонізувати філоплану чи корені рослин регулюється багатьма як бактеріальними, так і рослинними факторами (Jechalke et al., 2019; Merget et al., 2019; Moune et al., 2020). Також встановлено, що існує висока адаптаційна здатність ентеробактерій до різних температур (Merget et al., 2019). Перехід до сапротрофного способу існування за умов зниження температури до позначок, які відповідають температурі навколишнього середовища, дозволяють таким бактеріям виживати в ґрунті та вступати у взаємовідносини з рослинами та іншою біотою. Окрім того, деяким ентеробактеріям властива здатність синтезувати целюлази та пектинази – ферменти, що каталізують реакції руйнування рослинних клітинних стінок, і саме з цим пов'язують здатність бактерій потрапляти всередину рослин та колонізувати її тканини (Karmakar et al., 2018). Таким чином, перебування бактерій-патогенів людини в рослинному організмі може бути частиною циклу їх циркуляції у зовнішньому середовищі, і в цьому випадку рослина використовується бактеріями як альтернативний хазяїн чи переносник до людського організму.

Нині вже встановлені вагомі механізми колонізації мікроорганізмами рослинного організму та взаємодії з ним бактерій, які позитивно впливають на ріст і розвиток рослини, сприяють процесу мінерального живлення, захисту від патогенів та ін. (Мошинець, Косаківська, 2010б). Однак все ще недостатньо вивчені взаємодії рослини з патогенними та умовно-патогенними для людини мікроорганізмами. Дослідження у цьому напрямку актуальні для запобігання можливого проникнення патогенів до організму людини з рослинною їжею, що може призвести до поширення різноманітних захворювань. Крім того, поглиблення досліджень взаємодії рослина-мікроорганізм необхідне для розуміння біологічної природи співіснування мікроорганізмів з рослинами, як вагомого компонента функціонування біосфери.

У літературі накопичена певна кількість інформації щодо колонізації різними патогенними бактеріями різноманітних сільськогосподарських рослин, переважно овочевих та плодкових культур (Karmakar et al., 2018; Liu et al., 2018; Wright, Holden, 2018). Однак недостатньо вивчені закономірності колонізації різними штамми рослин пшениці, головної продовольчої культури України.

Отже, метою роботи було дослідження здатності інтродукованих штамів *Escherichia coli* колонізувати ніші фітосфери (ризосфери, ендосфери та філосфери) проростків пшениці та впливати на їх ростову реакцію.

Матеріал і методи дослідження

Біологічний матеріал. У роботі використовували типовий (ATCC 8739) та клінічний штами *E. coli*, отримані з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології, вірусології та імунології

Харківського національного медичного університету, а також ізолят *E. coli*, виділений з ґрунту агроценозу під пшеницею дослідної ділянки кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна (розташована на території університетського Ботанічного саду, м. Харків). Бактерії культивували на середовищі МПБ в термостаті за температури +36°C. Як рослинний матеріал використовували озиму м'яку пшеницю *Triticum aestivum* L. сорту Мерсія з колекції кафедри фізіології і біохімії рослин та мікроорганізмів ХНУ імені В.Н.Каразіна.

Дизайн досліджень. Простерилізовані у спиртовому розчині та відмиті стерильною дистильованою водою зерна пшениці висівали у стерильні вегетаційні ємності з простерилізованим (автоклавуванням за температури +121°C протягом 1 год.) ґрунтом по 15–20 насінин на посуд. Рослини вирощували у факторостатній камері за температури +22°C/+18°C (день/ніч), 16-годинному фотоперіоді та освітленні 15–20 клк. На 7-му добу аналізували схожість насіння (ДСТУ 3768: 2019). Протягом 10 діб, починаючи з проростання насіння, на поверхню ґрунту вносили по 10 мл добової водної суспензії різних штамів та ґрунтового ізоляту бактерій *E. coli*, кількість клітин встановлювали за фотоелектроколориметричним методом (Практикум..., 2005), і вона складала 1×10^6 клітин/мл середовища. Як контроль використовували проростки, у ґрунт під якими вносили по 10 мл стерильної дистильованої води. В ході експерименту, за необхідності, ґрунт зволожували однаковою кількістю стерильної водогінної води. Після появи сходів щодоби аналізували фітосферу проростків на вміст бактерій *E. coli*. Методом послідовних змивів готували суспензії для визначення наявності бактерій на поверхні коренів і листків пшениці (Практикум..., 2005). Для визначення наявності бактерій в ендосфері (гітосфері) рослин, наважки рослинного матеріалу попередньо гомогенізували в стерильній ступці, а потім, шляхом послідовного відмивання у стерильній дистильованій воді, готували суспензії для визначення кількості бактерій. Чашки Петрі із диференційним середовищем Ешбі культивували в термостаті за температури +36°C. Підрахунок колоній *E. coli* здійснювали на третю добу (Практикум..., 2005). Заселеність різних ніш фітосфери виражали як КУО $\times 10^6$ /мг рослинної маси. Визначали динаміку КУО *E. coli* у фітосфері, яка може відображувати різну здатність штамів колонізувати певний елемент фітосфери – листки, корені та гітосферу. За цими показниками судили про взаємодію того чи іншого штаму з рослинним організмом. На 17-ту добу експерименту аналізували ростову реакцію проростків, проводячи вимірювання їх біомаси і показників лінійного росту – загальну довжину проростків, довжину надземної частини та коренів, аналізуючи в кожному варіанті не менш ніж 10–15 проростків.

Статистичний аналіз. Досліди проводили в трьох біологічних повторностях. В таблицях і на графіках наведені середні значення та стандартні відхилення. Статистичний аналіз отриманих результатів виконували стандартними методами варіаційної статистики (Лакин, 1990) за допомогою вбудованої опції програмного пакету Microsoft Excel™. При цьому значення залежної перемінної (вихідні значення \log КУО) піддавали двом логарифмуванням: спіль з перетворенням проміжного від'ємного результату на протилежне позитивне число, а значення асимптоти встановлювали емпірично з максимальним середнім значенням \log КУО, яке спостерігали у даній серії дослідів. Регресійний аналіз росту колоній здійснювали за різновидом функції Гомпертца:

$$Y = A \times e^{-e^{-(b+cx)t}}$$

де Y – досліджуваний ефект (\log КУО), t – час після проростання насіння, A – верхня асимптота, e – основа натурального логарифму, b і c – параметри росту, причому b встановлює зміщення за шкалою часу (затримку стартової фази росту), а c втілює швидкість росту (Шмидт, 1984).

Результати та обговорення

Одним з інтегральних показників, які можуть свідчити про взаємодію бактерій з рослинним організмом, може бути зміна у ростових процесах. З цієї точки зору доцільним було з'ясування впливу штамів кишкової палички на ростову реакцію пшениці.

Відомо, що схожість насіння визначає здатність рослини швидко формувати проросток і подальший нормальний хід росту і розвитку. Тому нами проведено її визначення за впливу різних штамів *E. coli*. Одержані результати показали (табл. 1), що дія суспензій досліджуваних штамів та ґрунтового ізоляту кишкової палички викликала прояв стійкої тенденції до зниження схожості насіння пшениці сорту Мерсія. Аналіз отриманих даних показав, що найбільш істотним зниження схожості було за дії клінічного штаму, менший негативний ефект проявив штам ATCC 8739, а

найменший – ізолят з ґрунту. На нашу думку, це може бути пов'язаним з відмінностями досліджуваних штамів та ґрунтового ізоляту за здатністю або ж проникати у зернівку (чи зародок), або ж заселяти насіння у процесі проростання (Liu et al., 2018; Wright, Holden, 2018). Вірогідно, що в результаті цього відбувається використання бактеріями метаболітів зернівки у якості трофічних факторів, що може негативно впливати на процес проростання. Не виключено, що бактерії, які проникають до зернівки, продукують речовини, що здатні порушувати або гальмувати у ній метаболічні процеси, від інтенсивності яких залежить схожість насіння.

Вагомим показником ростової реакції на дію різноманітних чинників довкілля може бути лінійний ріст, який визначається збільшенням довжини того чи іншого органу рослини. Нами було проведено визначення довжини цілої рослини, надземної частини та коренів за впливу інокуляції ґрунту *E. coli*. Результати показали (табл. 1), що лінійний ріст рослини, її надземної частини і коренів залежав від дії мікроорганізмів, які належали до різних штамів *E. coli*. Найбільше пригнічення лінійного росту цілої рослини виявлено за дії клінічного штаму, дещо менше – при дії штаму АТСС 8739, а мікроорганізми ґрунтового ізоляту істотно не впливали на лінійний ріст цілої рослини. Така ж закономірність у зміні лінійного росту за дії штамів виявлена і для надземної частини рослин.

Ріст коренів за дії штаму АТСС 8739 і ґрунтового ізоляту практично не змінювався і навіть проявлялася незначна тенденція до його стимуляції. Клінічний штам, навпаки, істотно гальмував ріст коренів рослини (табл. 1). Отже, проявлялася залежність лінійного росту рослини від різних штамів мікроорганізмів та ґрунтового ізоляту, а також певна специфічність їх ефектів на ріст надземної частини та коренів.

Накопичення біомаси рослиною є результатом біосинтетичних процесів, яке інтегрально відображає процеси морфогенезу за різних умов довкілля та дії тих чи інших факторів. Виходячи з цього, ми вивчали вплив бактерій різних штамів кишкової палички та ґрунтового ізоляту на накопичення біомаси рослиною. Результати показали (табл. 1), що найменшою була маса рослини за дії клінічного штаму, дещо більшою вона була за дії штаму АТСС 8739, порівняно до маси в контролі, а дія ґрунтового ізоляту на формування біомаси рослиною не проявлялася, про що свідчать однакові показники у дослідному і контрольному варіанті (табл. 1). Таким чином, проявлялася специфіка у дії досліджуваних штамів та ґрунтового ізоляту на біосинтетичні процеси рослин пшениці сорту Мерсія.

Таблиця 1.

Схожість насіння і ростова реакція проростків пшениці сорту Мерсія за інокуляції ґрунту суспензією різних штамів *Escherichia coli*

Варіант інокуляції	Схожість, %	Довжина, см			Біомаса рослини, мг
		Рослина	Надземна частина	Корені	
Стерильна вода (контроль)	98, 2±1,0	17,6±0,9	11,5±0,6	6,1±0,3	301±15
<i>E. coli</i> АТСС 8739	96,5±1,0*	16,5±0,8*	10,3±0,5*	6,2±0,3	252±13*
<i>E. coli</i> клінічний	94,2±1,0*	15,4±0,8*	9,8±0,5*	5,6±0,2*	225±12*
<i>E. coli</i> , ґрунтовий ізолят	97,1±1,0	17,2±0,9	10,9±0,6	6,3±0,4	292±14

Примітка * – відмінності з контролем істотні при $P \leq 0,05$.

На нашу думку, гальмування лінійного росту і накопичення біомаси цілою рослиною та її надземною частиною, які відбувалися за дії АТСС 8739 і клінічного штаму, можуть бути пов'язані зі змінами у перебігу фізіолого-біохімічних процесів у рослині, які можуть проявлятися за взаємодії з цими штамми. Відомо, що кишкова паличка за певних умов здатна синтезувати фактори патогенності – токсини, гемолізени, сидерофори (Іванова и др., 2013; Eibenbergera et al., 2018). Ці процеси можуть викликати перехід рослини у стан адаптації до несприятливого чинника, який, зокрема, характеризується посиленням процесів використання пластичного та енергетичного матеріалу рослини на забезпечення такого стану, що зменшує використання цього матеріалу на ростові та біосинтетичні процеси. Вірогідно також, що при проникненні мікроорганізму у гістосферу рослини чи при поверхневій колонізації її органів у результаті використання мікроорганізмом ендо-

та екзометаболітів рослини як трофічних факторів відбуваються зміни у фізіолого-біохімічних процесах рослини. Тобто зміна середовища (умов існування) мікроорганізму «забезпечується» зміною процесів життєдіяльності рослинного організму. Вірогідно, що саме такі зміни можуть негативно впливати на перебіг метаболічних процесів, унаслідок чого можуть гальмуватися лінійний ріст та біосинтетичні процеси у рослин (Мошенець, Косаківська, 2010б).

Той факт, що ґрунтовий ізолят кишкової палички практично не впливав на лінійний ріст та накопичення біомаси рослинами пшениці, на нашу думку, пояснюється наступним. Вірогідно, що мікроорганізми ґрунтового ізоляту найбільш пристосовані до взаємодії з рослиною саме в ризосфері та ризоплані. Відомо, що такі мікроорганізми здатні продукувати низку біологічно активних речовин, сприяти посиленню процесів мінерального живлення рослиною, що, в кінцевому рахунку, сприяє росту і розвитку рослин (Мошинець, Косаківська, 2010б).

Отже, досліджувані штами кишкової палички по-різному впливали на ростові процеси пшениці. Вірогідно, що це може бути пов'язане, зокрема з різною кількістю бактерій, які заселяють різні частини фітосфери, що може викликати різні ефекти на ростові процеси, за рахунок різної інтенсивності використання мікроорганізмами ендометаболітів рослини на забезпечення життєдіяльності (Мошинець, Косаківська, 2010б).

Визначення чисельності бактерій, які заселяли фітосферу пшениці, ми провели на останній (17-тий) день досліді. Результати показали (табл. 2), що чисельність бактерій істотно залежить від досліджуваного штаму і різниться у різних частинах рослини.

Таблиця 2.

Чисельність бактерій *E. coli* у фітосфері проростків пшениці сорту Мерсія в залежності від інтродукованого штаму, КУО × 10⁶/мг рослинної маси

Варіант інокуляції	Чисельність <i>E. coli</i> у фітосфері проростків, КУО, 10 ⁶ /мг рослинної маси*			
	Ризоплана	Ендосфера (гісто-)	Фітосфера	Фітосфера
Стерильна вода (контроль)	16±0,8	25±1,3	не виявлено	41±2,05
<i>E. coli</i> ATCC 8739	42±2,1	50±2,5	не виявлено	92±4,08
<i>E. coli</i> клінічний	133±6,7**	475±23,8	3±0,1	611±30,55
<i>E. coli</i> ґрунтовий ізолят	150±8,1**	66±3,3	не виявлено	216±10,13

Примітки: * – відмінності з контролем та між варіантами істотні при $P \leq 0,001$; ** – відмінності між варіантами не істотні.

Так, у фітосфері (цілій рослині) у контрольному варіанті, у якому ґрунт під рослинами зволожували стерильною дистильованою водою, встановлена наявність бактерій. Хоча вона була найменшою, порівняно до кількості в інших варіантах, все ж це дає підставу вважати, що *E. coli* здатна заселяти рослину, незалежно від штучної інокуляції. Тобто, ці бактерії здатні існувати в рослинному організмі у природних умовах, що підтверджується літературними даними (Алексеевко, 2010; Маркова, Турская, 2012).

Аналіз чисельності бактерій різних штамів у фітосфері проростків (цілій рослині) показав, що найменша їх кількість була характерна для штаму ATCC 8739, удвічі більшою була кількість бактерій ґрунтового ізоляту, а найбільшою – у понад 6 разів більше – кількість бактерій клінічного штаму, порівняно до кількості бактерій інших штамів (табл. 2).

Чисельність бактерій досліджуваних штамів по частинах фітосфери розподілялась наступним чином. У ризоплані найбільшою була кількість бактерій ґрунтового ізоляту, дещо менше було бактерій клінічного штаму, а найменшою була кількість бактерій штаму ATCC 8739 (табл. 2). Найбільша чисельність бактерій ґрунтового ізоляту у ризоплані пов'язана з тим, що вони найбільшою мірою пристосовані до життєдіяльності у ризосфері, бо здатні використовувати для цього різноманітні кореневі екзометаболіти (Мошинець, Косаківська, 2010а, б). Вірогідно, що значна кількість, хоча й дещо менша, бактерій клінічного штаму у цій сфері рослини пов'язана з достатньо високою адгезивною здатністю його бактерій (Хахимова и др., 2017; Иванова и др., 2013; Eibenbergera et al., 2018). Вірогідно, що штам ATCC 8739 найменш пристосований до

життєдіяльності у кореневій зоні рослин, порівняно до ґрунтового ізоляту та клінічного штаму, чим і пояснюється найменша заселеність ним ризоплани.

До ендосфери бактерії проникають в рослину переважно через кореневий кортекс, інфікують судинну систему і утворюють ендofітні популяції в корені, стеблi, листках та інших органах (Мошинець, Косаківська, 2010а). У наших дослідях визначення чисельності бактерій у ендосфері показало, що вона розподілялася по-іншому, ніж у ризоплані. Так, найбільша їх кількість виявлена для клінічного штаму – у 7 та майже у 10 разів більше, ніж бактерій ґрунтового ізоляту та штаму АТСС 8739 відповідно (табл. 2). Вірогідно, що клінічний штам, порівняно до інших, проникає найбільшою мірою до ендосфери за рахунок здатності синтезувати целюлози та пектинази, які руйнують клітинну стінку (Іванова и др., 2013). Щодо наявності бактерій у філосфері, яка включає поверхню надземної частини проростків, то у ній виявлені тільки бактерії клінічного штаму у дуже незначній кількості (табл. 2). Цей факт, на нашу думку може бути пов'язаний з тим, що клінічний штам, порівняно з іншими, володіє підвищеною адгезивністю та інвазивністю (Іванова и др., 2013).

Ми також провели вивчення динаміки кількості бактерій досліджуваних штамів у різних частинах фітосфери проростків (рис. 1). Результати показали, що кількість мікроорганізмів штаму АТСС 8739 у ендосфері та ризоплані зростає протягом всього досліду (рис. 1А). При цьому вона в окремі дати визначення була або більшою, або меншою у ендосфері, порівняно до кількості у ризоплані. Визначення динаміки кількості бактерій клінічного штаму (рис. 1Б) показало, що протягом усього досліду найшвидше вона зростає у ендосфері, порівняно до швидкості цього процесу у ризоплані. Найповільніше відбувається зростання кількості бактерій клінічного штаму у філосфері.

Динаміка наростання кількості бактерій ґрунтового ізоляту характеризувалася більш інтенсивним її збільшенням у ризоплані, ніж у ендосфері (рис. 1В). Загалом криві росту кількості бактерій кишкової палички у різних частинах фітосфери мають подібний характер. При цьому вони відображують специфічність штамів та ґрунтового ізоляту за швидкістю колонізації бактеріями різних частин фітосфери. Аналіз кривих росту бактерій у фітосфері пшениці (рис. 1) та параметрів рівнянь регресії (табл. 3) показали, що за умов розвитку *E. coli* на поверхні коренів проростків, найшвидший ріст числа КУО був у варіанті досліду з використанням суспензії ізоляту, а найдовша затримка росту відбувалася при використанні клінічного штаму. Для ендосфери проростків пшениці було встановлено однакову для усіх варіантів досліду затримку початкової фази росту бактерій, а швидкість росту бактерій знижувалася в порядку варіантів «ізолят – клінічний – АТСС».

Таблиця 3.

Порівняння параметрів росту log КУО різних штамів та ізоляту *Escherichia coli*

Локалізація бактерій	Штам, ізолят	Параметри функції росту	
		b, затримка стартової фази	c, швидкість росту
Філософера	<i>E. coli</i> АТСС 8739	не визначався	не визначався
	<i>E. coli</i> клінічний	1,219	-0,475
	<i>E. coli</i> ґрунтовий ізолят	не визначався	не визначався
Ризоплана	<i>E. coli</i> АТСС 8739	1,058	-0,544
	<i>E. coli</i> клінічний	1,560	-0,394
	<i>E. coli</i> ґрунтовий ізолят	0,539	-0,331
Ендосфера	<i>E. coli</i> АТСС 8739	1,032	-0,590
	<i>E. coli</i> клінічний	1,003	-0,465
	<i>E. coli</i> ґрунтовий ізолят	1,074	-0,369

Спираючись на отримані результати за чисельністю бактерій, ми розрахували частку (ступінь) колонізації бактеріями окремих частин рослин пшениці залежно від їх штаму відносно чисельності у цілій рослині (рис. 2).

Результати показали, що ступінь заселеності бактеріями фітосфери проростків пшениці сорту Мерсія залежить від штаму *E. coli* та різниться залежно від того, яку частину проростка заселяють бактерії.

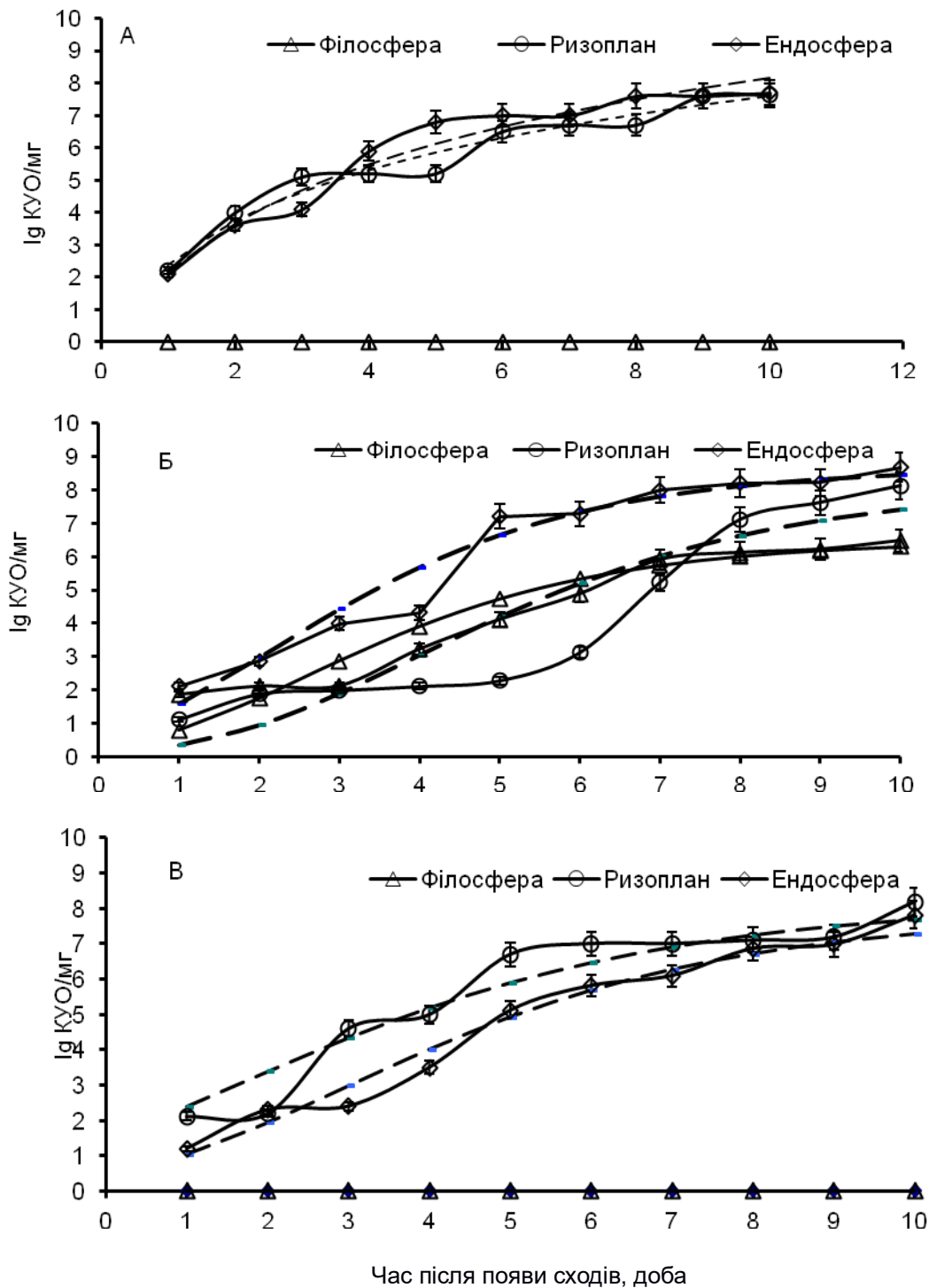


Рис. 1. Динаміка кількості бактерій *Escherichia coli* (lg КУО) у фітосфері рослин пшениці сорту Мерсія (А – штам ATCC 8739, Б – клінічний штам, В – ґрунтовий ізолят)

Порівняння різних частин фітосфери проростків пшениці за ступенем колонізації бактеріями кишкової палички показало (рис. 2), що у контрольному варіанті частка заселення ризосфери становила близько 40 %, а ендосфери – близько 60 %. Це підтверджує вище висловлене

припущення, що кишкова паличка, і як інші мікроорганізми, здатна достатньо інтенсивно заселювати рослинний організм шляхом ендосфітії насіння (Frank et al., 2017).

Заселеність бактеріями штаму ATCC 8739 ризоплани та ендосфери була співмірною до рівня заселеності цих зон фітосфери у контрольному варіанті.

Рівень заселення бактеріями клінічного штаму ризоплани був найнижчим, а ендосфери – найвищим, порівняно до заселення у контрольному варіанті та у варіанті з використанням штаму ATCC 8739 і ґрунтового ізоляту. Більше того, незначний рівень заселення бактеріями клінічного штаму був встановлений навіть у філосфері – 0,5 %, тобто на поверхні листків, що може свідчити про значну адгезивну здатність бактерій цього штаму кишкової палички.

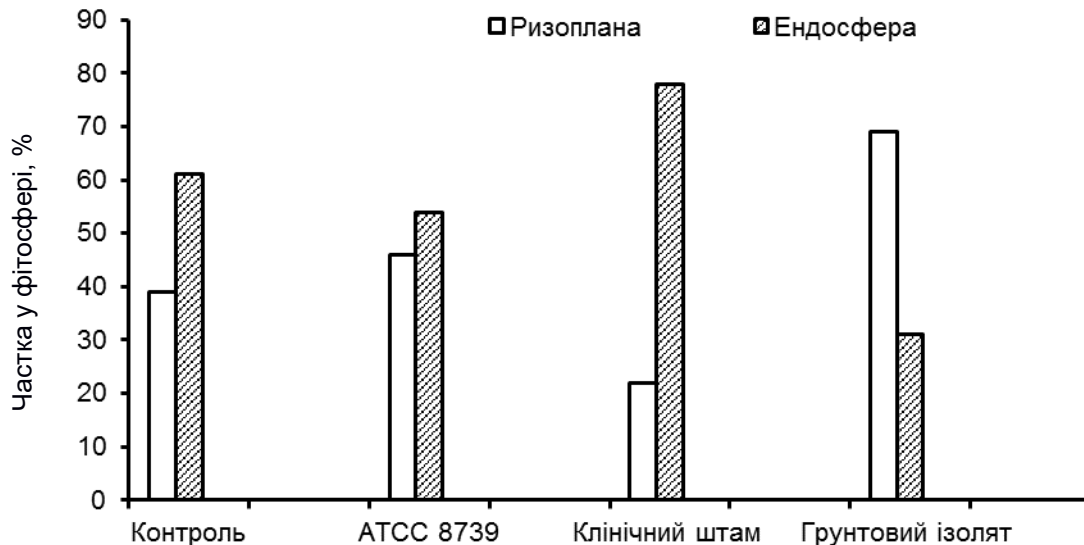


Рис. 2. Ступінь заселеності бактеріями *E. coli* різних частин фітосфери проростків пшениці сорту Мерсія, % від загальної чисельності бактерій у фітосфері

Бактерії ґрунтового ізоляту найбільшою мірою колонізували ризоплану, але найменшою мірою ендосферу, порівняно до рівня заселеності цих частин фітосфери бактеріями інших штамів (рис. 2). Вище було вказано (Мошинець, Косаківська, 2010б), що цей штам серед досліджуваних найбільш пристосований до життєдіяльності саме у кореневій зоні рослин.

Таким чином, визначення чисельності бактерій *E. coli*, а також ступеня заселеності ними фітосфери дає підставу констатувати, що колонізація проростків пшениці залежить від штаму, бактерії яких у різному ступені колонізують певні частини фітосфери.

Узагальнення

Одержані нами результати підтверджують існуючі уявлення про те, що рослина є екологічною нішею для існування мікроорганізмів. Мікроорганізми здатні використовувати рослину або як проміжного хазяїна, або як середовище постійного існування, що є вагомим чинником їх циркуляції у довкіллі.

Мікроорганізми досліджених штамів кишкової палички чинили на рослину як негативний, так і позитивний вплив, що, найбільш вірогідно, пов'язано з їх біологічними особливостями. Про це, за нашими даними, свідчить специфічність впливу різних штамів на схожість насіння, лінійний ріст цілої рослини, надземної частини і коренів та біосинтетичні процеси у проростках пшениці.

Наші дані свідчать, що характер колонізації рослини мікроорганізмами залежить від їх біологічних особливостей, бо досліджувані нами штами та ґрунтовий ізолят з різною інтенсивністю колонізували як фітосферу (рослину в цілому), так і окремі її частини – ризоплану, ендосферу та філосферу. Це вказує на певну пристосованість мікроорганізмів до життєдіяльності у тих мікронішах рослини, які є найбільш сприятливими для їх існування за своїми структурними та функціональними особливостями. Спираючись на специфічність ефектів досліджених штамів на

ростові та біосинтетичні процеси, а також динаміку колонізації їх бактерій у фітосфері, ми припускаємо, що одним з вагомих чинників існування *E. coli* у рослинному організмі може бути взаємодія рослина-мікроорганізм на рівні фізіолого-біохімічних (метаболических) процесів.

Список літератури / References

- Алексеенко А.Л. (2010). Особенности взаимодействия условно-патогенных энтеробактерий с растениями. Автореф. ... канд. биол. наук. Иркутск. 22 с. [Alekseyenko A.L. (2010). *Features of the interaction of opportunistic enterobacteria with plants*. Abstract of the thesis for the Degree of the Candidate of Biological Sciences. Irkutsk. 22 p.]
- Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б. (2013). Выявление генов патогенности, кодирующих способность к токсинообразованию, у штаммов *Escherichia coli*, выделенных из кишечного биотопа детей. *Acta Biomedica Scientifica*, 2(2), 111–114. [Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioyev Y.P., Rakova E.B. (2013). Detection of pathogenicity genes encoding ability to toxigenesis in *Escherichia coli* isolated from the children intestinal biotope. *Acta Biomedica Scientifica*, 2(2), 111–114.]
- Лакин Г.Ф. (1973). Биометрия. М.: Высшая школа. 343 с. [Lakin G.F. (1973). *Biometrics*. Moscow: Vysshaya shkola Publ. 343 p.]
- Маркова Ю.А., Турская А.Л. (2012). Растения как экологическая ниша патогенных для человека бактерий. *Научный журнал Куб АУ*, 84(10), 1–15. [Markova Yu.A., Turskaya A.L. (2012). Plants as an ecological niche of bacteria pathogenic for humans. *Scientific Journal Cube AU*, 84(10), 1–15.]
- Мошинець О.В., Косаківська І.В. (2010а). Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. 1. Структурно-функціональна характеристика ризо-, ендо- та фітосфери. *Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія*, 2, 19–35. [Moshynets O.V., Kosakivska I.V. (2010a). Phytosphere ecology: plant-microbial interactions. 1. Structure-functional characteristic of rhizo-, endo- and phyllosphere. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University: Series Biology*, 2, 19–35.]
- Мошинець О.В., Косаківська І.В. (2010б). Екологія фітосфери: рослинно-мікробні взаємовідносини. 2. Фітосфера як екологічна ніша рослинно-мікробних взаємовідносин. Функціональна активність мікроорганізмів та їхній вплив на рослини. *Вісн. Харк. нац. аграр. ун-ту. Сер. Біологія*, 3, 6–22. [Moshynets O.V., Kosakivska I.V. (2010b). Phytosphere ecology: plant-microbial interactions. 2. Phytosphere as a niche for plant-microbial interactions. Functional microbial activity and its influence on plants. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University: Series Biology*, 3, 6–22.]
- Органічне виробництво і продовольча безпека. (2013). Житомир: Полісся. 492 с. [*Organic production and food safety*. (2013). Zhytomyr: Polissya. 492 p.]
- Поздеев О.К., Федоров Р.В. (2007). Энтеробактерии: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа. 720 с. [Pozdeyev O.K., Fedorov R.V. (2007). *Enterobacteria: a guide for doctors*. Moscow: GEOTAR-Media. 720 p.]
- Практикум по микробиологии (2005). / Под ред. А.И.Нетрусова. М.: Издательский центр «Академия». 602 с. [*Workshop on microbiology* (2005). / Ed. A.I.Netrusov. Moscow: Publishing Center "Academy". 602 p.]
- Рибалка О.І. (2011). Якість пшениці та її поліпшення. К.: Логос. 496 с. [Rybalka O.I. (2011). *Wheat quality and its improvement*. Kyiv: Logos. 496 p.]
- Соловьева Е., Алещенкова З. (2018). Выделение эндофитных фосфатсольюбилизирующих бактерий, колонизирующих внутренние ткани сои и озимой пшеницы. *Žmogaus ir gamtos sauga*, 208–210. [Solovieva E., Aleschenkova Z. (2018). Isolation of endophytic phosphate-solubilizing bacteria that colonize the internal tissues of soy and winter wheat. *Žmogaus ir gamtos sauga*, 208–210.]
- Хакимова Л.Р., Лавина А.М., Сербяева Э.Р. и др. (2017). Роль бактериальных адгезинов и других компонентов клеток на начальных этапах растительно-микробных взаимодействий. *Биомика*, 9(4), 325–339. [Khakimova L.R., Lavina A.M., Serbaeva E.R. et al. (2017). The role of bacterial adhesins and other cell components in the initial stages of plant-microbial interactions. *Biomika*, 9(4), 325–339.]
- Шмидт В.М. (1984). Математические методы в ботанике. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та. 288 с. [Shmidt V.M. (1984). *Mathematical methods in botany*. Leningrad: Publishing house of Leningrad University. 288 p.]
- Eibenbergera K., Moencha D., Drissnerb D. et al. (2018). Adherence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain Sakai influence its uptake into the roots of *Valerianella locusta* grown in soil. *Food Microbiology*, 76, 245–256. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.016>
- Frank A.C., Saldierna Guzmán J.P., Shay J.E. (2017). Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, 5(4), 70. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040070>
- Hofmann A., Fischer D., Hartmann A., Schmid M. (2014). Colonization of plants by human pathogenic bacteria in the course of organic vegetable production. *Frontiers in Microbiology*, 5(191). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00191>

- Holden N., Pritchard L., Toth I. (2009). Colonization outwith the colon: plants as an alternative environmental reservoir for human pathogenic enterobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 689–703. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00153.x>
- Jechalke S., Schierstaedt J., Becker M. et al. (2019). *Salmonella* establishment in agricultural soil and colonization of crop plants depend on soil type and plant species. *Front. Microbiol.*, 10, 967. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00967>
- Jo S.H., Park J.M. (2019). The dark side of organic vegetables: interactions of human enteropathogenic bacteria with plants. *Plant Biotechnology Reports*, 13, 105–110. <https://doi.org/10.1007/s11816-019-00536-1>
- Karmakar K., Nath U., Nataraja K.N., Chakravorty D. (2018). Root mediated uptake of *Salmonella* is different from phyto-pathogen and associated with the colonization of edible organs. *BMC Plant Biology*, 18, 344. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1578-9>
- Liu D., Cui Y., Walcott R., Chena J. (2018). Fate of *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* cells artificially internalized into vegetable seeds during germination. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1), e01888-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01888-17>
- Merget B., Forbes K.J., Brennan F. et al. (2019). Influence of plant species, tissue type, and temperature on the capacity of shiga-toxigenic *Escherichia coli* to colonize, grow, and be internalized by plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(11), e00123-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00123-19>
- Moyne A.-L., Blessington T., Thomas R. et al. (2020). Conditions at the time of inoculation influence survival of attenuated *Escherichia coli* O157:H7 on field-inoculated lettuce. *Food Microbiology*, 85, 103274. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103274>
- Murphy S., Gaffney M.T., Fanning S., Burgess C.M. (2016). Potential for transfer of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Senftenberg from contaminated food waste derived compost and anaerobic digestate liquid to lettuce plants. *Food Microbiology*, 59, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.04.006>
- Riggio G.M., Wang Q., Kniel K.E., Gibson K.E. (2019). Microgreens – a review of food safety considerations along the farm to fork continuum. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.027>
- Wright K.M., Holden N.J. (2018). Quantification and colonization dynamics of *Escherichia coli* O157:H7 inoculation of microgreens species and plant growth substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 273, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.025>

Features of colonization of the phytosphere of wheat seedlings by introduced strains of *Escherichia coli*

O.A. Avksentieva, O.I. Vinnikova, V.V. Zhmurko

The paper presents the results of the study of the ability of introduced *Escherichia coli* strains to colonize different niches of the phytosphere – the rhizosphere, endosphere, and phyllosphere of Mersia winter soft wheat seedlings and to influence the plant growth response under these conditions. The ATCC 8739 and clinical *E. coli* strains were used as the study material, as well as an isolate from the wheat agrocenosis soil. The vegetation experiments were carried out in the factorial chamber of the Department of Plant Physiology and Biochemistry of Plants and Microorganisms of V.N.Karazin Kharkiv National University. The experimental plants were inoculated with suspensions of *E. coli* strains and soil isolate by watering them in vegetation vessels where seedlings were grown for 10 days. In parallel by the method of successive washes, we analyzed the dynamics of the number of *E. coli* CFU in the rhizome, endo- and phyllosphere of seedlings. After completion of the experiment, the growth response was analyzed by linear growth and by the integral index of growth and biosynthetic processes – biomass accumulation. The results of experiments show that inoculation with ATCC 8739 and clinical strains of *E. coli* reduced the germination of wheat seeds and inhibited the growth response. Inoculation with *E. coli* soil isolate has virtually no effect on seed germination, linear growth, and biomass accumulation by Mersia seedlings. It was found that the number of *E. coli* bacteria in the phytosphere of wheat plants depended on the type of inoculated strain and differs in different parts of the seedlings phytosphere. The maximum number of *E. coli* CFU in the phytosphere was detected at the inoculation of plants with the clinical strain, three times less – at exposure to the soil isolate, almost 6 times less – at the inoculation with the standard strain. Differences in the degree of colonization of different parts of the phytosphere were detected at the inoculation of the test seedlings with different strains and soil isolates of *E. coli*: in the control variant and under the influence of ATCC 8739, the distribution between the rhizo- and endosphere is approximately the same. When the plants were inoculated with the clinical strain, endosphere was colonized, when using the soil isolate – the rhizosphere. In the phyllosphere of the experimental seedlings, only cells of the clinical strain were found in a small number, which indicates its increased adhesive properties. Plant-microbial relationships and the ability of conditionally pathogenic *E. coli* bacteria to colonize different areas of the plant organism and to use wheat seedlings as an alternative host are discussed.

Key words: ATCC 8739, clinical strains, soil isolate of *E. coli*, *Triticum aestivum* L., growth response, phytosphere colonization, rhizosphere, endosphere, phyllosphere.

About the authors:

O.A. Avksentieva – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

O.I. Vinnikova – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

V.V. Zhmurko – V.N.Karazin Kharkiv National University, Svobody Sq., 4, Kharkiv, Ukraine, 61022, zhmurko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3898-3087>

**Особенности колонизации фитосферы проростков пшеницы
интродуцированными штаммами *Escherichia coli*
О.А. Авксентьева, О.И. Винникова, В.В. Жмурко**

В работе представлены результаты исследования способности интродуцированных штаммов *Escherichia coli* колонизировать различные ниши фитосферы – ризосферу, эндосферу и филлосферу проростков озимой мягкой пшеницы сорта Мерсия и влиять на ростовую реакцию растений при этих условиях. Материалом исследования служили ATCC 8739 и клинический штамм *E. coli*, а также изолят, выделенный из почвы агроценоза под пшеницей. Вегетационные опыты проводили в факторостатной камере кафедры физиологии и биохимии растений и микроорганизмов ХНУ им. В.Н.Каразина. Опытные растения инокулировали суспензией штаммов и почвенного изолята *E. coli*, проводя полив в вегетационные сосуды, где выращивали проростки в течение 10 суток. Параллельно методом последовательных смывов проводили анализ динамики численности КОЕ *E. coli* в ризо-, эндо- и филлосфере проростков. После завершения эксперимента анализировали ростовую реакцию по показателям линейного роста и интегральному показателю ростовых и биосинтетических процессов – накоплению биомассы. Результаты экспериментов показали, что инокуляция ATCC 8739 и клиническим штаммом *E. coli* снижает всхожесть семян пшеницы и тормозит ростовую реакцию. Инокуляция почвенным изолятом *E. coli* практически не влияет на всхожесть семян, линейный рост и накопление биомассы проростками пшеницы сорта Мерсия. Установлено, что численность бактерий *E. coli* в фитосфере растений пшеницы зависит от инокулированных штаммов и отличается в разных частях фитосферы проростков. Максимальное количество КОЕ *E. coli* в фитосфере обнаружено при инокуляции растений клиническим штаммом, втрое меньше – под влиянием почвенного изолята, почти в 6 раз меньше – при инокуляции стандартным штаммом. Выявлены различия по степени колонизации частей фитосферы при инокуляции опытных проростков различными штаммами и почвенным изолятом *E. coli*: в контрольном варианте и при воздействии ATCC 8739 распределение между ризо- и эндосферой примерно одинаковое, при действии клинического штамма – преимущественно колонизируется эндосфера растений, при инокуляции почвенным изолятом – ризосфера. В филлосфере исследованных проростков в незначительном количестве обнаружены бактериальные клетки исключительно клинического штамма, что свидетельствует о его повышенных адгезивных свойствах. Обсуждаются растительно-микробные взаимоотношения и способность условно-патогенных бактерий *E. coli* колонизировать различные сферы растительного организма и использовать проростки пшеницы в качестве альтернативного хозяина.

Ключевые слова: ATCC 8739, клинический штамм, почвенный изолят *E. coli*, *Triticum aestivum* L., ростовая реакция, колонизация фитосферы, ризосфера, эндосфера, филлосфера.

Об авторах:

О.А. Авксентьева – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, avksentyeva@karazin.ua, <http://orcid.org/0000-0002-3274-3410>

О.И. Винникова – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, o.i.vinnikova@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0001-8632-0213>

В.В. Жмурко – Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков, Украина, 61022, zhmurko@karazin.ua, <https://orcid.org/0000-0002-3898-3087>

Представлено: О.Ю.Леонов / Presented by: O.Yu.Leonov

Рецензент: С.В.Калініченко / Reviewer: S.V.Kalinichenko

Подано до редакції / Received: 10.04.2020