

Д/р
12393

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова

(повне найменування вищого навчального закладу)

Біологічний факультет

(повне найменування інституту/факультету)

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

(повна назва кафедри)

Дипломна робота

бакалавра

(ступень вищої освіти)

на тему: «Антагоністичні властивості *Lactobacillus plantarum* по відношенню до збудника бактеріального раку»

«Antagonistic properties of *Lactobacillus plantarum* against crown gall agent»

Виконала: студентка денної форми навчання
напряму підготовки 6.040102 Біологія
Невинна Тетяна Віталіївна

Керівник к.б.н., доцент Ліманська Н.В. 
Рецензент к.б.н., доцент Задерей Н.С.

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№ 12 від 17.05. 2016 р.

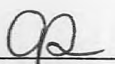
Захищено на засіданні ЕК № 2

протокол № 156 від 23.06.2016 р.

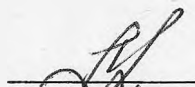
Оцінка Відмінно / А / 92
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бали)

Завідувач кафедри

Голова ЕК


(підпис)

Філіпова Т.О.


(підпис)

Карпов Л.М.

Одеса – 2016

779570

АНОТАЦІЯ

Було проведено дослідження антагоністичних властивостей лактобацил та здатність проявляти інгібуючий ефект щодо збудника бактеріального раку у штамів *Lactobacillus plantarum*, виділених з ферментованих рослинних продуктів України і Франції. Саме дія низького рН культуральної рідини обумовила антагоністичні властивості досліджених штамів *L. plantarum*. *In vitro* більша частка штамів *L. plantarum* спричиняла пригнічення росту збудника бактеріального раку та не було виявлено вираженої різниці у властивостях між штамами, виділеними в Україні і Франції.

Пригнічення інфекції бактеріального раку під впливом лактобацил становило – від 86,7% до 100% на рослинах каланхое, а на есплантах моркви – від 32,0% до 100%.

Роботу викладено на 38 сторінках, вона містить 2 таблиці та 7 рисунків. Наведено посилання на 50 джерел літератури (20 кирилицею та 30 латиницею).

Ключові слова: *R. radiobacter*, *L. plantarum*, антагоністичні властивості бактеріальний рак.

Antagonistic properties of lactobacilli and their ability to inhibit crown gall agent were studied in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from the fermented plant products in Ukraine and France. It was the effect of low pH of cultural liquid that explained the antagonistic properties of investigated strains of *L. plantarum*. *In vitro* the majority of *L. plantarum* strains caused the suppression of crown gall agent, and it wasn't clear difference of properties between strains isolated in France and Ukraine.

The suppression of crown gall infection in case of treating with lactobacilli reached from 86,7% to 100% in the Kalanchoe plants, and from 32,0% to 100% in carrot explants.

Diploma thesis is expounded on 38 pages, it contains 2 tables, 7 figures. It provides links to 50 references (20 cyrillic and 30 latinic).

Key words: *R. radiobacter*, *L. plantarum*, antagonistic properties, crown gall.

ЗМІСТ

Вступ.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Біологічні властивості бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	7
1.1.1. Систематичне положення.....	7
1.1.2. Морфологічні властивості бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	7
1.1.3. Культуральні властивості бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	8
1.1.4. Антагоністичні властивості лактобацил.....	10
1.1.5. Бактеріоцини лактобацил.....	10
1.1.6. Дія органічних кислот, перекису водню та інших антагоністичних факторів.....	12
1.2. Біологічні властивості бактерій роду <i>Rhizobium</i>	13
1.2.1. Систематичне положення <i>Rhizobium radiobacter</i>	13
1.2.2. Морфологічні властивості <i>R. radiobacter</i>	14
1.2.3. Культуральні властивості <i>R. radiobacter</i>	14
1.2.4. Патогенез <i>R. radiobacter</i>	15
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	18
2.1. Виділення та ідентифікація штамів лактобацил.....	18
2.2. Вивчення антагоністичної активності штамів.....	19
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	22
3.1. Ідентифікація виділених штамів молочнокислих бактерій.....	22
3.2. Антагоністична активність штамів лактобацил <i>in vitro</i>	23
3.3. Вплив лактобацил на пухлиноутворення у тест-рослин.....	26
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	30
ВИСНОВКИ.....	32
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	33

ПЕРЕЛІК ТЕРМІНІВ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

МПА – м'ясо-пептонний агар

МРС (MRS) – середовище de Man, Rogosa, Sharp

тДНК (від англ. «transferred DNA») – транспортована ДНК

Ті-плазмід (від англ. «tumor-including») – плазмід, що спричиняє утворення пухлин

LB (англ. Lysogeny broth) – середовище Лурія-Бертані

ВСТУП

Захворювання бактеріального раку, збудником якого є бактерія *Rhizobium radiobacter*, завдає істотного економічного збитку сільському господарству, викликаючи утворення корончатогаллових пухлин і, як наслідок, пригніченість росту і загибель більшості сільськогосподарських культур, серед яких квіткові, овочеві, плодові рослини.

Захворювання є системним і може поширюватися з посадковим матеріалом (живці, саджанці), зовні на вигляд рослина може мати вигляд здорової. Бактеріальний рак розвивається на рослині в місцях поранень (механічних, морозобоїни) [9].

Пошкоджена клітина виділяє аттрактанти, які залучають *R. radiobacter* до клітини. Бактерія передає частину коду Т- ДНК в ДНК клітини рослини. Т-ДНК активізує клітину виробляти величезну кількість гормонів росту (ауксинів і цитокінінів), які призводять до некерованого поділу і росту заражених клітин рослини, з яких утворюється ракоподібний нарост. Традиційні методи захисту рослин від даних збудників не є ефективними, оскільки бактерії населяють ксилему. Окремі роботи вказують на доцільність використання бактеріоцинів [19].

Лактобацили тривалий час привертають увагу вчених - біохіміків, мікробіологів, медиків, зважаючи на їх значення для профілактики і лікування багатьох захворювань різної етіології.

Бактерії роду *Lactobacillus* володіють вираженою антагоністичною активністю щодо патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів [4].

Лактобацили є широко відомими завдяки їх антагоністичним властивостям, які ґрунтуються на конкуренції за поживні речовини та сайти прикріплення, на продукції перекису водню і органічних кислот, головним чином молочної і оцтової, і бактеріоцинів, які специфічно діють на грампозитивні бактерії [2].

Метою даної роботи було вивчення впливу культур *L. plantarum* на збудника бактеріального раку *R. radiobacter*.

До завдань дослідження входило:

1. Виділити представників роду *Lactobacillus* з зразків продуктів рослинного походження та провести видову ідентифікацію за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.
2. Дослідити антагоністичну активність виділених *L. plantarum* по відношенню до фітопатогена *R. radiobacter in vitro*.
3. Вивчити природу антагоністичних речовин, які продукуються ізолятами *L. plantarum*.
4. Дослідити вплив культур лактобацил на розвиток інфекції бактеріального раку на тест-рослинах.

Об'єкт дослідження – біологічні властивості ізолятів лактобацил, виділених з продуктів рослинного походження.

Предмет дослідження – морфологічні, біохімічні властивості досліджених штамів, наявність гена *plnN* у *L. plantarum*, антагоністична активність ізолятів *L. plantarum* проти фітопатогена *R. radiobacter*.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

Лактобацили відомі за широким спектром антагоністичних властивостей, тому перспективним постає їх використання для захисту рослин від фітопатогенів.

Метою даної роботи було вивчення впливу культур *L. plantarum* на збудника бактеріального раку *R. radiobacter*.

Штами молочнокислих бактерій виділяли з сусла винограду і спочатку досліджували їх морфологічні властивості та характер росту. Морфологія бактерій та колоній, молочнокисле бродіння дало можливість зробити висновок про належність даної групи бактерій до молочнокислих бактерій.

Для того, щоб підтвердити належність виділених бактерій до виду *L. plantarum*, проводили полімеразну ланцюгову реакцію з праймерами до видоспецифічної ділянки гена *plnN*.

Виявилося, що у всіх досліджених штамів була наявна ділянка гена *plnN*. Це було доказом приналежності виділених бактерій до виду *L. plantarum*.

Антагоністичні властивості 15 штамів *L. plantarum* напочатку вивчали у дослідях *in vitro*, а саме - на поживному середовищі методом лунок. Усі штамми пригнічували ріст фітопатогена. Антагоністичну активність мала тільки культуральна рідина з нативним рН (3,92 - 4,3). Нейтралізована культуральна рідина не пригнічувала фітопатогени, що вказує на те, що антагоністичний вплив обумовлений дією саме органічних кислот.

Більша частка штамів *L. plantarum* спричиняла пригнічення росту збудника бактеріального раку у значній та середній мірі (40,0% і 46,7%, відповідно).

Не було вираженої різниці між штамми, виділеними в Україні і Франції, - і в першій, і в другій групі були присутніми штамми з різними рівнями антагоністичної активності.

На моделі експлантів моркви та на каланхое досліджені штами лактобацил проявили чіткий антагоністичний вплив з перешкодження виникнення пухлин.

Ця ознака виявилася штамоспецифічною, оскільки різні штами одного виду могли проявляти більшу або меншу антагоністичну активність, яку оцінювали як відсоток рослин або експлантів, в яких не спостерігалось пухлиноутворення. На каланхое усі досліджені штами лактобацил проявили високий рівень захисту від бактеріального раку: пригнічення становило від 86,7 до 100%. На експлантах моркви у 26,6%-66,7% штамів спостерігався високий і середній рівень захисту рослинних поверхонь.

Якщо ж пухлини на експлантах моркви утворювалися, то площа ураженої поверхні за обробок лактобацилами була набагато меншою, ніж у позитивному контролі, інокульованому лише фітопатогеном.

У низці літературних джерел було продемонстровано інгібуючий ефект лактобацил щодо різноманітних патогенів і шкідників. В основному фунгіцидний ефект пояснюється впливом органічних кислот лактобацил, але також має місце й конкуренція [49]. Отримані нами результати підтверджують дані попередніх авторів.

Отримані результати вказують на те, що лактобацили виду *L. plantarum* є перспективними мікроорганізмами для захисту рослин від бактеріального раку.

ВИСНОВКИ

1. З продуктів рослинного походження було виділено 15 штамів лактобацил, які було віднесено до виду *L. plantarum* за наявністю у геномі специфічної послідовності гена *plnN*.
2. *In vitro* більша частка штамів *L. plantarum* спричиняла пригнічення росту збудника бактеріального раку у значній та середній мірі (40,0% і 46,7%, відповідно), і не було виявлено вираженої різниці у властивостях між штамами, виділеними в Україні і Франції.
3. Антагоністичні властивості досліджених штамів *L. plantarum* були обумовлені дією низького рН культуральної рідини.
4. На експлантах моркви пригнічення інфекції бактеріального раку під впливом лактобацил становило від 32,0% до 100%, а на рослинах каланхое - від 86,7% до 100%.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алавердян Ж.Р., Акопян Л.Г., Чарян Л.М., Айрапетян С.Н. Кислотообразующая способность молочнокислых бактерий // Микробиология. – 1996. – Т. 65. – №2. – С. 241 – 244.
2. Беспоместных К.В. Исследование биохимических и морфологических свойств штаммов бактерий рода *Lactobacillus* / К.В. Беспоместных, А.Г. Галстян, Е.В. Короткая // Техника и технология пищевых производств. – 2011. – № 2. – С. 94 – 99.
3. Блинкова Л.П. Биотехнологические условия синтеза бактериоцинов / Блинкова Л.П., Машенцева Н.Г., Хорольский В.В., Горобец О.Б., Дорофеева Е.С. // Журн. Микробиология. – 2006. – №2. – С. 83-89.
4. Блудова Н. Г. Лактобактерії, пробіотики та імунна система кишечника / Н.Г. Блудова Н.Г. // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 4. – С. 115-120.
5. Бондаренко В.М. Классификация бактерий рода *Lactobacillus* // Материалы VIII съезда Всерос. общества эпидемиол., микробиол. и паразитологов. – М.,- 2002. – С. 140 – 144.
6. Ботина С.Г. Видовая идентификация и паспортизация молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического типирования // Молочная промышленность. – 2008. – № 3. – С. 52-54.
7. Ганбаров Х.Г., Джафаров М.М. Антибактериальная активность рода *Lactobacillus* // Журн. Микробиология. – 2006. – №2.- С. 56 – 58.
8. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50-58.
9. Дмитриева Н.Н., Виникова Н.В., Матвеева Н.П. Бактериальный рак клеток растений // Инфекционные болезни культурных растений. – 1988. – Т. 35. – № 5. – С. 879 – 887.
10. Коваленко Н.К., Немировская Л.Н. Бактериоциногенная и лизоцимсинтезирующая активность молочнокислых бактерий // Микробиол. журн. – 1999. – № 6. – С. 42 – 52.

11. Курбанова И.В., Чумаков М.И. Формирование внеклеточных структур в конъюгирующих культурах агробактерий // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2000. – № 3. – С. 26 – 31.
12. Леванова Г.Ф., Ефимов Е.И. Фенотаксономия и геносистематика лактобацилл / Под ред. проф. Г.И. Григорьевой. – Н. Новгород.: изд. Ю.А. Николаев. – 2009. – 248 с.
13. Лиманская Н.В., Жунько И.Д., Конуп Л.А., Милкус Б.Н. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики *A. vitis* // Виноградарство и виноделие. – 2003. – № 6. – С. 14 – 16.
14. Любимова Н.В., Лактин В.М., Бинюков В.И., Шувалова Е.Н. Плазмиды// Прикладная биология и микробиология. – 1988. – Т.24. – № 1. – С. 102 – 109.
15. Матвеева Т.В., Лутова Л.А., Нестер Ю. Опухолеобразование у растений // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 9. – С. 1188 – 1197.
16. Перепнихатка В.И. Биологические свойства штаммов *Agrobacterium tumefaciens* различного происхождения. // Автореф. дис. канд. биол. наук НИИ микробиол. и вирусол. им. Д.К. Заболотного. – 1986. – с. 20.
17. Полтавська О.В. Антагоністичні властивості молочнокислих бактерій, ізольованих із різних природних джерел / О.В.Полтавська, Н.К. Коваленко // Мікробіологічний журнал. – 2005. – №2. – С. 71 – 80.
18. Романенко В.М., Гвоздяк Р.И. Особенности ультраструктуры клеток *Agrobacterium tumefaciens* // Микробиол. журн. – 1986. – Т. 48. - № 1. – С. 46 – 50.
19. Сарнацкая В.В. Физиологические аспекты опухолевого роста растений// Киев: Наук. Думка. - 1993. – С. 3 – 22.
20. Чумаков М.И. Перенос Т-ДНК из агробактерий в растительную клетку через клеточные стенки и мембраны // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2001. – № 1. – С. 13 – 28.
21. Baron C., Domke N., Beinhof M. Elevated temperature differentially affects virulence, virB protein accumulation, and T-pilus formation in different *Agrobacterium*

tumefaciens and *Agrobacterium vitis* strains // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183. - № 23. – P. 6852–6861.

22. Ben Omar N., Abriouel H., Keleke S., Sánchez Valenzuela A., Martínez-Cañamero M., Lucas López R., Ortega E., Gálvez A. Bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains isolated from poto poto, a Congolese fermented maize product, and genetic fingerprinting of their plantaricin operons // International Journal of Food Microbiology. – 2008. – Vol.127. – P. 18 – 25.

23. Binns, A.N. and Thomashow, M.F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants // Annual Review of Microbiology – 1998. – Vol. 42. – P. 575-606.

24. Bouzar H., Jones J.B. Differential characterization of *Agrobacterium* species using carbon-source // Phytopathology. – 1993. – Vol. 83. – P.733-739.

25. Burr T.J., Otten L. Crown gall of grape: biology and disease management // Annu. Rev. Phytopathol. – 1999. – Vol. 37. – P. 53–80.

26. Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl Environm Microbiol – 2005. – Vol. 71. – P. 4951 – 4959.

27. Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J., Damiani P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* // Appl Microbiol. Biotechnol. – 1998. – Vol. 50. – P. 253 – 256.

28. Diep D.B., Havarstein L.S., Nes I.F. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11// J Bacteriol. – 1996. - Vol. 15. – P.4472-4483.

29. Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level // FEMS Microbiol. Letters. – 2002. – Vol. 14. – P.217-275.

30. El-Mabrok A.S.W., Hassan Z., Mokhtar A.M., Aween M.M. Efficacy of *Lactobacillus plantarum* C5 cells and their supernatant against *Colletotrichum*

- gloeosporioides* on germination rate of chilli seeds // Res J Biol Science. – 2012. – Vol. 7. – P.159-164.
31. *El-Taher E.M., El-Ghany A.T.M., Alawlaqi M.M., Ashour M.S.* Biosecurity for reducing ochratoxin A productivity and their impact on germination and ultrastructures of germinated wheat grains // J Microbiol Biotechnol Food Sci. – 2012. – Vol. 2. – P.135-151.
32. *Escobar M.A., Dandekar A.M.* *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease // Trends in Plant Science. – 2003. – Vol. 8. - № 8. – P. 380 – 386.
33. *Gould G.* Antimicrobial compound // Biotechnology and Food Ingredients. - 1991. – P. 461– 483.
34. *Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S.* Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environm. Microbiol. – 1995. – Vol. 61. - № 8. – P. 2879-2884.
35. *Higa T, Wididana G.* Changes in the soil microflora induced by effective microorganisms // In: Proceedings of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen. – 1989.- P. 320.
36. *Jamuna M.* Isolation and characterization lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins // J. Gen. Microbiol. – 2004. – № 50. – P. 79 – 90.
37. *Irelan N.A., Meredith C.P.* Genetic analysis of *A.tumefaciens* and *A.vitis* using randomly amplified polymorphic DNA // Amer. J. Enol. Viticult. – 1996. – Vol. 47. – P.145 – 151.
38. *Kerr A.* The genus *Agrobacterium* // New York: Springer-verlag. - 1992. – P.27 -31.
39. *Kerstens K., De Ley J.* Genus III. *Agrobacterium* // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. – Baltimore: Williams and Wilkins Co. - 1989. – Vol. 1. – P. 244 – 253.
40. *Kim K.-S., Chiltonand W.S., Farrand S.K.* A Ti plasmid - encoded enzyme required for degradation of mannopine is functionally homologous to the T-

region – encoded enzyme required for synthesis of this opine in crown gall tumors // J. Bacteriol. – 1996. – Vol. 178. – P. 3285 - 3292.

41. Krimi Z., Petit A., Mougel P., Dessaux Y. Seasonal fluctuations and long-term persistence of pathogenic populations of *Agrobacterium* spp. in soils // Appl. Environm. Microbiol. – 2002. – Vol. 68. – №7. – P. 3358 – 3365.

42. Lastra B., Llop P., Lopez M. M. Characterization of *Agrobacterium* strains isolated from grapevine in Galicia (Spain) // Proc. Congress of the European Foundation for Plant pathology. - 2000. – P. 178 – 179.

43. Luo Z. Q., Farrand S. K. Cloning and characterization of a tetracycline resistance determinant present in *Agrobacterium tumefaciens* C58 // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181. – P. 618–626.

44. Lingren S. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations / S. E. Lingren, W. J. Dobrogos // FEMS Microbiol. Rev. – 1990. – Vol. 87. – P. 149.

45. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J Appl Bacteriol. – 1960. – № 23. – P. 130-135.

46. Todorov S.D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* – production, genetic organization and mode of action // Brazilian Journal of Microbiology. – 2009. – Vol.40. – P.209 – 221.

47. Trias R., Baneras L., Montesinos E., Badosa E. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // International Microbiology. – 2008. – Vol. 11. – P. 231-236.

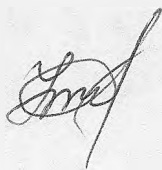
48. Xu J, Ran L, Yang B, Li Z. Inhibition of *Lactobacillus* species on the germination of *Aspergillus flavus* spore// Wei Sheng Yan Jiu. – 2002. – Vol. 31. – P.47 – 49.

49. Visser R., Holzapfel W. Lactic acid Bacteria in the control of plant pathogens // The lactic acid bacteria. – 1992. – P. 193 – 194.

50. Von der Weid T., Bulliard C., Schifirm E.J. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4+ T-cells with low proliferative capacity that produce transforming

growth factor beta and interleukin // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2001. – Vol. 8. - № 4. – P. 695 – 701.

16. 05. 2016

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Graf', written over a faint circular stamp.