

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: «Вплив консорціумів *Lactobacillus plantarum* на ростові характеристики деяких рослин»

«Effect of *Lactobacillus plantarum* consortia on growth characteristics of some plants»

Виконала: студентка денної форми навчання  
напряму підготовки 6.040102 Біологія  
Рева Катерина Ігорівна

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

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№ 12 від 14.05.2016 р.

Захищено на засіданні ЕК № 2

протокол ~~101~~ від 23.06.2016 р.

Оцінка Вірнішо 1 А 1 93  
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бали)

Завідувач кафедри

  
(підпис)

Філіпова Т.О.

Голова ЕК

  
(підпис)

Карпов Л.М.

Одеса – 2016

77052

## АНОТАЦІЯ

Було проведено дослідження стимулюючої активності окремих штамів бактерій *Lactobacillus plantarum*, виділених з рослинного матеріалу, та їх консорціумів щодо паростків крес-салату. В усіх випадках додавання лактобактерій у суспензії для обробки паростків виявлявся позитивний ефект на довжину стебел на коренів рослин, у порівнянні з варіантами вимоченими у воді. Кращий ефект у більшості випадків мали обробки 1% суспензією добових культур лактобацил. Застосування консорціума *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 355 збільшувало середні довжини стебел на 23,0%, а довжини коренів – на 9,7%. Застосування консорціума з лактобацил та *Bacillus atrophaeus* КВ майже у 55-60% збільшувало середню довжину коренів. Сама по собі культура *B. atrophaeus* КВ не мала високої стимулюючої активності.

Роботу викладено на 37 сторінках, вона містить 10 рисунків. Наведено посилання на 43 джерел літератури (20 кирилицею та 23 латиницею).

**Ключові слова:** *L. plantarum*, *B. atrophaeus*, стимулююча активність, консорціум.

Stimulation activity of some *Lactobacillus plantarum* strains isolated from plant material and their consortia was studied on garden cress seedlings. In all cases, the addition of lactic acid bacteria in suspensions for the treatment of seeds showed positive effect on stem and root length as compared with the seeds soaked in water. 1% suspension of overnight cultures of lactobacilli had the best effect. Application of the consortium *L. plantarum* ONU 12 and *L. plantarum* ONU 355 increased the mean length of stems in 23,0% and length of roots - in 9,7%. Use of the consortium of lactobacilli and *Bacillus atrophaeus* KB increased the average length of the roots in almost 55-60%. By itself, the culture *B. atrophaeus* KB didn't possess the stimulation activity.

Diploma thesis is expounded on 37 pages, it contains 10 figures. It provides links to 43 references (20 cyrillic and 23 latinic).

**Key words:** *L. plantarum*, *B. atrophaeus*, catalytic activity, the consortium.

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| ВСТУП.....  | 6  |
| 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....  | 9  |
| 1.1. Систематичне положення бактерій роду <i>Lactobacillus</i> .....                    | 9  |
| 1.2. Морфологічні, біохімічні та культуральні властивості<br><i>Lactobacillus</i> ..... | 10 |
| 1.3. Біологічні властивості бактерій що населяють поверхні рослин.....                  | 12 |
| 1.4. Застосування в захисті рослин бактерій роду <i>Lactobacillus</i> .....             | 14 |
| 1.5. Лактобактерії як стимулятори росту рослин.....                                     | 15 |
| 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....   | 19 |
| 2.1. Ідентифікація штамів лактобацил.....   | 19 |
| 2.2. Обробка насіння мікроорганізмами.....  | 20 |
| 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....   | 22 |
| 3.1. Ідентифікація досліджуваних штамів.....  | 22 |
| 3.2. Вплив лактобацил на проростання насіння крес-салату.....                           | 23 |
| 3.3. Консорціуми штамів <i>L. plantarum</i> .....                                       | 26 |
| 3.4. Вплив консорціуму з лактобацил і бацил на ростові характеристики<br>рослин.....    | 28 |
| УЗАГАЛЬНЕННЯ.....   | 31 |
| ВИСНОВКИ.....   | 33 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....   | 34 |

## ПЕРЕЛІК ТЕРМІНІВ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

АФК – активна форма кисню

КУО – колонієутворюючі одиниці

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

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

pPHK – рибосомна рибонуклеїнова кислота

СДВ – стерильна дистильована вода

LB – поживне середовище Лурія Бертані

## ВСТУП

Лактобацили зустрічаються в різних екологічних нішах, які відповідають їх потребам – дефіцит кисню, висока концентрація поживних речовин, ростових факторів: ґрунт, епіфітна мікрофлора, різні біотипи організму людини і тварин. Кислотостійкість цих бактерій, як і здатність продукувати велику кількість молочної кислоти, можна розглядати як еволюційно сформований механізм пристосування до виживання в складних умовах і конкуренції. Це пояснює широке поширення лактобацил та успішне освоєння ними різних середовищ існування [33].

В наш час в медичній практиці широко застосовуються пробіотичні препарати, виготовлені на основі штамів лактобацил. Пробіотичні бактерії повинні володіти набором властивостей, що дозволяють їм конкурувати з патогенними та умовно-патогенними мікроорганізмами. До таких ознак належать: антагоністична активність, активність кислотоутворення, певний рівень резистентності до соляної кислоти і жовчі, відсутність факторів патогенності, тобто безпеку при застосуванні. Відомо, що представники роду *Lactobacillus* здатні синтезувати антимікробні речовини, асоційовані з синтезом бактеріоцинів. На відміну від антибіотиків, бактеріоцини мають порівняно вузький спектр дії, спрямований проти споріднених видів [2, 3, 14].

У зв'язку з цим актуальною є селекція штамів лактобацил, що синтезують мікроцини з широким спектром антагоністичної активності [18].

Для стимуляції росту рослин найбільш часто використовують представників ризосферних мікроорганізмів: азотфіксуючих бактерій, фосфатмобілізуєчих, значно менше вивчені в цьому напрямку молочнокислі бактерії [4, 7].

Молочнокислі бактерії відіграють велику роль в ряді галузей промисловості і сільського господарства. Ці мікроорганізми поділені дослідникам [35] на дві основні категорії: гомо- і гетероферментативні. На

відміну від гомоферментативних гетероферментативні молочнокислі бактерії мають більш широким набором ферментів і, як наслідок, більш виражену здатність до синтезу різноманітних біологічно активних речовин (летких кислот, етилового спирту, вуглекислоти, діацетила, перекису водню, антибіотиків) [14, 19]. Багато видів молочнокислих бактерій поширені в ґрунтах та, що особливо важливо, в ризосфері рослин. До теперішнього часу в літературі описано безліч штамів молочнокислих бактерій, що володіють антагоністичними властивостями по відношенню до різних мікроорганізмів, у тому числі фітопатогенних.

Лактобацили були вдало застосовані у контролі захворювань рослин та стимуляції росту рослин, але у літературі недостатньо інформації, що описує подібні дослідження. Внесення лактобацил у комбінації з іншими корисними мікроорганізмами (суміш “ефективні мікроорганізми 4”) призвело до покращення розкладання органічних речовин у ґрунті, що, в свою чергу, призвело до кращого вивільнення живильних для росту рослин речовин. Довжини коренів та пагонів редису і гірчиці і пагонів огірків, що росли у ґрунті, де було внесено лактобацили, були збільшені завдяки більшому вмісту гумусу у порівнянні з такими, що росли у необробленому ґрунті [30]. Кращий ріст кукурудзи спостерігався після внесення у ґрунт компосту, інокульованого сумішшю “ефективні мікроорганізми 4”, і ефект не збільшувався після додавання хімічних добрив до цих обробок [36]. Кількість якісних плодів з томатів, що росли у ґрунті, інокульованому сумішшю, що містила *Lactobacillus*, була на 51,8% вищою, ніж така з ґрунту з внесеними хімічними добривами [31].

Біологічно активні речовини, що виділяються мікроорганізмами, не тільки впливають на ріст рослин і підвищують врожайність, але і покращують якість продукції, збільшуючи вміст білків, незамінних амінокислот і вітамінів [7, 9].

Це все це відкриває можливість широкого впровадження в рослинництво мікробних препаратів, основою для яких можуть бути

молочнокислі бактерії, особливо гетероферментативні. Їх здатність у багатьох випадках активно заселяти ризосферу, а також антимікробні та фітостимулюючі властивості можуть бути реалізовані найбільш повно в цій галузі сільського господарства. До того ж сучасний напрям розвитку рослинництва орієнтоване на скорочення обсягів застосування азотних і фосфорних добрив і відмова від пестицидів, небезпечних для здоров'я людини та призводять до проблеми резистентності мікроорганізмів [4, 6, 18].

У зв'язку з вище вказаним, метою дослідження було вивчення стимулюючого впливу окремих штамів *L. plantarum* та їх консорціумів на ріст тест-рослин.

Задачі дослідження були наступними:

1. Ідентифікувати штами *L. plantarum* за наявністю специфічних генетичних ознак.
2. Вивчити вплив деяких штамів *L. plantarum* на ріст крес-салату.
3. Дослідити стимулюючу активність деяких моновидових консорціумів *L. plantarum*.
4. Вивчити вплив на рослини консорціума *L. plantarum* та *Bacillus*.

Об'єкт дослідження – вплив мікроорганізмів на ріст рослин.

Предмет дослідження – стимулююча активність окремих штамів *L. plantarum* і *Bacillus*, стимулююча активність консорціумів, ростові характеристики рослин.



## ВИСНОВКИ

1. Досліджені штами молочнокислих бактерій належали до виду *L. plantarum*, що було встановлено за наявністю специфічних генних послідовностей *recA*.
2. Бактерії штамів *L. plantarum* ОНУ 12, 313, 355 проявляли стимулюючий вплив на ріст крес-салату, збільшуючи середні довжини стебел на 16,0 – 35,3%, коренів – на 18,3 – 46,6%, масу паростків – на 26,6 – 35,3%, і кращий ефект у більшості випадків мали обробки 1% суспензією добових культур лактобацил.
3. Застосування консорціума *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 355 збільшувало середні довжини стебел на 23,0%, а довжини коренів – на 9,7%.
4. Додавання до культури *B. atrophaeus* КВ добової культури *L. plantarum* ОНУ 12 збільшувало середню довжину стебел крес-салату у порівнянні із застосуванням лише культури *B. atrophaeus* КВ на 25,2 – 28,5%, а середню довжину коренів – на 54,6 – 61,3%.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Березова Е.Ф. Микрофлора корневой системы льна и ее роль в питании растений / Е.Ф. Березова, Л.В. Судакова // Труды всесоюзного научно-исследовательского института льна. Вып. VI. – М., 1960. – С. 170-188.
2. Глушанова, Н.А. Биологические свойства лактобацилл / Н.А. Глушанова // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50-58.
3. Димова, М.И. Бактериоциногенные и пробиотические свойства штамма *Lactobacillus plantarum* УКМ В-2705 / М.И. Димова, Н.К. Коваченко // Клиническое питание. – 2007. – № 1-2. – С. 36-38.
4. Завалин А.А. Биопрепараты, удобрения и урожай / А.А. Завалин. – М.: ВНИИА, 2005. – 302 с.
5. Калугина Н.В. Курс лекций по микробиологии молока и молочных продуктов // ФГОУ ВПО УГСХА. – 2009. – С. 10-11.
6. Квасников Е.И., Нестеренко Е.И. Молочнокислые бактерии и пути их использования./ Е.И. Квасников, О.Л. Нестеренко // М.: Наука. – 1975. – 389-390 с.
7. Кожемяков А.П. Биопрепараты для земледелия / А.П. Кожемяков, В.К. Чеботарь // В сб.: Биопрепараты в сельском хозяйстве. М., 2005. – С. 18-54.
8. Комаров А.А. Получение гумусоподобных соединений из лигнина и их физиологическое действие на растение. - С-Пб: Невский стандарт, 2004. - 120 с.
9. Кудлай Д.Г., Лиходец В.Г. Бактериоциногенция / Д.Г. Кудлай, В.Г. Лиходец // Л.: Медицина. – 1966. – 203 с.
10. 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.
11. Ліманська Н. В., Задерей О. В., Іваниця А. В., Маринова І. І., Н. С. Задерей Н. С. Перспективи використання молочнокислих бактерій у

- захисті рослин // Збірник наукових праць V Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих учених і студентів. – Житомир: Видво ЖДУ ім. І.Франка, 2014. – С. 64-66.
12. Ліманська Н.В., Коротаєва Н.В., Мерліч А.Г., Ямборко Г.В., Іваниця В.О. Спосіб захисту рослин від бактеріального раку з використанням суміші штамів *Lactobacillus plantarum* зі стимулюючою активністю. – Патент України на корисну модель. – січень 2015. – 9 с.
13. Мирошникова Е.П. Микробиология молока и молочных продуктов [Текст]: электронное учебное пособие – Оренбург: ГОУОГУ, 2005. – С. 14-19.
14. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Кринг, П. Снит и др.: Пер с англ. – М.: Мир, 1997. – том 1. – С. 280-285.
15. Ржевская В.С. Влияние микробного препарата «Эмбико» на урожайность винограда сорта Кардинал // Тези VIII Міжнародної конференції “daRostim 2012: Мікробні біотехнології: актуальність і майбутнє”. – Київ, 19-22 листопада 2012. – С. 269-271.
16. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 320 с.
17. Точилкина, А.Г. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции / А.Г. Точилкина [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2008. – № 3. – С. 69-73.
18. Тюрин М.В., Шендеров Б.А., Рахимова Н.Г. и др. К механизму антагонистической активности лактобацилл // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1989. – № 2. – С. 3-8.
19. Шлегель Г. Общая микробиология: Пер. с нем. – Москва: Мир, 1987. – С. 272-280.
20. Яруллина Д.Р., Асафова Е.В., Картунова Ю.Е., Зиятдинова Г.К., Ильинская О.Н. Пробиотики для растений: NO-продуцирующие лактобациллы защищают растения от засухи / Д. Р. Яруллина, Е.В.

- Асафова, Ю.Е. Картунова, Г.К. Зиятдинова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2014. – Т. 50, № 2. – С. 189-192.
21. *Axelsson L.* Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria: Microbiology and functional aspects / L. Axelsson, S. Salminen, A. von Wright, A. Ouwehand // N-Y, 2004. P. 1-72.
22. *Bertani G.* Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. – 1951. – Vol. 62. – P. 293-300.
23. *Chen Y. – S.* Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure / Y.-S. Chen, F. Yanagida, T. Shinohara // Letters in Appl Microbiology. 2005. – V. 40(3). – P. 195-200.
24. *Dalirsaber Jalali M., Khosro I., Ghasemi M.F., Tabrizi S.S.Kh.* Antagonism of *Lactobacillus* species against *Xanthomonas campestris* isolated from different plants // Journal of Applied Environmental and Biological Sciences. – 2012. – Vol. 9. – P. 480-484.
25. *Dunya S., Kistner T., Grueneberg H., Oschmann C., Ulrichs C.* Use of *Bacillus subtilis* and a *Lactobacillus* strain in the remediation of rail tracks // Gesunde Pflanzen. – 2005. – № 57. – P. 193-198.
26. *Efficacy of Lactobacillus plantarum C5 cells and their supernatant against Colletotrichum gloeosporioides on germination rate of chilli seeds / A.S.W. El-Mabrok, Z. Hassan, A. M. Mokhtar, M. M. Aween // Res J Biol Sci. – 2012. – Vol. 7. – P. 159-164.*
27. *Goffin P., de Bunt B., Giovane M., Leveaue J.H.J., Hoppener-Ogawa S., Teusink B., Hugenholtz J.* Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth // Molecular Systems Biology. – 2010. – Vol. 6, № 431. doi: 10.1038/msb.2010.67.
28. *Gummala S.* Tryptophan catabolism by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* cheese flavor adjuncts / S. Gummala, J.R. Broadbent // J. Dairy Sci. 1999. – V. 82. – P. 2070-2077.

29. Haas J.H., Moore L.W., Ream W., Manulis S. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61, № 8. – P. 2879-2884.
30. Higa T., Kinjo S. Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation // Proceedings of 1 th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming. – 1989. – Khon Kaen, Thailand: Khon Kaen University. – P. 140-147.
31. Higa T., Wididana G.N. Change in the soil microflora induced by the effective microorganisms. In: Proc. First Inter. Conf. On Kyusei Nature Farming, U.S.D.A., Washington. – 1989.
32. Honeyfield D.C. Assay for enzymatic conversion of indoleacetic acid to 3-methylindole in ruminal *Lactobacillus* species / D.C. Honeyfield, J.R. Carlson // Appl. Environ. Microbiol. – 1990. – V. 56. – P. 724-729.
33. *Lactobacillus*. Molecular biology From Genomics to Probiotics. Edited by A. Ljungh, T. Wadstrom. Causter Academic Press, UK. 2009. 205 c.
34. Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J. Appl. Bacteriol. – 1960. – V. 23. – P. 130-135.
35. Panchaban S., R. Katawatin; P. Srisataporn, P. Srichand, M. Sukawatanasombat and S. Prachankarnjana. The application of organic materials and chemical fertilizer in the improvement of soil properties and fertility status for increasing yield and income of sweet corn in the Northeast. A Report Submitted to USAID and RDI, Khon Kaen University, Thailand. – 1989.
36. Rojo-Bezares B., Saenz Y., Navarro L., Zarazaga M., Ruiz-Larrea F., Torres C. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must // Food Microbiol. - 2007. - Vol. 24. - P. 482 - 491.
37. Stackerbrandt, E. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria / E. Stackerbrandt, M. Tauber // Biochimie. – 1988. – Vol.70. – P. 317-324.

38. Szegedi E., Bottka S. Detection of *Agrobacterium vitis* by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semiselective medium // *Vitis*. – 2002. – V. 41, № 1. – P. 37-42.
39. Torriani S., Felis G.E., Dellagio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers // *Appl. Environm. Microbiol.* – 2001. – V. 67. – P. 3450-3454.
40. 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.
41. Visser R., Holzapel W.H., Bezuidenhout J.J., Kotze J.M. Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria // *Appl. Env. Microbiol.* – 1986. – Vol. 52. – P. 552-555.
42. Yokoyama M.T., Carlson J.R. Production of skatole and p-cresol by a rumen *Lactobacillus* sp. / M.T. Yokoyama, J.R. Carlson // *Appl. Environm. Microbiol.* - 1981. - V. 41. - P. 71 - 76.
43. Zwieler J., Handschur M., Michaelsen A., Irez S., Demel M., Denner E.B., Haslberger A.G. DGGE and real-time PCR analysis of lactic acid bacteria in bacterial communities of the phyllosphere of lettuce // *Mol Nutr Food Res.* – 2008. – №52 (5). – P. 614-623.

16.05.2016 