

D/p
12338

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: «Застосування *Lactobacillus plantarum* у біотехнології стимуляції рослин та їх захисту від бактеріального раку»

«Application of *Lactobacillus plantarum* in biotechnology for plant growth stimulation and protection against crown gall»

Виконав: студент денної форми навчання
напряму підготовки 6.051401 Біотехнологія
Іваніца Віталій Юрійович

Керівник к.б.н., доцент Ліманська Н.В.

Рецензент к.б.н., доцент Паузер О.Б.

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№12 від 17.05 2016 р.

Захищено на засіданні ЕК №

протокол №1 від 17.06 2016 р.

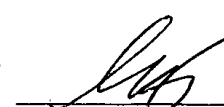
Оцінка Вірливо 1 А 1.93
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бали)

Завідувач кафедри


(підпис)

Філіпова Т.О.

Голова ЕК


(підпис)

Мазуренко І.К.

Одеса – 2016

779515

Анотація

Було встановлено високу антагоністичну дію штаму *L. plantarum* ONU 12 *in vitro* проти 7 штамів фітопатогенних мікроорганізмів, а також 100% інгібуючу активність проти *Rhizobium radiobacter* C58 *in vivo*. Виявлена позитивна дія досліджуваного штаму на морфо- та ризогенез сіянців хрестоцвітих та злакових. У проведених нами дослідах були визначені оптимальні склади поживних середовищ для культивування *L. plantarum* ONU 12 для стимулювання росту досліджуваних рослин. Були підтверджені припущення про здатність лактобацил активно конкурувати з фітопатогеном за прикріплення. Бактерії штаму *Lactobacillus plantarum* ONU 12 виявилися перспективними для створення біопрепарату для стимуляції та захисту рослин.

Роботу викладено на 44 сторінках, вона містить 3 таблиці та 20 рисунків. Наведено посилання на 44 джерела літератури (11 кирилицею та 33 латиницею).

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, *Rhizobium radiobacter*, біопрепарат комплексної дії, антагонізм, ріст-стимулююча активність, бактеріальна адгезія, оптимізація поживного середовища.

The high antagonistic activity of the strain *L. plantarum* ONU 12 *in vitro* against 7 strains of phytopathogenic microorganisms, and also 100% inhibitory activity against *Rhizobium radiobacter* C58 *in vivo* have been revealed. The positive effect of the studied strain on morpho- and rhizogenesis of cruciferous and cereal seedlings has been established. In our experiments, the optimal composition of growth media for cultivation of *L. plantarum* ONU 12 to stimulate the growth of the studied plants have been identified. A hypothesis about the ability of lactobacilli to actively compete with pathogens for attachment has been confirmed. It was shown that bacteria of *L. plantarum* ONU 12 could be the perspective microorganisms for development of biopreparation for plant protection and stimulation.

The diploma work is expounded on 44 pages, it contains 3 tables and 20 figures. It provides links to 44 references (11 cyrillic and 33 latinic).

Key words: *Lactobacillus plantarum*, *Rhizobium radiobacter*, biopreparation of complex action, antagonism, growth-stimulating activity, bacterial adhesion, optimization of nutritional medium.

Зміст

ВСТУП.....	4
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	6
1.1 Систематичне положення <i>Lactobacillus plantarum</i>	6
1.2 Морфологічні та біохімічні властивості.....	6
1.3 Культуральні властивості.....	8
1.4 Застосування в харчовій промисловості.....	11
1.5 Застосування в сільському господарстві.....	13
1.6 Адгезивні властивості лактобацил.....	14
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	17
2.1 Вплив <i>Lactobacillus plantarum</i> ОНУ 12 на проростання та ростові характеристики крес-салату та пшениці.....	17
2.2 Вплив <i>L. plantarum</i> ОНУ 12 на збудника бактеріального раку.....	19
2.3 Виявлення конкурентної адгезії <i>L. plantarum</i> ОНУ 12 і <i>R. radiobacter</i> PYZ.....	21
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	22
3.1 Вплив <i>L. plantarum</i> ОНУ 12 на проростання крес-салату та пшениці.....	22
3.2 Антагоністична активність <i>L. plantarum</i> ОНУ 12.....	27
3.3 Конкурентна адгезія <i>L. plantarum</i> ОНУ 12 та <i>R. radiobacter</i> PYZ.....	31
УАГАЛЬНЕННЯ.....	37
ВИСНОВКИ.....	39
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	40

ВСТУП

Значний внесок у світову екологічну кризу пов'язану із забрудненням ґрунтів і сільськогосподарських продуктів харчування вносить масове застосування пестицидів і мінеральних добрив [25]. Разом з тим, в умовах складної фітосанітарної ситуації на посівних площах сільськогосподарських культур, значною ураженості насіння та посадкового матеріалу, та інфікованості орних земель фітопатогенними мікроорганізмами повна відмова від використання засобів захисту рослин та агрохімікатів неможлива [27]. Бактеріальний рак поширений у всіх зонах вирощування винограду, не дивлячись на застосування різних заходів боротьби, в тому числі і фітосанітарних, відзначається його щорічне прогресування.

Одним з найбільш перспективних напрямків у боротьбі зі збудниками захворювань рослин є використання біопрепаратів на основі бактерій *Lactobacillus plantarum*. Бактерії даного виду є доволі розповсюдженими і як правило зустрічаються в багатьох ферментованих харчових продуктах, їх протимікробні речовини, мають значний вплив на грампозитивні і грамнегативні бактерії [22]. З точки зору сучасних агротехнологій становить інтерес застосування в сільськогосподарському виробництві біопрепаратів комплексної дії, що володіють декількома видами корисної активності (антибактеріальною, ріст-стимулюючою, фунгіцидною, позитивною дією на показники родючості ґрунту). Разом з тим, важливим аспектом розробки бактеріального біопрепарату захисту рослин є оптимізація поживного середовища, яка дозволить з найбільшою ефективністю проявляти штаму свої ріст-стимулюючу активність по відношенню до рослин, та антагоністичну дію по відношенню до фітопатогенів.

Метою роботи було вивчення можливості застосування *Lactobacillus plantarum* для стимуляції росту рослин та їх захисту від збудника бактеріального раку.

До завдань дослідження входило:

1. Виявити вплив *L. plantarum* ОНУ 12 на деякі ростові показники тест-рослин.
2. Порівняти стимулювальну активність *L. plantarum* ОНУ 12 при вирощуванні бактерій штама на різних середовищах.
3. Вивчити антагоністичні властивості штама *L. plantarum* ОНУ 12.
4. Дослідити вплив лактобацил на прикріплення клітин фітопатогена *R. radiobacter* PYZ.

Об'єкт дослідження – біологічні властивості бактерій виду *Lactobacillus plantarum*.

Предмет дослідження – стимулювальна активність лактобацил щодо росту рослин, антагоністичні властивості лактобацил щодо фітопатогенів, ріст на середовищах різного складу, конкурентна адгезія лактобацил і фітопатогенів.

Новизна роботи – на підставі визначення поживних потреб лактобацил оптимізовано склад поживних середовищ для ефективної стимуляції морфогенезу капустяних та тонконогових.

Висловлюю щире подяку кандидату біологічних наук, доценту Васильєвій Наталії Юрієвні за допомогу у проведенні досліджень з живильними середовищами різного складу.

ВИСНОВКИ

1. За обробки насіння бактеріями штама *L. plantarum* ОНУ 12 середні довжини коренів та стебел крес-салату збільшувалися на 17,3% - 28,8% та 13,0% - 42,7%, відповідно, а довжини коренів та висота паростків пшениці на 22,5% - 34,2% і 13,0% - 35,3%, відповідно.
2. Для обробок насіння крес-салату найкращим виявилось середовище №1180, а для обробки насіння пшениці – середовище №3.
3. Бактерії штама *L. plantarum* ОНУ 12 активно пригнічували *Rhizobium radiobacter* C58, *R. vitis* MR1, *R. vitis* UA6, *R. vitis* 379, *R. rhizogenes* 15834, *Erwinia carotovora* ZM1, *Ralstonia solanacearum* B-1109-UCM *in vitro*, а *in vivo* пригнічення збудника бактеріального раку *R. radiobacter* C 58 становило 100%.
4. Лактобацили здатні конкурувати за прикріплення з клітинами фітопатогена *R. radiobacter* PYZ, утворюючи змішані біоплівки та порушуючи цілісність біоплівки фітопатогена.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бухарін О. В. Вплив активних форм кисню на адгезивні характеристики та утворення біоплівки бактеріями // Журнал Мікробіології, епідеміології й імунобіології, 2012, № 3.-С.70-73
2. Валуйко Г.Н. Характеристика основних груп молочнокислих бактерій // Технологія винограду та вина. – "Магарач", – 2001. – С. 122.
3. Василюк О. М., Коваленко Н. К., Гармашева І. Л. Фізіолого-біохімічні властивості штамів *Lactobacillus plantarum*, ізольованих із традиційних ферментованих продуктів різних регіонів України // Мікробіологічний журнал. - 2014. - Т. 76. № 5. - С. 2-8.
4. Еремина И.А, Лузина Н.И., Кригер О.В. Микробиология продуктов растительного происхождения // Учебное пособие. – Кемеровский технологический институт пищевой промышленности – 2003. – С. 52
5. Квасников Е.И. Место и значение молочнокислых бактерий в биосфере// Микробиол журн. - 1992. – Т. 54, № 5. – С. 3 – 10.
6. Панин, А.Н. Пробиотики - неотъемлемый компонент рационального кормления животных // ФГУ ВГНКИ: Ветеринария, № 7 – 2002.– С. 12
7. Ракицкий П.Ф. Биологическая статистика. - М. Высшая школа, 1973. - 320с.
8. Семенов А.В. Характеристика антагонистической активности бактерий при межмикробных взаимодействиях: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Семенов Александр Васильевич. – Оренбург, 2009. — С. 19 – 20.
9. Современная микробиология: прокариоты: в 2-х томах: Пер с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дривса, Г. Шлегеля. М.: Мир, 2005. – Т. 1. С.496
10. Соловьева И.В., Точилина А.Г., Новикова Н.А., Белова И.В., Иванова Т.П., Соколова К.Я. Изучение биологических свойств новых штаммов рода *Lactobacillus* // Вестник Нижегородского Университета им. Н.И.Лобачевского.– 2010. – С. 35.

11. Чудинова Ю.В. Влияние микроорганизмов на всхожесть семян и рост ростков корней редиса / Ю.В. Чудинова, Н.Н. Наплекова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. –2009. – №7 (57) –С. 14 – 18.
12. An Y.H., Handbook of Bacterial Adhesion / Y.H. An, R.J. Friedman / New Jersey: Humana Press, 2000. - 644 p.
13. Bashan Y. Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003) / Y.Bashan, G. Holguin, L.E. De Bashan / Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol.50.– P. 521.– 577
14. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Three The Firmicutes, Springer. – 2009. – P. 506.
15. Bolotin, A., Wincker, P., Manger, S., Jaillon, O., Malmme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Sorokin, A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403 // Genome Res.–2001.– Vol.11. – P.731 – 753.
16. Bron Peter A., Marco M., Hoffer S., Van Mullekom E., de Vos W.M., and Kleerebezem M. Genetic Characterization of the Bile Salt Response in *Lactobacillus plantarum* and Analysis of Responsive Promoters In Vitro and In Situ in the Gastrointestinal Tract // J. Bacteriol.–2004.– Vol.186.– P. 7829–7835.
17. Cerca et al., Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*// Research in Microbiology. – 2005. - Vol.156. – P.506–514
18. D. Mack et al. Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. // Infect. Immun. – 1992. – Vol. 60. – P. 2048–2057
19. Da Silva Meira Q.G. et al. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and

- sensitivity to sanitizers// Food Control. – 2012. – V. 25. – № 2. – P. 469–475.
20. *De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M. E.* A medium for the cultivation of lactobacilli// Journal Applied Bacteriology. - 1960. - Vol. 23. - P. 130 - 135
21. *Deepika, G., Green, R. J., Frazier, R. A., and Charalampopoulos, D.* Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG// Journal Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 107. - P. 1230-1240
22. *Deepika G. and Charalampopoulos D.* Surface and Adhesion Properties of Lactobacilli// Advances in Applied Microbiology. – 2010. – Vol.70. - P. 127-152
23. *Delcour et. al.* The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria// Antonie Van Leeuwenhoek. –1999. - Vol. 76(1-4). – P. 159-184
24. *Desvaux, M., Dumas, I., Chastoy, I. and Hebraud, M.* Protein cell surface display in Gram-positive bacteria. From single protein to macromolecular protein structure// FEMS Microbiology Letters. - 2006. – Vol. 256. – P.1–15
25. *Frossard et. al.* The use of tracers to investigate phosphate cycling in soil–plant systems. Soil biology// Springer. - 2011. – Vol. 26. - P.37
26. *George G., Hui Y. H.* Food Biotechnology: Microorganisms.- Toronto: Wiley VCH, 1995, P.720
27. *Goffin P. et al.* Understanding the physiology of *Lactobacillus plantarum* at zero growth// Molecular Systems Biology. - 2010. - Vol.6. - P.1-12
28. *Hajihassani et al.* A Lattice-Boltzmann model to simulate diffractive nonlinear ultrasound beam propagation in a dissipative fluid medium// 12th International Symposium on Therapeutic Ultrasound. – 2012. – Vol. 1503. – P.89-94.
29. *Hardlaner S., Steinkraus K.* Applications of Biotechnology in Traditional Fermented Foods // National Academy Press. – 1992. – p.43 – 45.

30. *Hogt A.H. et al.* Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* to a hydrophobic biomaterial. // Journal of general microbiology. – 1985. – V. 131. – № 9. – P. 2485–2491
31. *Hussain M. et al.* Importance of medium and atmosphere type to both slime production and adherence by coagulase-negative staphylococci. // Journal of Hospital Infection. – 1992. – Vol. 20. – P. 173–184.
32. *Lauren A. Hirao . Irina Grishina . Olivier Bourry, Satya Dandekar* Early Mucosal Sensing of SIV Infection by Paneth Cells Induces IL-1 β Production and Initiates Gut Epithelial Disruption [Электронный ресурс]// J. Plos Pathogens. – 2014. – P. 3 – 8. – Режим доступа до репринту: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004311>
33. *Limanska N.* Effect of *Lactobacillus plantarum* ONU 12 on initial stages of growth of tomatoes / N. Limanska // Microbial biotechnology: activities and future – Radostim-2012. 19th - 22nd November 2012, - Kyiv, Ukrain, 2012. - P. 176-177.
34. *Limanska N, Korotaeva V, Bascola V, Ivanytsia T, Merlich A, et al.* Study of the Potential Application of lactic Acid Bacteria in the Control of Infection Caused by *Agrobacterium tumefaciens*// Journal of Plant Pathology & Microbiology.- 2015. – Vol. 6. – P.1-9. – Режим доступа до репринту: doi:10.4172/2157-7471.1000292
35. *Neuhaus F., Baddiley J.* A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria// Microbiology and Molecular Biology Reviews. - 2003. - Vol.67(4). - P.686-723.
36. *Niranjan NSingh* CNS *Cryptococcosis* in HIV [Электронный ресурс]// Medscape. – 2013. – P. 1 – 1. – Режим доступа до репринту: <http://emedicine.medscape.com/article/1167389-overview>
37. *Oga M. et al.* Bacterial adherence to bioinert and bioactive materials studied *in vitro* // Acta Orthop. Scand. – 1993. – V. 64. – P. 273–276

38. *Oliveira R. et al.* The role of hydrophobicity in bacterial adhesion // *Bioline.* – 2001. – P. 11–22.
39. *Roger Y. Tsien* The green fluorescent protein// *Annual Review of Biochemistry.*– 1998.– Vol. 67: P 509-544
40. *Sanchez, B., Bressollet, P. and Urdaci, M. C.* Exported proteins in probiotic bacteria: Adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host// *FEMS Immunology med microbiolog.*– 2008. – Vol.54. – P.1–17.
41. *Thécla Lesuffleur et al.*, Dihydrofolate Reductase Gene Amplification-associated Shift of Differentiation in Methotrexate-adapted HT29 Cells// *The Journal of Cell biology.* – 1991. – Vol.115. – P.1410-1418.
42. *Ubbink, J., and Schae-Zimmermann P.* Probing bacterial interactions: Integrated approaches combining atomic force microscopy, electron microscopy and biophysical techniques// *Micron.* – 2005. – Vol. 36 – P. 293–320.
43. *Von Eiff C. et al.* Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci // *Lancet Infectious Diseases.* – 2002. – V. 2. – P. 677–685.
44. *Wiencek, K.M.* Effects of substratum wettability and molecular topography on the initial adhesion of bacteria to chemically defined substrata/ *K.M. Wiencek, M. Fletcher*// *Biofouling.* – 1997. – V. 11. – P. 293–311.

16.05.2016

