

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Дипломна робота
бакалавра**

на тему: **«Застосування *Lactobacillus plantarum* у біотехнології
стимуляції росту деяких декоративних рослин»**

«Application of *Lactobacillus plantarum* in biotechnology of growth stimulation of some
ornamental plants»

Виконала: студентка денної форми
навчання
напряму 6.051401 Біотехнологія
Завгородна Катерина Олександрівна

Науковий керівник

кандидат біологічних наук, доцент
Ліманська Наталія Вікторівна

Рецензент:

кандидат біологічних наук, доцент
Немерцалов Володимир Володимирович

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
№ _____ від «__» _____ р.

Завідувач кафедри
_____ Філіпова Т.О.
(підпис)

Захищено на засіданні ЕК № 4
Протокол № _____ від «__» _____ р.
Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Голова ЕК
_____ Мазуренко І.К.
(підпис)

Одеса – 2017

Анотація

Досліджено вплив обробок лактобацилами на схожість насіння та морфологічні характеристики проростків однодольних та дводольних декоративних рослин. Обробки насіння сумішшю штамів *L. Plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 призвели до покращення морфологічних показників стану сіянців, але позитивний вплив відрізнявся в залежності від концентрацій суміші та виду тест-рослин. На досліджені дводольні тест-рослини - гвоздику і матіолу - спостерігався кращий вплив лактобацил, ніж на однодольні рослини.

Роботу викладено на 39 сторінках, вона містить 2 таблиці та 10 рисунків. Наведено посилання на 48 джерела літератури (28 кирилицею та 20 латиницею).

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, схожість, морфологічні характеристики рослин

Influence of *Lactobacillus* treatments on seed germination and seedling morphological characteristics of monocots and dycotyledoneus flowering ornamental plants has been studied. Seed treatment with a mixture of strains of *L. plantarum* ONU 12 and *L. plantarum* ONU 311 led to improved morphological indicators of seedlings, but the positive effect was different depending on the species of test plants and concentration of the mixture. At examined dicotyledonous test plants - cloves and matiolu - observed effect of lactobacilli was better than on monocots plants.

Diploma thesis is expounded on 39 pages, it contains 2 table and 10 figures. It provides links to 48 references (28 cyrillic and 20 latinic).

Key words: *Lactobacillus plantarum*, germination, morphological characteristics of plants

ПЕРЕЛІК ТЕРМІНІВ, УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

КУО – колонієутворююча одиниця

СДВ - стерильна дистильована вода

MRS – середовище де Мана, Рогози, Шарпа

ЗМІСТ

ВСТУП	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	7
1.1. Систематичне положення бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	7
1.2. Морфологічні, біохімічні і культуральні властивості	7
1.3. Генетичні властивості	11
1.4. Антагоністичні властивості.....	12
1.5. Протеолітична активність молочнокислих бактерій	14
1.6. Ліполітична активність	15
1.7. Синтез вітамінів.....	16
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	17
2.1. Матеріали та обладнання	17
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	21
3.1. Вплив лактобацил на морфологічні показники тест-рослин.....	21
3.2. Технологія обробки рослин.....	28
3.2.1. Опис технологічної схеми отримання біологічного препарату ...	29
УЗАГАЛЬНЕННЯ	31
ВИСНОВКИ.....	33
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	34

ВСТУП

З кінця XIX століття і до теперішнього часу лактобацили (*Lactobacillus spp.*) є об'єктом наукових досліджень, оскільки з давніх часів вони використовувалися в якості стартерних культур для виробництва кисломолочних продуктів. Лактобацили широко застосовуються в різних галузях біотехнології та харчової промисловості. Основна область їх використання – виробництво кисломолочних продуктів, збагачення різних продуктів харчування, а також створення пробіотиків у формі лікарських препаратів і БАДів до їжі. На даний момент на вітчизняному ринку представлений широкий асортимент продуктів і препаратів, що містять бактерії роду *Lactobacillus*. Слід зазначити також, що бактерії роду *Lactobacillus* часто стають причиною псування продуктів харчування, як на етапі виробництва, так і на етапі зберігання [5].

Lactobacillus plantarum є однією з найкраще вивчених бактерій, що мешкають на рослинах, хоча відомі й інші епіфітні види лактобацил як *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. salivarius*. Використання лактобацил є перспективним, особливо тому, що ці мікроорганізми мають статус GRAS (Generally Recognized As Safe – “загально прийняті безпечні”), і таким чином можуть бути використані для обробок сільськогосподарських рослин без жодного шкідливого впливу на здоров'я людини [3].

L. plantarum можливо використовувати для захисту та стимуляції росту рослин, як засіб для боротьби з фітопатогенами з одночасною стимулюючою активністю. Може застосовуватися для захисту рослин від фітопатогенних бактерій *Agrobacterium tumefaciens* – збудників бактеріального раку дводольних рослин, а також для прискорення росту та підвищення довжин та маси коренів і стебел рослин [6].

Дані мікроорганізми проявляють стимулюючий вплив на ріст деяких рослин, а саме - пшениці, томатів, крес-салату, салату та редису [3]. Саме тому до нашої мети входило перевірити активність суміші цих штамів на

більш широкому спектрі рослин, а саме - на деяких однодольних і дводольних декоративних рослинах.

Метою роботи було дослідження впливу суміші штамів *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 на ріст деяких декоративних рослин.

Для досягнення мети дослідження були поставлені наступні задачі:

1. Дослідити вплив лактобацил на морфологічні показники однодольних тест-рослин.
2. Оцінити стан піддослідних дводольних рослин за обробок насіння сумішшю лактобацил.
3. Відібрати концентрації суспензії лактобацил, які найкраще впливали на ріст тест-рослин.
4. Запропонувати технологічну схему обробки рослин лактобацилами.

Об'єкт дослідження - здатність бактерій стимулювати ріст рослин.

Предмет дослідження - стимулювальні властивості штамів *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 щодо росту газонних травосумішей, гвоздики пір'ястої, матіоли дворогої.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

У рослинництві перспективною заміною хімічних стимуляторів росту є використання бактерій зі стимулювальною активністю.

Метою роботи було дослідження впливу суміші штамів *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 на ріст деяких декоративних рослин.

Було запропоновано технологічну схему обробки рослин лактобацилами, яка включає етапи отримання бактеріальних культур, приготування суміші лактобацил *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 у співвідношенні один до одного, обробку насіння тест-рослин протягом однієї години та внесення бактеріальної суспензії у ґрунт.

У якості тест-рослин було обрано однодольні - газонні суміші трав "Універсальна", "Спортивна" та "Гольф", і дводольні рослини - гвоздика пір'яста подвійна та матіола дворога.

Обробки насіння сумішшю штамів *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 призвели до покращення морфологічних показників стану сіянців. Позитивний вплив відрізнявся в залежності від концентрацій суміші та виду тест-рослин.

Найкращими розведеннями бактеріальної суміші для стимуляції росту рослин були розведення 0,1 - 0,001 %, що відповідало концентрації бактеріальних культур 10^5 - 10^7 КУО/мл.

Середня довжина надземної частини трав газонних сумішей за обробок насіння консорціумом штамів *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 збільшувалася на 5,2 - 19,6 %, а середня довжина коренів - на 5,6 - 18,1 %.

Було відмічено різницю для різних сумішей газонних трав. Так, найменший вплив на довжини коренів і надземної частини було знайдено для газону "Гольф", найбільший - на трав'яну суміш газону "Універсальний".

Але якщо порівнювати зелену масу сіянців, що вирости, то позитивний вплив було відмічено і для газону "Гольф".

На досліджені дводольні тест-рослини - гвоздику і матіюлу - спостерігався кращий вплив лактобацил, ніж на однодольні рослини. Середня довжина надземної частини збільшувалася на 28,3 - 68,7 %, а середня довжина кореня - на 14,9 - 68,7 %. Найкращий вплив спостерігався щодо матіюли.

У літературі представлено незначна кількість даних щодо наукових досліджень з обробок лактобацилами насіння декоративних рослин. Отримані нами дані підтверджують результати попередніх дослідників і розширюють коло піддослідних рослин. Необхідними є подальші дослідження у польових умовах.

ВИСНОВКИ

1. Середня довжина надземної частини трав газонних сумішей за обробок насіння консорціумом штамів *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 збільшувалася на 5,2 - 19,6 %, а середня довжина коренів - на 5,6 - 18,1 %.
2. На морфологічні показники дводольних тест-рослин гвоздики пір'ястої та матіюли дворогої суміш штамів *L. plantarum* ОНУ 12 і *L. plantarum* ОНУ 311 впливала більш позитивно, збільшуючи середню довжину надземної частини на 28,3 - 68,7 %, а середню довжину кореня - на 14,9 - 68,7 %.
3. Найкращими розведеннями бактеріальної суміші для стимуляції росту рослин були розведення 0,1 - 0,001 %, що відповідало концентрації бактеріальних культур 10^5 - 10^7 КУО/мл.
4. Запропоновано технологічну схему обробки рослин лактобацилами, яка включає етапи отримання бактеріальних культур, приготування суміші лактобацил, обробку насіння протягом однієї години та внесення бактеріальної суспензії у ґрунт.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Баженов Л.Г., Бондаренко В.М.* Изучение антагонистического действия лактобацилл на *Helicobacter pylori* // ЖМЭИ. – 1997. – №3. – С. 89 – 92.
2. *Банникова Л.А., Королева Н.С., Семенихина В.Ф.* Микробиологические основы молочного производства. – М.: Агропромиздат, 1987. – 400 с.
3. *Банникова, Л.А.* Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 256 с.
4. *Биологические свойства лактобацилл. Перспективы использования в лабораториях Роспотребнадзора экспресс-методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) при контроле качества пищевых продуктов, БАД к пище, лекарственных форм, содержащих лактобациллы / Под ред. Соловьева И.В. // Журнал МедиАль. – 2014. – С. 29 – 37.*
5. *Бойцов А.Г., Лифляндский В.Г.* Как победить дисбактериоз у детей и взрослых. – М.: изд. Олма-Пресс, 2002. – 43 с.
6. *Борунова С.Б., Фурик Н.Н., Дудко Н.В.* Подбор компонентного состава питательной среды для получения бактериального концентрата болгарской палочки // Пищевая промышленность: Наука и технология. – 2009. – № 1 (3). – С. 9–14.
7. *Ботина С.Г., Червинец Ю.В., Климина К.М., Коробан Н.В., Червинец В.М., Гаврилова О.А., Лебедев Д.В., Миронов А.Ю.* Генетическая идентификация антагонистически активных штаммов лактобацилл, выделенных из полости рта здоровых людей // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 11. – С. 43-46.
8. *Бурьян Н.И., Тюрина Л.В.* Микробиология виноделия. – Москва: Пищевая промышленность, 1979. – 271 с
9. *ГОСТ 10444.11-89.* Продукты пищевые. Методы определения молочнокислых микроорганизмов. – М., 1990. – 18 с.

10. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. – № 4. – С. 50-58.
11. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. / Под ред. проф. Е. И. Ткаченко, проф. А. Н. Суворова. – СПб.: СпецЛит, 2007. – 238 с.
12. Инструкция по приготовлению кисломолочного бифидумбактерина на молочных кухнях. – М.: Пищевая промышленность, 1987. – 10 с
13. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 326 с.
14. Кизель Н.Ф. Новый бактериальный препарат «АФ» на основе молочнокислых бактерий и его биологические свойства // Микробиол. журн. – 2000. – Т. 62, № 3. – С. 49-55.
15. Комбарова С.Ю., Погосьян Т.С., Борисова О.Ю. и др. Молекулярно-генетические методы дифференциации промышленных штаммов бифидо- бактерий и лактобацилл // Материалы конференции «Пробиотические микроорганизмы – современное состояние вопроса и перспективы использования». – М. – 2002. – С. 21.
16. Королева Н.С., Кондратенко М.С. Симбиотические закваски термофильных бактерий в производстве кисломолочных продуктов. – М.: Пищевая промышленность, 1978. – 168 с.
17. Леванова Г.Ф., Ефимов Е.И. Фенотаксономия и геносистематика лактобацилл / Под ред. проф. Г.И. Григорьевой. – Н. Новгород.: изд. университета, 2009. – 248 с.
18. Леванова Г.Ф., Муригина И.Н., Квасников Е.И. Размер генома, нуклеотидный состав и гомология ДНК некоторых лактобактерий // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1986. – № 7. – С. 26-29.
19. Ліманська Н. В., Задерей О.В., Іваниця І.І. Перспективи використання молочнокислих бактерій у захисті рослин // «Біологічні дослідження –

- 2014»: Збірник наукових праць V Всеукраїнської науково–практичної конференції молодих учених і студентів. – Житомир: Вид-во ЖДУ ім. І.Франка, 2014 – С. 54-55.
20. Мерліч А. Г., Ліманська Н. В., Жунько І. Д., Бабенко Д. О. Вплив *Lactobacillus plantarum* та *Bacillus atrophaeus* на проростання насіння та ріст проростків пшениці // Мікробіологія та біотехнологія. - 2017. - Т. 37, № 1. - С. 36 - 47.
21. Методические указания по санитарно–эпидемиологической безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. – 93 с.
22. Мюллер Г., Литц П., Мюнх Г.Д. Микробиология пищевых продуктов растительного происхождения. – М.: Пищевая промышленность, 1977. – 300 с.
23. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов: справочник / В.А. Галинкин, Н.А. Заикина, В.И. Кочеровец, И.З. Курбанова; под ред. В.А. Галинкина и В.И. Кочеровца. – СПб.: Проспект науки, 2006. – 336 с.
24. Старовойтова С.О., Горчаков В.Ю. Пробиотики – промотори життя XXI століття // Наукові вісті НТУУ «КПІ». –2006.– № 18. – С. 24 – 36.
25. Современная микробиология: прокариоты: в 2-х томах: Т. 1. пер с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – 496 с.
26. Точилина, А.Г. Биохимическая и молекулярно-генетическая идентификация бактерий рода *Lactobacillus*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.04, 03.00.07. – Н. Новгород, 2009. – 25 с.

27. 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.
28. Якушкина Н.И. Физиология растений. - М.: Владос, 2004. - С. 342 - 348.
29. Altermann E., Russel W.M., Azcarate-Peril M.A. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM // PNAS. – 2005. – Vol. 102, № 11. – P. 1306-1312.
30. Baffoni L., Accorsi M., Gaggia F., Bosi S., Marotti I., Biavati B., Gioia D.D., Dinelli G. Inoculation with “Effective Microorganisms” of *Lolium perenne* L.: evaluation of plant growth parameters and endophytic colonization of roots // Environm Engineering Management J. - 2012. - Vol. 11. - P. 110 - 114.
31. Chen Y.S., Yanagida F., Shinohara T. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure // Lett Appl Microbiol. – 2005. – Vol. 40. – 195-200.
32. de Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. A medium for the cultivation of lactobacilli // J Appl Bacteriol – 1960. – № 23. – P. 130-135.
33. 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.
34. Heng N.C., Bateup J.M., Loach D.M. et al. Influence of different functional elements of plasmid pGT232 on maintenance of recombinant plasmids in *Lactobacillus reuteri* populations *in vitro* and *in vivo* // Appl. Environ Microbiol. – 1999. – Vol. 65, № 12. – P. 5378-5385.
35. Higa T., Kinjo S. Effect of lactic acid fermentation bacteria on plant growth and soil humus formation // Proc. of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand, 1989. – P. 140 – 147.

36. Higa T., Wididana G.N. Changes in the soil microflora induced by effective microorganisms// Proc. of 1th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Khon Kaen, Thailand, 1989. – P. 161 – 165.
37. Hoda A.H., Yomna A.M., Shadia M.A.-A. *In vivo* efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant // *Life Science J.* – 2011. – Vol. 8. – P. 462 – 468.
38. Holden, M., Krasatanova S., Xue B., Pang S., Sekiya M., Momol E.A. Gonsalves D. Genetic engineering of grape for resistance to crown gall // *Acta Hort.* – 2003. – Vol. 48. – P. 14-84.
39. Kleerebezem M., Boerchorst J., Kranenburg R. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 // *PNAS.* – 2003. – Vol. 100. № 4. – P. 1990- 1995.
40. *Lactobacillus. Molecular biology From Genomics to Probiotics.* – Edited by A. Ljungh, T. Wadstrom – Causter Academic Press, UK, 2009. – 205 c.
41. Moldes A.B., Paradelo R., Rubinos D., Devesa-Rey R., Cruz J.M., Barral M.T. *Ex situ* treatment of hydrocarbon-contaminated soil using biosurfactants from *Lactobacillus pentosus* // *J Agric Food Chem.* – 2011. – Vol. 59. – P. 9443-9447.
42. Price R.J. Lee J.S. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli // *J. Milk Food Technol.* – 1970. – Vol. 3, № 1. – P. 13-18.
43. Primavesi A.M. Effect of *Lactobacillus* inoculants, organic amendments and mineral elements on yield of onion and field beans // *Proceedings of 4th Int. Conf. on Kyusei Nature Farming, Paris, 2005.* – P. 120 – 128.
44. Sadif D., 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. – Vol. 57. – P. 193-198.

45. Wang H., Yan Y., Wang J., Zhang H., Qi W. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 // PloS ONE. – doi:10.1371/journal.pone.0029452.
46. Ward L.J., Timmins M.J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction // Lett Appl Microbiol. – 1999. – Vol. 29. – P. 90-92.
47. Xu J., Ran L., Yang B., Li Z. Inhibition of *Lactobacillus* species on the germination of *Aspergillus flavus* spore // Wei Sheng Yan Jiu. – 2003. – Vol. 31. – P. 47-49.
48. Yanagida F., Chen Y.S., Shinohara T. Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil // J Gen Appl Microbiol. – 2006. – Vol. 52. – P. 21-28.