

12/p
12390
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: «Дослідження впливу антагоністичних бактерій
Bacillus megaterium ONU 500 на формування овочевих культур»

«Investigation of *Bacillus megaterium* ONU 500 antagonistic properties influence
on vegetable agricultures formation»

Виконала: студентка денної форми навчання
напряму підготовки 6.040102 Біологія
Мрачковська Юлія Олександрівна

Керівник к.б.н., доцент Крилова К.Д.
Рецензент к.б.н., доцент Підгорна С.Я.

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№ 12 від 17.05 2016 р.

Захищено на засіданні ЕК № 2

протокол ~~108~~ від 24.06 2016 р.

Оцінка Відмінно / A / 93
(за національною шкалою, шкалою ECTS, бали)

Завідувач кафедри


(підпис)

Філіпова Т.О.

Голова ЕК


(підпис)

Карпов Л.М.

Одеса – 2016

779567

АНОТАЦІЯ

Дипломну роботу «Дослідження впливу антагоністичних бактерій *B. megaterium* ONU 500 на формування овочевих культур» присвячено дослідженню здатності бактерій роду *Bacillus* впливати на проростання насіння і формувати біоплівку.

Експерименти проводили в умовах *in vitro* та *in vivo*, використовуючи такі рослини як: томати, огірки та крес-салат. Було з'ясовано, що *B. megaterium* ONU 500 має високу адгезивну властивість, позитивно впливає на дводольні рослини, які характеризуються кращими зовнішніми ознаками, більшою біомасою та кількістю пророслого насіння, в порівнянні із контролем.

Роботу викладено на 37 сторінках друкованого тексту. Представлено 6 рисунків, 2 таблиці, наведено посилання на 48 публікацій: з них 18 кирилицею та 30 латиницею.

Ключові слова: *B. megaterium*, *PGPB*, біоплівка, рослинностимулюючі властивості.

ANNOTATION

Thesis "Investigation of antagonistic bacteria *B. megaterium* ONU 500 for forming vegetables" dedicated to the research ability of bacteria of the genus *Bacillus* affect seed germination and form a biofilm.

Experiments were carried out under conditions *in vitro* and *in vivo*, using such plants as tomatoes, cucumbers and watercress. It was found that *B. megaterium* ONU 500 has a high adhesive property, a positive effect on dicotyledonous plants characterized by better external features, greater biomass and the number of sprouted seeds compared to control.

Diploma thesis is expounded on 37 pages, it contains 2 tables and 6 figures. It provides links to 48 references (18 cyrillic and 30 latinic).

Key words: *B. megaterium*, *PGPB*, biofilm, plant grow promoting properties.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Загальна характеристика бактерій роду <i>Bacillus</i>	7
1.2. Характеристика <i>B. megaterium</i>	9
1.3. Стимуляція росту рослин бактеріями роду <i>Bacillus</i>	11
1.4. Роль бактеріальних біоплівочок у стимуляції росту рослин.....	12
1.5. Біопрепарати на основі бактерій роду <i>Bacillus</i>	15
2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	17
2.1. Культивування штаму <i>B. megaterium</i> ONU 500.....	17
2.2. Встановлення впливу штаму <i>B. megaterium</i> ONU 500 на паростки рослин <i>in vitro</i>	17
2.3. Встановлення впливу штаму <i>B. megaterium</i> ONU 500 на паростки томатів <i>in vivo</i>	18
2.4. Формування біоплівки <i>B. megaterium</i> ONU 500 на коренях рослин <i>Lepidium sativum</i> L.....	18
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	20
3.1. Вплив штаму <i>B. megaterium</i> ONU 500 на всхожість овочевих культур <i>in vitro</i>	20
3.2. Вплив штаму <i>B. megaterium</i> ONU 500 на ростові характеристики овочевих культур <i>in vitro</i>	24
3.3. Вплив штаму <i>B. megaterium</i> ONU 500 на ростові характеристики томатів <i>in vivo</i>	26
3.4. Формування біоплівки штамом <i>B. megaterium</i> ONU 500 на коренях рослин <i>Lepidium sativum</i> L.....	29
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	30
ВИСНОВКИ.....	31
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	32

Прийняті скорочення та аббревіатури

ГКІ – гострі кишкові інфекції

ЗЗР – засоби захисту рослин

МПА – м'ясо-пептонний агар

МПБ – м'ясо-пептонний бульйон

ISR – індукований системний опір

PGPB – plant growth promoting bacteria

ВСТУП

Для одержання високоякісної органічної продукції рослинництва відповідно до Закону України «Про виробництво та обіг органічної сільськогосподарської продукції та сировини» від 12.02.2015, актуальним являється впровадження в систему захисних заходів біопрепаратів з живими культурами мікроорганізмів із заданими властивостями, які можливо контролювати на всіх етапах виробництва [8].

Інтенсифікація землеробства і промислові технології обробки сільськогосподарських культур посилюють вимоги до ефективності, надійності та безпеки засобів захисту рослин (ЗЗР) для навколишнього середовища. В сучасних умовах обробки сільськогосподарських культур більш ніж на 80% площ застосовують хімічні ЗЗР і тому залишки хімікатів виявляють в 40% зразків овочевих, плодових та зернових культур. Щорічно у світі реєструється 25 млн. випадків отруєння пестицидами, в т. ч. більше 20 тис. із смертельним результатом.

Однією з негативних сторін застосування традиційного хімічного методу захисту слід визнати появу резистентних популяцій шкідливих організмів до пестицидів, [10] а це призводить до необхідності збільшення кількості обробок та підвищення їх концентрації або ротації пестицидів на більш агресивні.

При зростаючому антропогенному навантаженні на агроценози і нераціональному використанні агрохімікатів, особливої актуальності набуває використання екологічно чистих біопрепаратів, основою яких являються мікроорганізми, виділені із природних екологічних ніш, які не володіють канцерогенними, тератогенними, кумулятивними властивостями. Це сприяє збільшенню швидкості кругообігу поживних елементів, зниженню чисельності фітопатогенної мікробіоти та отриманню стабільних врожаїв. Відбувається збільшення обсягів виробництва рослинної продукції високої якості за рахунок впровадження екологічно безпечних технологій [4].

Серед найбільш широко вивчених та впроваджених до застосування в біометоді являються біологічні засоби, основу яких становлять бактерії роду *Bacillus*. Вони активно колонізують кореневу систему рослин та, продукуючи фітогормони, виступають в ролі антагоністів широкого спектру шкочинних фітопатогенів. Такі фізіологічні ознаки як: здатність до формування спор, багатшарова клітинна стінка, секреція пептидних антибіотиків та позаклітинних ферментів – сприяють повсюдному поширенню, виживаності та підвищенню родючості сільськогосподарських культур.

PGPR-штами бактерій стимулюють ріст і розвиток рослин не тільки за рахунок утворення біологічно активних речовин, але і за рахунок здатності до азотфіксації, покращенню водневого та мінерального харчування рослин, запобіганню чи зменшенню росту фітопатогенів, завдяки можливості синтезувати речовини бактерицидної та фунгіцидної дії [21].

Метою роботи було дослідження впливу антагоністичних бактерій *B. megaterium* ONU 500 на формування томатів та огірків.

Для досягнення вказаної мети були поставлені наступні задачі:

1. Встановити вплив штаму *B. megaterium* ONU 500 на всхожість насіння томатів та огірків в умовах *in vitro*;
2. Визначити оптимальну стимулюючу концентрацію суспензії *B. megaterium* ONU 500 для томатів та огірків *in vitro*;
3. Визначити оптимальну стимулюючу концентрацію суспензії *B. megaterium* ONU 500 для томатів *in vivo*;
4. Встановити здатність формувати біоплівку штамом *B. megaterium* ONU 500 на коренях рослин *Lepidium sativum* L.

Об'єктом дослідження – вплив антагоністичних бактерій *B. megaterium* ONU 500 на розвиток овочевих культур.

Предмет дослідження – рослино-стимулюючі властивості *B. megaterium* ONU 500.

ВИСНОВКИ

1. В дослідках *in vitro* штам *B. megaterium* ONU 500 збільшує всхожість насіння томатів на 10-16% та огірків на 7-20%.
2. В дослідках *in vitro* обробка 3% та 5% суспензією штаму *B. megaterium* ONU 500 веде збільшення ваги надземної і підземної частини паростків томатів на 98% і 125%, та 78% і 204%, відповідно.
3. В дослідках *in vitro* обробка 5% суспензією штаму *B. megaterium* ONU 500 веде збільшення ваги надземної і підземної частини паростків огірків на 30% і 44%, відповідно.
4. В дослідках *in vivo* обробка 2% та 3% суспензією штаму *B. megaterium* ONU 500 веде покращання ростових характеристик паростків томатів.
5. Антагоністичний штам *B. megaterium* ONU 500 здатен формувати біоплівку на коренях *Lepidium sativum* L. на 3-4 плюси.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Африкян Э. Г., Тахтаджян А. Л. Бактерии и актиномицеты. – М. : Просвещение, 1974. – 487 с.
2. Браун В. Генетика бактерий. – М. : Наука. – 1968. – 446 с.
3. Бабенко. Д, Дубровіна О., Крилова К. Порівняння методів визначення антагоністичної активності бактерій роду *Bacillus in vitro* // Молодь і поступ біології: міжнародна наукової конференції студентів та аспірантів (Львів, 20-23 квітня, 2015 р.) : тез. допов. – Львів: Львівський національний університет імені І. Франка, 2015. – С 322 – 323.
4. Внукова М. А., Титова Е. М. Влияние биопрепаратов на продуктивность ячменя // Весник ОрелГАУ. – 2012 – Т. 37, № 4. – С. 58 – 60.
5. Галкін М. Б., Ліманська Н. В., Філіпова Т. О., Іваниця О. В. Формування біоплівки бактеріями *Lactobacills Plantarum* на коренях рослин *Lepidium Sativum* L. // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. № 3. – С. 34 – 43.
6. Генетика и биотехнология / Клаус Д., Фритце Д. – Под ред. К. Харвуда. // М. : Мир, 1992. – 530 с.
7. Драговоз І. В., Леонова С. В., Лапа С. В., Данкевич Л.А.,Падалко С. Ф., Бобик Л. В., Авдєсва Л.В. Фітостимулювальна, антагоністична активність та біологічна ефективність штаму *Bacillus subtilis* ІМВ В-7243 // Мікробіологія і біотехнологія. – 2014. № 4. – С. 77 – 87.
8. Дятлова К. Д. Микробные препараты в растениеводстве // Соросовский образовательный журнал. – 2001. – Т. 7, № 5. – С. 17–22.
9. Закатаева Н. П., Юсупова Ю. Р., Романенков Д. В., Ливиниц В. А. Современные методы генетического конструирования промышленных штаммов на основе бактерий рода *Bacillus* // Биотехнология. – 2013. – Т. 44, № 5. – С. 8 – 23.
10. Карпова Г. А., Миронова М. Е. Эффективность обработки семян ячменя регуляторами роста и бактериальными препаратами // Земледелие. 2009. – Т. 44, №3. – С. 39–40.

11. Мелентьев А. И. Аэробные спорообразующие бактерии рода *Bacillus* Cohn. как агенты биологического контроля болезней растений : дис. ... доктор биол. наук: 03.00.07, 03.00.04. – Уфа, 2000. – 302 с.
12. Мельникова Н. Н., Булавенко Л. В., Курдиш И. К., Титова Л. В., Коць С. Я. Формирование и функционирование бобово-ризобияльного симбиоза у растений сои при интродукции штаммов родов *Azotobacter* и *Bacillus* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 427 – 432.
13. *Определитель бактерий Берджи* / Хоулт Дж, Крига Н, Стина П. – Под ред. С. Уильямса. – Т-2, перевод с английского. // М. : Мир, 1997. – 567 с.
14. Похиленко В. Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – Т. 44, № 2. – С. 20 – 41.
15. *Словник термінів у мікробіології: українсько-російський, російсько-український* : близько 3000 термінів / В. О. Іваниця, В. С. Підгорський, Н. Г. Юргелайтіс, Т. В. Бурлака, Б. П. Мацелюх. – К.: Наукова думка, 2006. – 200 с.
16. Сорокулова И. Б., Рыбалко С. Л., Руденко А. А. Пробиотики – принципиально новый подход к лечению бактериальных и вирусных инфекций. – Киев, 2006. – С. 36.
17. Тоцький В. М. Генетика: Підручник для студентів біологічних спеціальностей університетів. – Одеса: Астропринт, 2008. – 710 с.
18. Ущегов А. Г. Проблемы защиты растений от вредителей на мелиоративных землях // Защита растений. – 1994. – Т. 64, № 3. – С. 57 – 58.
19. Arkhipova T. N., Prinsen E., Veselov S. U., Martynenko E. V., Melentiev A. I., Kudoyarova G. R. Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil // Plant Soil. 2007. – Vol. 292. – P. 305 – 315.
20. Ash C., Farrow J., Wallbanks S., Collins M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences // Lett. Appl. Microbiol. 1991 – № 13. – P. 202 – 206.

21. *Barriuso J, Solano B.* Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria // *Journal of Plant nutrition.* – 2008. – P. 135 – 144.
22. *Charest M., Beauchamp C., Antoun H.* Effects of the humic substances of deinking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum* // *Microbiology Ecology.* – 2005. – Vol. 52, №. 2. – P. 219 – 227.
23. *Costerton W., Veeh R., Shirtliff M.* The application of biofilm-science to the study and control of chronic bacterial infections // *Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 112. – P. 1466 – 1477.
24. *Costerton W.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections *Greenberg Science.* – 1999. – Vol. 284. – P. 1318 – 1321.
25. *Debra W.* Biofilm Formation and Dispersal under the Influence of the Global Regulator CsrA of *Escherichia coli* // *Journal of Bacteriology.* – 2002. – Vol. 184 (1). – P. 290 – 301.
26. *Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y.* Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2003. – Vol. 22. – P. 107 – 149.
27. *Dodd I. C., Zinovkina N. Y., Safronova V. I., Belimov A. A.* Rhizobacteria-mediated of plant hormone status // *Ann. Appl. Biol.* 2010. – Vol. 157. – P. 361 – 379.
28. *Earl A., Losick R., Kolter R.* *Bacillus subtilis* genome diversity // *Journal bacteriological.* – 2007. – Vol. 189. – P. 1163 – 1170.
29. *Earl A., Losick R., Kolter R.* Ecology and genomics of *Bacillus subtilis* *Trends in Microbiology.* – 2008 – №6. – P. 269 – 270.
30. *Federici B. A.* The future of microbial insecticides as vector control agents *American Mosquito Control Association.* – 1995. – Vol. 11. – P. 260 – 268.
31. *Gutiérrez Macero F., Probanza A., Ramos B., Colyn Flores J., Luc García J.* Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth

promoting rhizobacteria // Journal of Plant Nutrition. – 2003. – Vol. 26, №. 5. – P. 1101 – 1115.

32. Han H., Supanjani K., Lee K. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber // Plant soil and Environment. – 2006. – Vol. 52, №. 3. – P. 130 – 136.

33. Joseph B., Patra R., Lawrence R. Characterization of plant growth promoting Rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L) // International Journal of Plant Production. – 2007. – Vol. 22, № 1. – P. 141 – 152.

34. Kaymak H., Yarali F., Guvenc I., Donmez M. The effect of inoculation with plant growth Rhizobacteria (PGPR) on root formation of mint (*Mentha piperita* L.) Cuttings // African Journal of Biotechnology. – 2008. – Vol. 24, №. 7. – P. 4479 – 4483.

35. Kilian M., Steiner U., Krebs B., Junge H., Schmeiedeknecht G., Hain R. *Bacillus subtilis* – mode of action of microbial agent enhancing plant vitality // Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer. – 2000. – Vol. 11. – P. 72 – 93.

36. Kloepper W., Lifshitz R., Zablotowicz R. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity // Trends in Biotechnology. – 1989. – Vol. 37, №. 2. – P. 39 – 43.

37. Knovles B. H., Ellar D. J. Characterization and partial purification of a plasma membrane receptor for *Bacillus* // J.Cell. Sci. – 1986. – Vol. 84 – P. 221 – 236.

38. Kudoyarova G. R., Melentiev A. I., Martynenko E. V., Timergalina L. N., Arkhipova T. N., Shendel G. V., Kuz'mina L. Y., Dodd I. C., Veselo S. Y. Cytokinin producing bacteria stimulate amino acid deposition by wheat roots // Plant Physiol. Biochem. 2014. – Vol. 83. – P. 285 – 291.

39. Kunst F. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* // Unite de Biochimie Microbienne. – 1997. – P. 249 – 256.

40. Ohkama-Ohtsu N., Wasaki J. Recent progress in plant nutrition research: cross-talk between nutrients, plant physiology and soil microorganisms // Plant Cell Physiol. – 2010. – Vol. 51. – P. 1255 – 1264.

41. Orhan E., Esitken A., Ercisli S., Turan M., Sahin F. Effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient contents in organically growing raspberry // *Scientia Horticulturae*. – 2006. – Vol. 111, № 1. – P. 38 – 43.
42. Probanza A., Lucas Garcia J., Ruiz Palomino M., Ramos B., Gutiérrez Macero J. *Pinus pinea* L. seedling growth and bacterial rhizosphere structure after inoculation with PGPR *Bacillus* (*B. licheniformis* CECT 5106 and *B. pumilus* CECT 5105) // *Applied Soil Ecology*. – 2002. – Vol. 20, № 2. – P. 75 – 84.
43. Skerman V., Gowan V., Sneath P. Caratteri di alcuni nuovi generi di Batteriacee // *Syst. Bacteriol.* – 1980. – Vol. 30. – P. 225 – 420.
44. Sorokulova I. Preclinical testing in the development of probiotics: a regulatory perspective with *Bacillus* strains as an example // *Clinical Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 46. – P. 92 – 96.
45. Supanjani K., Han H., Jung J., Lee K. Rock phosphate-potassium and rocksolubilising bacteria as alternative, sustainable fertilisers // *Agronomy for Sustainable Development*. – 2006. – Vol. 26, № 4. – P. 233 – 240.
46. Tetz V. V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies // *J. Med. Microbiol. Lett.* – 1999. – № 5. – P. 426–436.
47. Trautner B. W. Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection // *American Journal of Infection Control*. – 2004. – Vol. 32. – P. 177 – 183.
48. Watnick P., Kolter R. Biofilm, cityofmicrobes // *J. Bacteriol.* – 2000. – P. 2675–2679.

15.05.16.

