

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

Дипломна робота

на здобуття ОКР «Бакалавр»

ДЕСТРУКЦІЯ ПОЖНИВНИХ ЗАЛИШКІВ ГРИБАМИ

РОДУ *TRICHODERMA*

The destruction of post harvest remains by the fungi of *Trichoderma* genus

Виконав: студент IV курсу

денної форми навчання

напряму підготовки

6.051401 Біотехнологія

Кузьменко Олександр

Олександрович

Керівник: к.б.н., доцент

Зінченко Оксана Юріївна

Рецензент: к. б. н., доцент

Сорокін Андрій Вікторович

Рекомендовано до захисту:

Протокол засідання кафедри

№ 12 від «14» 05.2016 р.

Захищено на засіданні ЕК № _____

Протокол № 10 від «17» 06.2016 р.

Оцінка добре 10 1 80

(за національною шкалою, шкалою ECTS, бал)

Завідувач кафедри

[підпис]
(підпис)

(прізвище та ініціали)

Голова ЕК

[підпис]
(підпис)

Мазуренко Т.К.
(прізвище та ініціали)

Одеса – 2016

779542

АНОТАЦІЯ

Дипломну роботу «Деструкція поживних залишків грибами роду *Trichoderma*» присвячено дослідженню здатності мікроскопічних грибів роду *Trichoderma* до деструкції поживних залишків соломи. Целюлозолітичну активність спостерігали на агаризованому середовищі Гетчинсона та поживних залишках соломи. Досліджено та відібрано два активні штами: *T. viride* шт. А і *T. viride* шт. 2, що схильні до біодеградації фільтрувального паперу. При обробці поживних залишків 10-ма мл суспензії, яка містила 500 мкл трьохдобової культури *Trichoderma* одноразово, на 30 добу, спостерігали розрихлення структури, втрату форми та зміну забарвлення пшеничної соломи у порівнянні із розведеннями 1:20000 та 1:200. Роботу викладено на 35 сторінках друкованого тексту. Представлено 5 власних рисунків, одну таблицю, наведено посилання на 31 публікації кирилицею та 13 латиницею. **Ключові слова:** *гриби роду Trichoderma, поживні залишки, біодеградація целюлози.*

The diploma work "The crop residues destruction by fungi of the genus *Trichoderma*» devoted to the ability of microscopic fungi of the genus *Trichoderma* to the plant straw residues destruction. Cellulosolytic activity was observed on the Hutchinson's agar medium and residue straw. Were investigated and selected two active strain: *T. viride* st. A and *T. viride* st. 2, which are capable to biodegrade the filter paper. In residue straw processing by 10 ml working solution residue containing 500 mcl of a two-day culture of *Trichoderma* single time, at day 30 was observed loosening structure, loss of shape and color change of the wheat straw, compared with dilutions of 1: 20,000 and 1: 200.

The thesis is presented on 35 pages of printed text. Submitted 5 own drawings, one table, provides links to 31 publications in cyrillic and 13 in latin.

Keywords: *fungi of the genus of Trichoderma, crop residues, cellulose biodegradation.*

ЗМІСТ

	Стр.
ВСТУП.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	7
1.1. Використання соломи як добрива	7
1.2. Екологічне значення поживних залишків.....	8
1.3. Характеристика грибів роду <i>Trichoderma</i>	13
1.3.1. Морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості.....	13
2. МІСЦЕ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	19
2.1. Розмноження маточних культури штамів <i>Trichoderma</i>	19
2.2. Визначення целюлозолітичної активності грибів.....	20
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	23
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	28
ВИСНОВКИ.....	30
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	31

ПРИЙНЯТІ СКОРОЧЕННЯ ТА АБРЕВІАТУРИ

СА – сусло-агар;

ЧП – чашка Петрі;

СС – середовище Сабуро;

КУО – колонієутворюючі одиниці;

ЦЛА – целюлозолітична активність.

ВСТУП

Біодеструкція поживних залишків – альтернатива традиційному спалюванню рослинних рештків, що, на превеликий жаль, практикується в агропромисловому комплексі України. Адже мікробні групи формуються на певному агрофоні, і будь-яке хіміко-техногенне навантаження ґрунту може супроводжуватися змінами його структурно-функціональних особливостей, збідненням видового складу, зниженням або випадінням із ценозу агрономічно корисних груп мікроорганізмів [3]. У цьому випадку мікробіологічне діагностування ґрунту дає можливість визначити реакцію окремих популяцій мікроорганізмів на несприятливі умови (техногенне забруднення ґрунту тощо) та обґрунтувати доцільність всіх заходів, спрямованих на відтворення ґрунтової родючості. Наприклад, збереження рослинних рештків, на противагу їх традиційному спалюванню, допомагає збагатити хімічну складову ґрунту органікою та слугує живленню і активізації діяльності біоти. Саме органічні залишки і є матеріалом для утворення гумусу. Найактивнішу роль у цьому відіграють мікроорганізми, які здатні продукувати ферменти, що руйнують лігнін, целюлозу, клітковину, білки рослинних залишків [23]. За рік в оптимальних умовах накопичується до 5 тонн мікробної маси, яка теж збагачує органікою ґрунт [8]. Гумус та продукти розкладання органіки перетворюються знову ж таки мікроорганізмами у розчинні у воді та доступні для рослин речовини. Крім того, мікроорганізми активно мобілізують, тобто переводять у розчинну форму, мінерали ґрунту: фосфор, магній, кальцій, сірку, залізо, бор, молібден, цинк, залізо та ін. [1, 2]. Трансформація органічної речовини мікроорганізмами зумовлює підвищення біологічної активності ґрунту.

Задача аграріїв – повернути родючість ґрунтам, беручи приклад з природи, в зв'язку з чим необхідно постійно підтримувати активний фон корисної мікробіоти ґрунту обробкою його та рослинних рештків препаратами бактеріального походження, до складу яких входять: активні

грунтові мікроорганізми – продуценти целюлаз та інших ферментів; бактерії-антагоністи патогенних для рослин грибів та бактерій; фосфатмобілізуючі та азотофіксуючі бактерії; продукти життєдіяльності вказаних мікроорганізмів (біофунгіциди, фітогормони, ферменти, вітаміни, амінокислоти).

Наразі в країнах СНД йде активна робота по створенню засобів для утилізації пожнивних залишків, та наявні продукти представлені засобами хімічного синтезу, що робить актуальною розробку комплексного мікробного препарату і його застосування для розкладання пожнивно-коренових залишків соломи, пригнічення патогенної мікробіоти і підготовки ґрунту до посівів [9]. В цьому контексті перспективним є поєднання в одному препараті мікроорганізмів, які здатні пригнічувати комплекс домінуючих фітопатогенів з одночасною утилізацією пожнивних залишків на полях після збору врожаю, що має сприяти біологічній трансформації рослинних залишків і підтриманню родючості ґрунтів [15, 35, 33].

Отож, перспективним є пошук мікроорганізмів, що володіють широким спектром ферментативних систем для трансформації пожнивних залишків у легкодоступні для рослин елементи.

Метою роботи було визначення здатності мікроскопічних грибів роду *Trichoderma* до деструкції пожнивних залишків соломи.

Для досягнення вказаної мети було необхідним вирішення наступних задач:

1. Відібрати перспективні ізоляти, здатні до деструкції целюлози;
2. Визначити здатність відібраних штамів у консорціумі до деструкції пшеничної соломи в дослідах *in vitro*.

Об'єктом дослідження є утилізація пожнивних залишків.

Предмет дослідження – деструкція целюлози мікроскопічними грибами роду *Trichoderma*.

ВИСНОВКИ

1. На середовищі Гетчинсона в дослідях *in vitro* встановлено целюлозолітичну активність п'яти штамів роду *Trichoderma*.
2. Досліджено та відібрано два активні штами: *T. viride* шт. А і *T. viride* шт. 2, що схильні до біодеградації фільтрувального паперу.
3. Збільшення концентрації грибів роду *Trichoderma* пришвидшує процес утилізації поживних залишків соломи.
4. При обробітку поживних залишків консорціумом п'яти штамів грибів роду *Trichoderma* одноразово на 30 добу спостерігали розрихлення структури, втрату форми та зміну забарвлення пшеничної соломи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Андреюк Е. В., Вапагурова Е. Н.* Основы экологии почвенных микроорганизмов. – К.: Наукова думка, 1992. – 357 с.
2. *Андреюк Е. Н., Иутинска Г. А., Дульгеров А. Н.* Почвенные микроорганизмы и интенсивное землепользование. – К.: Наукова думка, 1988. – С. 219.
3. *Андрієвська В. М., Баранецька, Н. П.* Екологічні наслідки спалювання рослинних решток // Екологія та екологічна безпека. – Підсумкова науково-практична конференція II туру Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт з природничих, технічних і гуманітарних наук за галуззю науки (м. Донецьк, 13-14 березня, 2013 р.) збірка тез доповідей. – Донецьк, 2013. – С. 57.
4. *Барсук Д. О., Савченко Д. С., Криськів О. С, Коваленко С. М.* Антимікробна активність стереоізомерів похідних холанової кислоти в порівнянні з холевою кислотою // Annals of Mechnikov Institute. – 2014. – № 3. – С. 29.
5. *Воробьева С. А.* Земледелие с основами почвоведения и агрохимии. – М.: Колос, 1981. – 431 с.
6. *Гудзь С. П., Гнатуш С. О.* Практику з мікробіології. – 2013. – С. 165.
7. *Кирик М. М., Ковалишин А. Б., Ковалишина Г. М.* Мікобіота насіння озимої пшениці // Вісн. аграр. науки. – 2010. – № 1. – С. 30 – 32.
8. *Кирюшин В. И.* Экологизация земледелия и технологическая политика. – М.: МСХА, 2000 – 473 с.
9. *Кочубей М. И.* Свойства и плодородие орошаемых почв разного генезиса // Совещание по проблемам повышения плодородия почв. – Ташкент, 1982. – С. 112 – 117.
10. *Кравченко Н. О., Копилов Є. П., Головач О. В., Дмитрук О. М.* Сільськогосподарська мікробіологія. – 2014. – №. 20. – С. 24.

- 11.Крючкова Л. В. Мікофлора насіння пшениці // Захист рослин. – 1999. – №10. – С. 6.
- 12.Лыков А .Д. Гумус и плодородие почвы. – М.: Моск. рабочий. – 1985. – 192 с.
- 13.Лыков А. М .Земледелие с почвоведением. – М.: Агропромиздат, 1990. – 464 с.
- 14.Лобова О. В. Сільськогосподарська біотехнологія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 6.051401 «Екобіотехнологія» . – 2014, Київ. – С. 4.
- 15.Маслак Д. В., Серая Т. М. Влияние комплексного микробного удобрения Жыщень на темпы разложения соломы и пожнивно-корневых остатков // Труды БГУ. – 2014, Т. 9, ч. 1.
- 16.Мирчинк Т. Г. Почвенная микология. – М.: МГУ, 1988. – 205 с.
- 17.Мишустин Е. Н. Ассоциации почвенных микроорганизмов. – М.: Наука, 1905. – 26 с.
- 18.Монастырский О. А. Биозащита зерновых культур от токсикогенных микроорганизмов // Защита и карантин растений. – 2003. – № 2. – С. 5-8.
- 19.Муха В. Д. Агрономия: учебник для вузов. – Москва: Колос, 2001. – 504 с.
- 20.Наумов Н. А. Анализ семян на грибную и бактериальную инфекцию. – Л. : Колос, 1970. – 208 с.
- 21.Орлова О. В., Андронов Е. Е., Воробьев Н. И., Колодяжный А. Ю., Москалевская Ю. П., Патыка Н. В., Свиридова О. В. Состав и функционирование микробного сообщества при разложении соломы злаковых культур в дерново-подзолистой почве // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, № 3. – С. 305 – 314.
- 22.Ретьман С. В. Мікрофлора зерна пшениці озимої // Карантин і захист рослин. – 2008. – № 2. – С. 2-3.

- 23.Рибалкін М. В., Філімонова Н. І., Шевельова Н. Ю., Гаман Д. В. Біотехнологічне обґрунтування актуальності розробки нового імунодіагностичного препарату на основі біомаси грибів *Candida albicans* // Український біофармацевтичний журнал. – 2010. – № 6. – С. 77.
- 24.Саєнко М. П. Управління поживними рештками в технологій min-till та no-till на прикладі підприємств Криму // Зерно. – 2009. – С. 105-107.
- 25.Сафонова А. Ф. Системы земледелия: учебник для вузов. – М.: Колос, 2006. – 447 с.
- 26.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.
- 27.Смирнов В. В., Зайченко А. М. Микотоксины: фундаментальные и прикладные аспекты // Современные проблемы токсикологии. – 2000. – № 1. – С. 5-12.
- 28.Тейт Р. Органическое вещество почвы: Биологические и экологические аспекты. – М.: Мир. – 1991. – 400 с.
- 29.Титриметрические методы анализа. Часть 1: Общие положения. Кислотно-основное титрование. Дихроматометрия / Т. Н. Ермолаева. – Липецк.: ЛГТУ, 2004. – 33 с.
- 30.Харченко С. В., Башта М. О., Волощук Н. М., Гриби – антагоністи мікобіоти колосу озимої пшениці // Актуальные проблемы иммунитета и защиты сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей: межд. научно-практическая конференция (г. Одесса, 11–14 сентября, 2007 г.): тез. докл. – Одесса, 2007. – С. 64.
- 31.Харченко С. М. Кількісний і видовий склад мікобіоти кормів та її токсигенні властивості // Наук. вісн. НАУ. – 2006. – Вип. 102. – С. 13 – 17.

32. Ait-Lahsen H., Soler A., Rey M., De La Cruz J., Monte E. An antifungal Exo- α -1,3-glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67. – P. 5833-5869.
33. Benitez T, Rincon A. M, Limon M. C, Codon A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains // Microbiol. – 2004. – Vol. 7. – P. 249-260.
34. Brotman Y., Briff E., Viterbo A., Chet I. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Trichoderma*, in plant root colonization. // Plant Physiol. – 2008. – Vol. 147. – P. 779-789.
35. Dababat A. A., Sikora R. A., Hauschild R. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato // Commun Agric Appl Biol Sci. – 2006. – Vol. 71. – P. 953-961.
36. Djonovic S., Pozo M. J., Dangott L. J., Howell C. R., Kenerley C. M. A proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance // Plant Physiol. – 2007. – Vol. 145. – P. 875-889.
37. Druzhinina S. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data // The Mycological Society of Japan and Springer. – 2006. – 254 p.
38. Gierasimiuk J., Strzelczyk E. Cellulolytic and pectolytic activity of bacilli isolated from the root-free soil and the rhizosphere of different forest trees // Folia forest. – 2003. – № 45. – P. 15-26.
39. Howell C., Harman G., Kubicek C. The role of antibiosis in biocontrol // Enzymes, biological control and commercial application. – 1998. – Vol. 22. – P. 173-184.
40. Lorito M., Woo S., Ruocco M., Marra R., Ambrosino P., Vinale F., Ferraioli S., Soriente I., Gigante S., Lanzuise S. The molecular cross-talk between *Trichoderma*, plants and pathogens provides new tools for disease control // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*. – Vienna, Austria, 2006. – P. 142-146.

41. Lynd L., Weimer P., Zyl W., Pretorius I. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2002. – Vol. 66. – P. 506–577.
42. Melander C., Bengtsson M., Schagerlof H., Tjerneld F., Laurell T., Gorton L. Investigation of micro-immobilised enzyme reactors containing endoglucanases for efficient hydrolysis of cellodextrins and cellulose derivatives // Analytica Chimica Acta. – 2005. – Vol. 550. – P. 182–190.
43. Soriente I., Ferraioli S., Woo S., Ciliento R., Marra R., Vinale F., Ambrosino P., Ruocco M., Turra D., Lanzuize S., Gigante S., Scala F., Lorito M. Integrated use of *Trichoderma harzianum* strains T22 and T39 with cell wall degrading enzymes to control plant diseases // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*. – Vienna, Austria, 2006. – P. 157-160.
44. Steyaert J., Weld R., Carpenter M., Glare T., Herrera-Estrella A., Stewart A. The intrinsic influence of ambient pH on conidiation in biocontrol species of *Trichoderma* // 9th International Workshop on *Trichoderma* and *Gliocladium*. – Vienna, Austria, 2006. – P. 230-234.

16.05.2008

