

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА

Біологічний факультет

Кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології

**Дипломна робота**  
**бакалавра**

на тему: **«Особливості продукції індоліл-3-оцтової кислоти бактеріями  
роду *Pseudomonas*»**

«The product features of indole-3-acetic acid by *Pseudomonas* bacteria»

Виконала: студентка денної форми  
навчання  
напряму 6.051401 Біотехнологія  
Дойчева Діана Дмитрівна

**Науковий керівник**  
кандидат біологічних наук, доцент  
Русакова М. Ю.

**Рецензент:**  
кандидат біологічних наук, доцент  
Паузер О. Б.

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  
\_\_\_\_\_  
(підпис)

Одеса – 2017

## Анотація

Роботу було присвячено дослідженню синтезу індолил-3-оцтової кислоти деякими представниками роду *Pseudomonas* та впливу на цей процес *in vitro* окремих факторів та проведено в Біотехнологічному науково-навчальному центрі ОНУ імені І. І. Мечникова.

Досліджувані штами псевдомонад *Pseudomonas fluorescens* ОНУ 303, *Pseudomonas chlororaphis* ОНУ 304, *P. chlororaphis* ОНУ 305, *P. chlororaphis* ОНУ 306 були здатними утворювати індолил-3-оцтову кислоту. Найбільш значне накопичення індолил-3-оцтової кислоти відбувалось на п'яту добу культивування досліджуваних мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі. Додавання триптофану у культуральне середовище викликало підвищення синтезу індолил-3-оцтової кислоти штамами псевдомонад.

Роботу викладено на 33 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 5 рисунками. Наведено посилання на 39 джерело літератури (31 кирилицею та 8 латиницею).

**Ключові слова:** *індолил-3-оцтова кислота, Pseudomonas spp., триптофан, компоненти поживних середовищ*

The study of the indole-3-acetic acid synthesis by some *Pseudomonas* representative genus and the influence on this process *in vitro* of certain factors and was carried out at the the Biotechnology Research and Training Center I. I. Mechnikov National University.

The investigated strains of pseudomonads (*Pseudomonas fluorescens* ONU 303, *Pseudomonas chlororaphis* ONU 304, *P. chlororaphis* ONU 305, *P. chlororaphis* ONU 306) were able to form indole-3-acetic acid. The most significant accumulation of indole-3-acetic acid occurred on the fifth day of cultivation of the studied microorganisms in a liquid nutrient medium. The addition of tryptophan to the culture medium caused an increase in the synthesis of indole 3-acetic acid by pseudomonad types.

Diploma thesis is expounded on 33 pages, it contains 5 figures. It provides links to 39 references (31 cyrillic and 8 latinic).

**Key words:** *indole-3-acetic acid, Pseudomonas spp., tryptophan, culture medium components*

## ЗМІСТ

Вступ.....	5
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	7
1.1. Зальна характеристика мікробіоти рослин .....	7
1.2. Взаємодія мікроорганізмів з рослинами .....	10
1.3. Створення бактеріальних біопрепаратів для використання у сільському господарстві .....	12
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	16
2.1. Якісне визначення індоліл-3-оцтової кислоти .....	16
2.2. Кількісне визначення індоліл-3-оцтової кислоти .....	17
2.3.Визначення інтенсивності утворювання індоліл-3-оцтової кислоти за впливу окремих факторів навколишнього середовища	18
3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ІХ ОБГОВОРЕННЯ.....	19
3.1. Здатність до утворення індоліл-3-оцтової кислоти досліджуваними представниками роду <i>Pseudomonas</i> .....	19
3.2 Порівняльна характеристика вихідної продукції індоліл-3- оцтової кислоти досліджуваними штамми псевдомонад .....	21
3.3 Вплив окремих факторів на продукцію індоліл-3-оцтової кислоти досліджуваними штамми псевдомонад .....	22
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	27
ВИСНОВКИ.....	29
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ.....	30

## Список скорочень

I-3-OK – індолил-3-оцтова кислота

КУО – колоніє утворююча одиниця

МПА – м'ясо-пептонний агар

ТРИ – триптофан

PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (Ризобактерії, що сприяють  
росту рослин)

## ВСТУП

Зростаюче техногенне навантаження на навколишнє середовище примушує нас створювати якісно нові, біологічні, технології у рослин від шкідників та стресорів [8]. Одним із інструментів підвищення продуктивності рослинництва та отримання екологічно чистої продукції є використання мікроорганізмів, які позитивно впливають на розвиток рослин та їх імунітет. Використання бактерій у рослинництві як альтернативи агрохімікатам потребує подальшого вивчення механізмів, які лежать в основі взаємодії бактерій з рослинами та створення нових біопрепаратів на основі мікроорганізмів із комплексом корисних для рослини властивостей [12, 25].

Представники роду *Pseudomonas* – рід грамнегативних неспороутворюючих бактерій, які досить широко використовуються в сільськогосподарській практиці [28]. Ці бактерії характеризуються колом корисних для рослин властивостей, зокрема стимулюють ріст рослин та пригнічують проліферацію фітопатогенних грибів, що робить їх перспективною основою для створення біопрепаратів.

В даний час ведуться розробки технологій отримання біопрепаратів різного призначення на основі ризосферних псевдомонад. Досліджуються різні способи консервації цих біопрепаратів і поліпшення їх прикріплення до поверхні насіння й коріння рослин з використанням різних клеючих речовин та т. п. [11, 16].

Одним з факторів широкомасштабного використання в сільському господарстві біопрепаратів на основі ризосферних бактерій роду *Pseudomonas* є здатність цих мікроорганізмів до синтезу індолил-3-оцтової кислоти (І-3-ОК). І-3-ОК належить до фітогормонів ряду ауксинів, що регулює ріст і розвиток рослин [19].

Отже, пошук і дослідження штамів псевдомонадз метою розробки на їх основі біопрепаратів продовжує залишатися актуальним завданням.

**Мета** даної роботи полягала дослідженні синтезу індолил-3-оцтової кислоти деякими представниками роду *Pseudomonas* та впливу на цей процес *in vitro* окремих факторів.

Для досягнення цієї мети було необхідним вирішити наступні **завдання**:

1. Визначити здатність до утворення індолил-3-оцтової кислоти серед представників роду *Pseudomonas*: *P. fluorescens* ONU 303, *P. chlororaphis* ONU 304, *P. chlororaphis* ONU 305, *P. chlororaphis* ONU 306.

2. Встановити залежність утворення індолил-3-оцтової кислоти представниками роду *Pseudomonas* від терміну культивування мікроорганізмів.

3. Встановити вплив триптофану на процес утворення індолил-3-оцтової кислоти досліджуваними штамми псевдомонад.

4. Порівняти вплив органічних складових (дріжджовий автолізат та пептон) поживного середовища на інтенсивність синтезу індолил-3-оцтової кислоти досліджуваними псевдомонадами.

**Об'єкт дослідження** – процес утворення гетероауксинів *Pseudomonas spp.*

**Предмет дослідження** – інтенсивність синтезу індолил-3-оцтової кислоти псевдомонадами та залежність цього процесу від складових поживного середовища.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ

Утворення системних взаємозв'язків рослини і корисної бактерії забезпечує передумови для захисту рослин і виробництва екологічно чистої рослинної продукції на всіх етапах її вирощування.

Останнім часом з'явилося багато мікробних фіторегуляторів комплексної загально стимулюючої дії, які проявляють ефективність в основному за типом ауксинів і цитокинінів, а також вітамінів [16, 29]. Ці препарати застосовують на зернових, овочах, картоплі для стимуляції проростання і зростання, підвищення стійкості до захворювань, для збільшення врожаю і поліпшення якості продукції. У виробництві препаратів для біоконтролю фітопатогенів застосовують різні види мікроорганізмів-антагоністів, однак, частіше за інших використовуються представники роду *Pseudomonas*. Метаболічна різноманітність бактерій роду *Pseudomonas* дозволяє широко використовувати їх для захисту сільськогосподарських рослин як засіб біологічної боротьби із захворюваннями бактеріальної та грибною етіології [15, 27].

Метою даної роботи було дослідження синтезу індолил-3-оцтової кислоти деякими представниками роду *Pseudomonas* та впливу на цей процес *in vitro* окремих факторів.

Індолил-3-оцтова кислота (І-3-ОК) являється фітогормоном ряду ауксинів, що регулює ріст і розвиток рослин. Особливо широко ця здатність поширена серед ґрунтових і асоційованих з рослинами бактерій [19]. Під час якісного визначення здатності культур *Pseudomonas spp.* синтезувати І-3-ОК було встановлено, що всі штами псевдомонад продукують даний фітогормон.

В роботі було визначено, що зі збільшенням терміну культивування кількість І-3-ОК, які утворювали досліджувані штами псевдомонад, зростала. Підвищення відбувалось поступово та для кожного штаму було специфічним. Проте, максимальний вміст І-3-ОК у поживному середовищі, порівняно з вихідною концентрацією, був зафіксований на п'яту добу від початку

експерименти. Найбільші виражені зміни було визначено для штаму *P. fluorescens* ОНУ 303: у 2,5-3 рази вищі, ніж у випадку *P. clororaphis*.

Ризобактерії, синтезуючі І-3-ОК із триптофану через індолил-3-пировіноградну кислоту та індолил-3-оцтовий альдегід, належать до родів *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Klebsiella* та ін. Епіфітна і ризосферна мікробіота рослин відіграє першорядну роль в перетворенні триптофану, який знаходиться в корневих ексудатах, в І-3-ОК [34].

Дослідження кількісної характеристики продукції І-3-ОК під час розвитку культур у використаних середовищах визначило, що інтенсивність утворення даної речовини залежить від виду мікроорганізмів. При визначенні залежності інтенсивності синтезу І-3-ОК від складових частин використаних поживних середовищ було встановлено, що суттєвий вплив на цей процес здійснювали органічні речовини.

Додавання триптофану призвело до суттєвих змін, зокрема підвищенню, синтезу І-3-ОК при культивуванні досліджуваних мікроорганізмів у більшості використаних середовищ.

Однак, збільшення концентрації І-3-ОК відбувалось також у середовищах з пептоном або дріжджовим автолізатом. Очевидно, це пов'язано з тим, що відповідні складові містять або безпосередньо триптофан, або його попередників, наприклад автолізат пекарських дріжджів містить значну кількість глютамінової кислоти [33].

Таким чином, застосування препаратів на основі ростостимулюючих ризобактерій, зокрема *Pseudomonas spp.*, як елементу екологічного сільського господарства дозволить знизити хімічне навантаження на екосистему через зменшення кількості мінеральних добрив та хімічних засобів захисту рослин. Все це сприятимуть підвищенню врожайності та якості екологічно чистої сільськогосподарської продукції.

## ВИСНОВКИ

1. Досліджувані штами псевдомонад *Pseudomonas fluorescens* ОНУ 303, *Pseudomonas chlororaphis* ОНУ 304, *P. chlororaphis* ОНУ 305, *P. chlororaphis* ОНУ 306 були здатними утворювати індоліл-3-оцтову кислоту.
2. Найбільш значне накопичення індоліл-3-оцтової кислоти відбувалось на п'яту добу культивування досліджуваних мікроорганізмів у рідкому поживному середовищі.
3. Додавання триптофану у культуральне середовище викликало підвищення синтезу індоліл-3-оцтової кислоти штамами псевдомонад. Найбільший рівень цього гетероауксину, що утворювався *P. fluorescens* ОНУ 303, досягав 1,37 мкг/мл середовища із додаванням 5 мМ триптофану.
4. Характеристика впливу дріжджового автолізату та пептону на синтез індоліл-3-оцтової кислоти досліджуваними псевдомонадами визначило 4-4,5- кратне збільшення вмісту даної речовини у порівнянні з вихідним рівнем, більш виражене за наявності першого з компонентів.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Акимова Е. Е.* Влияние ризосферных псевдомонад на урожайность сельскохозяйственных культур // Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии. – 2004. – Т. 3. – № 3. – С. 400–401.
2. *Андреюк Е. И., Антипчук А. Ф., Рангелова В. Н.* БТУ – новое комплексное бактериальное удобрение // Микробиол. журн. – 1999. – Т. 60, № 2. – С. 45 – 53.
3. *Архипова Т. Н., Веселов С. Ю., Мелентьев А. И.* Сравнения действия штаммов бактерий, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиология растений. – 2006. – Т. 53, № 4. – С. 567 – 574.
4. *Белимов А. А., Иванчиков А. Ю., Юдкин Л. В.* Характеристика и интродукция новых штаммов ассоциативных ростстимулирующих бактерий, доминирующих в ризоплане проростков ячменя // Микробиология. – 1999. – Т. 68, № 3. – С. 392 – 397.
5. *Билай В. И.* Микроорганизмы возбудители болезней растений // Киев: Наукова думка, 2009. – 125 с.
6. *Бондаренко Н. В.* Биологическая защита растений. – М.: Агропромиз Наука, 2006. – 279с.
7. *Боронин А. М.* Ризосферные бактерии рода *Pseudomonas*, способствующие росту и развитию растений // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 25–31.
8. *Возняковская Ю. М.* Взаимоотношения растений с микроорганизмами ризосферы и филлосферы // Агрономическая микробиология. – 2005. – Т. 6. – С. 144–146.
9. *Волкогон В. В.* Мікробіологічні аспекти оптимізації азотного удобрення сільськогосподарських культур. – К.: Аграрна наука, 2007. – 143с.
10. *Воронина Л. П., Якименко О. С., Терехова В. А.* Регуляторы роста растений: оценка биологической активности промышленных гуминовых препаратов // Агрохимия. – 2012. – № 6. – С. 50 – 57.

11. *Воронкевич И. В.* Антагонизм микроорганизмов в почве и перспективы его использования в борьбе с почвообитающими возбудителями болезней растений // *Успехи современной биологии.* – 2008. – Т. 46, № 2. – С. 145 – 155.
12. *Демченко Е. В., Вершинина Е. В., Петрова А. Е.* Влияние сельскохозяйственной культуры и эколого-географической зоны произрастания на состав эпифитной микрофлоры зерна // *Успехи современного естествознания.* – 2004. – Т. 7. – С. 95–96.
13. *Дятлова К. Д.* Микробные препараты в растениеводстве // *Соросовский образовательный журн. Биология.* – 2007. – Т. 7, № 5. – С. 4 – 18.
14. *Ермакова И. Т., Шушкова Т. В.* Мікроорганізми ґрунту // *Мікробіол. ж.* – 2008. – Т. 4. – С. 68–72.
15. *Казакова М. Л., Казаков А. В., Злотников А. К.* Новый бактериальный эндофит сельскохозяйственных культур // *С.-х. биология. Сер. биология растений.* – 2006. – № 3. – С. 62 – 66.
16. *Кириченко Е. В., Жемойда А. В., Коць С. Я.* Влияние растительно-бактериальной композиции на продуктивность яровой пшеницы // *Агрохимия.* – 2005. – № 10. – С. 41 – 47.
17. *Козар С. Ф., Надкерничний С. П., Шерстобоев М. К.* Виробництво біопрепаратів комплексної дії: проблеми становлення // *Бюл. Ін-ту с.-г. мікробіології.* – 2008. – № 2. – С. 30 – 33.
18. *Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А.* Физиология растений. М.: Высш. шк., 2005. 755 с.
19. *Лецинская А. Н.* Микробная биотехнология // *ДАС.* – 2000. – Т. 11. – С. 253–256.
20. *Логинов О. Н. Мелентьев А. И., Силищев Н. Н.* Роль бактерий-антагонистов фитопатогенов в защите сельскохозяйственных растений от болезней // *Мікробіол. ж.* – 2001. – Т. 5. – С. 66–71.

21. Лукаткин А. А. Получение биопрепарата на основе бактерий *Pseudomonas aureofaciens* // Успехи современного естествознания. – 2010. – Т. 9. – С. 415–417.
22. Лысак В. В., Максимова Н. П. Теоретические и прикладные аспекты создания биопрепаратов для защиты растений // Вест. Белорус. ун-та. Сер. 2: Химия. Биология. География. – 2009. – № 3. – С. 56 – 64.
23. Мордухова Е. А., Скворцова Н. П., Кочетков В. В. Синтез фитогормона индолил-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* // Микробиология. – 2011. – Т. 60, № 3. – С. 494 – 500.
24. Мосолов И. В., Ремпе Е. Х., Александровская В. А. О взаимоотношениях высшего растения и микроорганизмов // Агробиология. – 2009. – № 3. – С. 38–40.
25. Мошинець О. В., Косаківська І. В. Фітосфера як екологічна ніша рослинно-мікробних взаємовідносин. Функціональна активність мікроорганізмів та їхній вплив на рослини // Вісник харківського національного аграрного університету. Серія біологія. – 2010. – № 3. – С. 6–22.
26. Олюнина Л. Н., Шабает В. П. Продуцирование индолил-3-уксусной кислоты ризосферными бактериями рода *Pseudomonas* в процессе роста // Микробиология. – 1996. – Т. 65, № 6. – С. 813 – 817.
27. Пантелеев А. А. Изучение микробов-антагонистов и их метаболитов для борьбы с болезнями растений // Биологический метод защиты растений от болезней. – 2006. – Т. 12, № 7. – С. 29 – 33.
28. Рамезанпур М. Р. Образование индолил-уксусной кислоты местными штаммами флюоресцирующих псевдомонад, изолированных из ризосферы риса, культивируемого в северных провинциях Ирана // Ученые записки Ереванского университета. – 2009. – Т. 2. – С. 59 – 64.
29. Смірнов В. В., Патица В. П., Підгорський В. С. Мікробні біотехнології в сільському господарстві // Агроєкол. журн. – 2002. – № 3. – С. 3 – 9.

30. Твердюков А. П. Биологический метод борьбы с вредителями и болезнями в защищенном грунте: справочник. – М.: Колос, 2009. – 236 с.
31. Цавкелова Е. А., Климова С. Ю., Чердынцев Т. А. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133 – 143.
32. Badri D. V., Weir T. L. Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions // Curr. Opin. Biotechnol. – 2009. – Vol. 20. – P. 642 – 650.
33. Bever J. D., Platt T. G., Morton E. R. Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities // Annu. Rev. Microbiol. – 2012. – Vol. 20. – P. 66.
34. Diks E., Vereecke D., Leveau J. H. J. Molecular communication in the rhizosphere // Plant. Soil. – 2010. – Vol. 15. – P. 279 – 303.
35. Elgersma K. J., Yu S., Vor T., Ehrenfeld J. G. Microbial-mediated feedbacks of leaf litter on invasive plant growth and interspecific competition // Plant Faure. – 2012. – Vol. 32. – P. 56 – 59.
36. Jones D. L., Nguyen C., Finlay R. D. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil–root interface // Plant. Soil. – 2009. – Vol. 321. – P. 5 – 33.
37. Vessey J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer // Plant and soil. – 2003. – Vol. 255. – P. 571 – 586.
38. Yang Q., Carrillo J., Jin H., Shang L. Plant-soil biota interactions of an invasive species in its native and introduced ranges: Implications for invasion success // Soil Biol. Biochem. – 2013. – Vol. 71. – P. 78 – 85.
39. Zhang L., Xu Z. Assessing bacterial diversity in soil // J. Soil. Sediments – 2009. – Vol. 8. – P. 379 – 388.