

ЯМБОРКО Н.А., БІЛЯВСЬКА Л.О.

*Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
Україна, 03143, Київ, вул. Заболотного 154, e-mail: kreminna@ukr.net*

ФІТОГОРМОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ МІКРООРГАНІЗМІВ-ДЕСТРУКТОРІВ ГЕКСАХЛОРЦИКЛОГЕКСАНУ

В основі природного самоочищення ґрунту лежить властивість насамперед її живого компоненту розкласти широкий спектр природних і неприродних сполук. Саме мікроорганізми відіграють провідну роль в поетапній деградації пестицидів у ґрунті. Хлороорганічні пестициди найбільш стійкі до деградації, вони можуть залишатися в ґрунті десятиліттями [5]. Інсектицид гексахлорциклогексан (ГХЦГ) один із найбільш поширених в практиці сільського господарства, він є сумішшю чотирьох оптичних ізомерів α -, β -, γ - і δ .

Використання природного адаптаційного потенціалу мікробних асоціацій складає основу сучасної біотехнології рекультивації забруднених екосистем. Відомо, що синтез мікроорганізмами-деструкторами фітогормональних речовин створює сприятливі умови для розкладу аліфатичних і поліциклічних вуглеводнів як у забрудненому ґрунті так і в зоні ризосфери культурних рослин [2]. Разом з тим, продукція мікроорганізмами-деструкторами речовин, які сприяють оптимізації процесу ремедіації ґрунту і створюють умови для розвитку рослинності на забруднених територіях, вивчені мало і вимагають подальшого дослідження.

Тому, пошук активних мікроорганізмів-деструкторів пестицидів із властивостями синтезувати рістрегулюючі речовини є актуальним для ремедіації забруднених ґрунтів. В зв'язку з цим метою нашої роботи було дослідити вплив деяких екзометаболітів мікроорганізмів-деструкторів ГХЦГ на рослинні об'єкти, а також здатність синтезувати речовини фітогормональної природи.

Матеріали і методи

У відділі загальної та ґрунтової мікробіології ІМВ НАНУ, із ґрунту місця локального забруднення пестицидами методом багаторазових пасажів та відбору за ознакою стійкості до пестицидів була виділена і селекціонована асоціація мікроорганізмів, яка отримала назву Мікрос [1]. Із неї виділено чисті культури мікроорганізмів-деструкторів, здатних розкласти ізомери інсектициду гексахлорциклогексану (α -ГХЦГ, β -ГХЦГ, γ -ГХЦГ, δ -ГХЦГ). Для визначення впливу культур-деструкторів на проростання насіння, проводили бактеризацію насіння ріпаку з розрахунку 10^6 клітин на насінину, попередньо визначивши титр клітин кожної культури мікроорганізмів.

Для визначення гіберелової кислоти (ГК) у культуральних рідинах культур-деструкторів використовували специфічний біотест на гіберелову активність з використанням гіпокотилів проростків огірків сорту Ніжинський [3]. Зміни довжини гіпокотилей виражали у відсотках від контролю. Як позитивний контроль використовували розчин ГК в концентрації 10^{-5} М.

Для визначення вмісту фітогормонів (ауксинів, цитокинінів та абсцизової кислоти (АБК) у культуральній рідині мікроорганізмів-деструкторів пестицидів використовували метод кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії. В якості екстрагенту брали 96%-ний етанол, він широко використовується для екстракції АБК, зеатину, індолілоцтової кислоти (ІОК). Для видалення з етанольних екстрактів значної кількості супутніх речовин проводили їх експрес-очистку від домішок і одночасне концентрування фітогормонів на пластинках із силікагелем марки “Silufol UV²⁵⁴” (“Chemapol”, Чехія) у суміші розчинників. На першому етапі — хроматографія в хлороформі, на другому етапі — в 12,5% водному розчині аміаку, на третьому етапі — хроматографія в системі етилацетат — оцтова кислота (20:1) [4]. Зони, які співпадають за хроматографічною рухливістю із Rf нанесених раніше стандартних розчинів зеатину, ІОК и АБК, знімали і перерозчиняли (елюювали): зетин — в спирті, а ІОК і АБК (індольні сполуки) — в етилацетаті. Отримані очищені екстракти розділяли на пластинках з оксидом кремнію (“Merck”) в системі розчинників хлороформ-етилацетат-оцтова кислота (100:100:1) — для індольних сполук; цитокиніни розділяли на пластинках з оксидом алюмінію (“Merck”) у системі розчинників хлороформ-оцтова кислота (19:1). Кількісне детектування фітогормонів здійснювали за допомогою скануючого спектроденситометра “Camag TLC Scanner” (Швейцарія).

Результати та обговорення

Представники роду *Pseudomonas* відомі своїм високим потенціалом щодо синтезу біологічно активних вторинних метаболітів (антибіотичних речовин, вітамінів, органічних кислот, фітогормональних речовин). Тому ми перевірили дію бактеризації виділених мікроорганізмів-деструкторів на проростання насіння ріпаку ярого сорту Ольга. Так, максимальна довжина кореня була при бактеризації насіння ріпаку *P. putida* 3, вона перевищувала показники контролю на 52,5%, у цьому ж варіанті була максимальна сира маса проростків — на 16% вище контролю (табл. 1). При бактеризації насіння *P. putida* 9 сира маса проростків зростала на 10,3%.

В зв'язку із стимулюючим впливом бактеризації на проростання насіння ми вирішили перевірити в специфічному біотесті на гіпокотиллях проростків огірка посівного *Cucumis sativus* L. (рис. 1) здатність культуральних рідин досліджуваних мікроорганізмів-деструкторів синтезувати гіберелову кислоту.

Таблиця 1

Неспецифічне стимулювання проростання насіння ріпаку ярого сорту Ольга мікроорганізмами-деструкторами ГХЦГ

Параметри	Контроль	<i>P. putida</i> 3	<i>P. putida</i> 9	<i>B. megaterium</i> IMB B-7168	<i>S. maltophilia</i> 6
Довжина кореня, мм	45,1±4,2	68,8±9,1	46,4±3,8	35,1±5,1	32,2±4,1
Сира маса, мг	20,4±	23,7±	22,5±	14,1±	19,3±
Суха маса, мг	3,1±	2,9±	2,97±	2,95±	3,5±

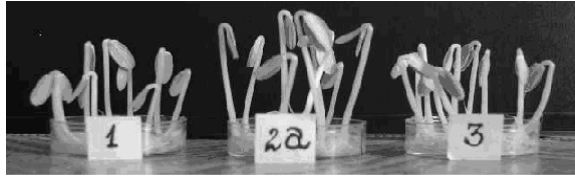


Рис. 1. Стимулювання розвитку проростків огірків культуральною рідиною на прикладі *P. putida* 3:

2a — *P. putida* 3 у розведенні 1:10; 1 — контроль; 3 — гіберелова кислота 10^{-5} М розчин

Таблиця 2

Гіберелова активність культуральних рідин мікроорганізмів-деструкторів для проростків огірка посівного *Cucumis sativus* L.

Варіанти досліджу	Розведення	Довжина гіпокотіля, % від контролю
<i>P. putida</i> 3	1:10	118,6
<i>P. putida</i> 3	1:50	110,1
<i>P. putida</i> 3	1:100	134,3
<i>S. maltophilia</i> 6	1:10	126,5
<i>S. maltophilia</i> 6	1:50	126,9
<i>S. maltophilia</i> 6	1:100	129,6
<i>P. putida</i> 9	1:10	122,6
<i>P. putida</i> 9	1:50	129,1
<i>P. putida</i> 9	1:100	124,2
<i>B.megaterium</i> IMB B-7168	1:10	116,6
<i>B.megaterium</i> IMB B-7168	1:50	119,1
<i>B.megaterium</i> IMB B-7168	1:100	117,7
Гіберелова кислота	10^{-5}	106,1
Контроль, середовища	---	100

Так, при розведенні культуральної рідини 1:10 спостерігали стимулюючий ефект на рівні 16,6–26,5%, при розведенні 1:50 — на 10,1–29,1% (табл. 2). Максимальне стимулювання довжини гіпокотіля спостерігали при замочуванні проростків огірка в розведення 1:100 культуральної рідини *P. putida* 3 — на 34,3% проти 6,1% у контролі з робочою концентрацією гіберелової кислоти. При бактеризації насіння *P. putida* 9 сира маса проростків зростала на 10,3%.

На наступному етапі нами було проведено інструментальне дослідження синтезу фітогормонів мікроорганізмами-деструкторами хлороорганічних пестицидів. Відомо, що зеатинрибозид є транспортною формою зеатину і його максимальну кількість було виявлено у варіанті із *P. putida* 3 —

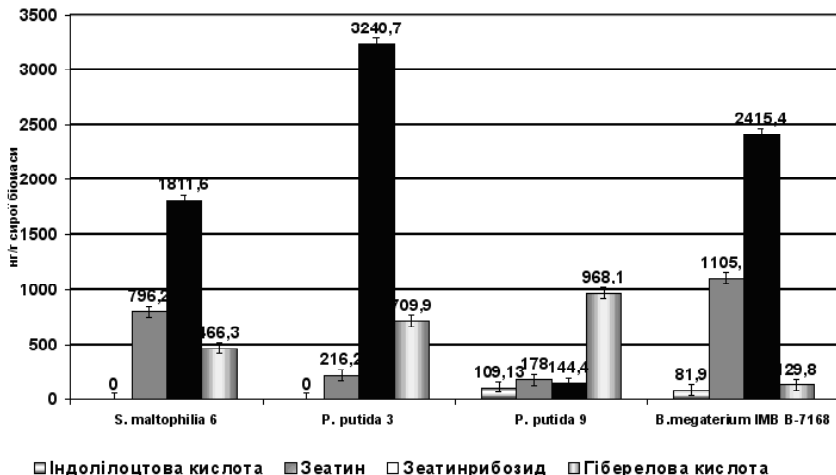


Рис. 2. Синтез фітогормонів мікроорганізмами-деструкторами ГХЦГ

3240,7 нг/г сирової біомаси. Це пояснює переважаючий стимулюючий ефект бактеризації і дії культуральної рідини *P. putida* 3 у варіантах біотестів (табл. 1, 2) із застосуванням. У варіанті із *B. megaterium* IMB B-7168 кількість зеатинрибозиду була меншою — 2415,4 нг/г, тоді як зеатинбу виявлений у достатній кількості (1105,8 нг/г сирової біомаси), на відміну від *P. putida* 3 (216,2 нг/г сирової біомаси).

Вміст зеатинрибозиду у біомасі досліджуваних мікроорганізмів виявлено не було. Високий рівень синтезу гіберелової кислоти спостерігали у *P. putida* 9 — 968,1 нг/г і *P. putida* 3 — 709,9 нг/г (рис. 2). Із ауксинів ІОК синтезували тільки *P. putida* 9 — 109,13 нг/г і *B. megaterium* IMB B-7168 — 81,9 нг/г.

Висновки

Бактеризація насіння ґрунтовими мікроорганізмами-деструкторами ГХЦГ має стимулюючий ефект для розвитку і формування проростків ріпаку ярого сорту Ольга.

Виявлено гіберелову активність культуральних рідин досліджуваних мікроорганізмів у специфічному біотесті на гіпокотиллях проростків огірка посівного *Cucumis sativus* L. Максимальне стимулювання спостерігали при розведенні 1:100 культуральної рідини *P. putida* 3 — на 34,3% проти 6,1% у контролі з робочою концентрацією гіберелової кислоти.

Визначено, що виділені культури-деструктори ГХЦГ і *Bacillus megaterium* IMV B-7168 синтезують рістстимулюючі речовини фітогормональної природи: гіберелову кислоту, ІОК, зеатинрибозид і зеатин.

Показано, що максимальну кількість транспортної форми зеатину — зеатинрибозиду синтезував штам *P. putida* 3 — 3240,7 нг/г, що частково пояснює його стимулюючі властивості у біотестах.

Література

1. Іутинська Г.О., Ямборко Н.А., Піндрус А.А., Мельничук С.Д., Лоханська В.Й., Баранов Ю.С., Самкова О.П. Мікробна деструкція похідних циклічних вуглеводнів (α -, β -, γ -Зексахлорциклогексанів) у ґрунті./Наукові доповіді НАУ.— Київ, 2007.— №1(6).— С. 1–7.

2. Муратова А.Ю., Голубев С.Н., Мербах В., Турковская О.В. Биохимические и физиологические особенности взаимодействия Sinorhizobium meliloti Sorghum bilolol в присутствии фенантрена // Микробиология.— Т.78.— №3.— 2009.— С. 347–354.

3. Муромцев Г.С., Агнстикова В.Н. Гиббереллины: Монография.— М.: Наука, 1984.— 208 с.

4. Савинский С.В., Драгавоз И.В., Педченко В.К. Определение зеатина, индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Физиология и биохимия культ. растений.— 1991.— 23, №6.— С. 606–614.

5. Qointero J. C, Moriera M.T, J.M. Lema, Feijoo G. An anaerobic bioreactor the efficient degradation of hexachlorocyclohexane (HCH) isomers in soil slurry // Chemosphere.— 2006.— 63.— P. 1005–1013.

Резюме

Визначено, що виділені культури-деструктори ГХЦГ і *Bacillus megaterium* IMV B-7168 мають стимулюючий вплив на розвиток і формування проростків ріпаку ярого і огірка посівного. Це пов'язано з синтезом рістстимулюючих речовини фітогормональної природи: гіберелової кислоти, ІОК, зеатинрибозиду і зеатину.

Установлено, что выделенные культуры-деструкторы ГХЦГ и *Bacillus megaterium* IMV B-7168 имеют стимулирующее действие на развитие и формирование проростков рапса ярового и огурца посевного. Это связано с синтезом ростстимулирующих веществ фитогормональной природы: гибберелловой кислоты, ИУК, зеатинрибозиды и зеатина.

We have established, what allocated cultures-destructors HCH and *Bacillus megaterium* IMV B-7168 have stimulating action on the development and formation of spring rape sprouts and cucumber sprouts. It is connected with synthesis stimulant substances of the phytohormonal nature: gibberellic acids, indoleacetic acid, zeatineriboside and zeatine.