

**БАКТЕРІЯ *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3  
– ПРОДУЦЕНТ ФІТОГОРМОНІВ**

**Чайковська Л.О., Баранська М.І.**

Південна дослідна станція Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН,  
вул. К. Маркса, 107, смт. Гвардійське, АР Крим, 97513, Україна  
E-mail: ludachaika@mail.ru

*Проведено визначення якісного (методи біотестування) та кількісного (методи тонкошарової хроматографії) складу фітогормонів, які продукує бактерія *Enterobacter nimipressuralis* 32-3. Встановлено, що у культуральній рідині штаму присутні фізіологічно активні речовини, які відносяться до трьох класів фітогормонів: ауксинів, гіберелінів та цитокінінів.*

Ключові слова: *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, фітогормони, ауксини, гібереліни, цитокініни.

Як відомо, однією з найбільш важливих властивостей симбіотичних, ризосферних та епіфітних бактерій, що стимулюють і покращують ріст та розвиток рослин, є продукування фітогормонів, які належать до різних класів: ауксинів, гіберелінів та цитокінінів [1]. Встановлено, що здатність до продукування фітогормонів ауксинової природи (зокрема  $\beta$ -індоліл-3-оцтової кислоти, ІОК) мають від 42 % до 97 % штамів бактерій незалежно від їх таксономічного положення [2]. До того ж, синтез фітогормонів властивий і для багатьох вільноживучих мікроорганізмів, які не зв'язані з рослинами у процесі своєї життєдіяльності [3]. Так, близько 80 видів ґрунтових бактерій здатні продукувати ІОК, яка таким чином може накопичуватись у ґрунті [4].

Оскільки використання мікроорганізмів, що мають комплекс корисних для рослин властивостей, є одним із аспектів біологізації сучасного землеробства, не втрачає актуальності розробка біопрепаратів на їх основі. Так, науковцями Південної дослідної станції ІСГМ УААН проведено роботи зі створення біопрепарату Фосфоентерину на основі фосфатмобілізувальної бактерії *Enterobacter nimipressuralis* 32-3. При дослідженні фізіолого-біохімічних властивостей штаму встановлено, що він продукує фітогормони ауксинової та гіберелінової природи, які зумовлюють

високу фізіологічну активність культуральної рідини штаму [5-8].

Життєвий цикл кожного рослинного організму відбувається під контролем фітогормонів, які відіграють важливу роль у формуванні стійкості рослин до екстремальних умов [9]. Одними з найбільш важливих гормонів є ауксини. Індоліл-3-оцтова кислота (ІОК) має найбільшу активність серед природних представників цього класу. Відомо, що ауксини приймають участь у регулюванні таких важливих процесів, як ділення клітин та стимуляція росту розтягуванням, при формуванні камбію, провідних пучків, коренів [10, 11]. Ауксини контролюють ріст плодів, вони здатні затримати розпускання бічних бруньок та опадання листків і плодів. Цитокініни присутні в різноманітних рослинних тканинах, їх основна фізіологічна дія полягає у стимуляції поділу і диференціюванні клітин та у затриманні процесів старіння. Крім того, під впливом цитокінінів відбувається загальна стимуляція обміну речовин, у першу чергу – синтезу РНК та білків. Вважається, що у рослинах цитокініни присутні як у вільному стані, так і у вигляді рибозидів, біологічна активність яких знижена. Зв'язані форми цитокінінів є транспортними або запасними формами. Найбільш активним природним цитокініном є зеатин. Найпоширенішими рослинними фітогормонами є гібереліни, їх нараховують майже 125 сполук. Вони стимулюють видовження стебла та цвітіння у багатьох видів рослин, зав'язування та ріст плодів [11].

Враховуючи вищесказане, мета наших досліджень полягала у визначенні кількісного та якісного складу фітогормонів, що продукує бактерія *E. nimipressuralis* 32-3 – основа біопрепарату Фосфоентерин.

**Матеріали і методи.** Визначення активності синтезу фітогормонів бактерією *E. nimipressuralis* 32-3 проведено в умовах лабораторного дослідження. Культивували штаму на глюкозо-аспарагіновому (ГА) середовищі за динамічних умов (240 об./хв) при температурі 28 °С протягом 48 годин. Інокулянт слугувала добова маточна культура, яку вирощено на ГА середовищі (титр  $2,2 \cdot 10^9$ ). Для аналізу використано нативну культуральну рідину *E. nimipressuralis* 32-3.

Перед екстракцією культуральну рідину центрифугували (20 хвилин) при 6000 об./хв. Екстракцію фітогормонів проводили у ділільних лійках: тричі по 15 хвилин при енергійному струшуванні суміші. Об'єднані екстракти висушували  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (безводним),

фільтрували, упарювали досуха та змивали 3 мл 70 %-го етанолу. Для екстракції ІОК застосовували діетиловий ефір (1:1 по об'єму) при рН 3, підкислення проводили 2 н НСІ. Екстракцію гіберелінів проводили етилацетатом (1:3 по об'єму) при рН 2,5, підкислення - 1 н НСІ; цитокінінів – н-бутанолом (1:1 при рН 8), підлучення – 1 н NaOH [12].

Для визначення активності синтезу фітогормонів бактерією *E. nimipressuralis* 32-3 застосовували специфічні біотести: для ІОК – колеоптилі пшениці сорту Альбатрос одеський [13], гіберелінів – мезокотилі кукурудзи гібриду Росава [14].

Визначення кількісного вмісту фітогормонів у культуральній рідині бактерії *E. nimipressuralis* 32-3 проведено методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [15]. Для екстракції використано 96 % етанол. Попереднє очищення та концентрування етанольного екстракту проведено на хроматографічних пластинках марки Silufol UV<sub>254</sub> («Chemapol», Чехія). Експрес-очищення включало наступні кроки хроматографування: 1) у хлороформі, 2) в NH<sub>3</sub> 12,5 %, 3) у системі розчинників: етилацетат-оцтова кислота (20:1). Зони, що співпадали з R<sub>f</sub> нанесених стандартних розчинів, зчищали скальпелем та елюювали етанолом. Елюат ІОК рехроматографували на пластинках з окисом кремнію (Merck № 5715) у системі розчинників: хлороформ – етилацетат – оцтова кислота (100:100:1). Для хроматографування цитокінінів і гіберелінів використано пластинки з окисом алюмінію («Merck» № 5713). Система розчинників для цитокінінів: хлороформ – оцтова кислота (19:1), для гіберелінів: н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:5). Кількісне визначення фітогормонів здійснювали за допомогою скануючого спектроденситометра «Camag TLC Scanner» (Швейцарія).

**Результати та їх обговорення.** Як свідчать одержані результати, приріст колеоптилів пшениці відмічено вже при розведенні екстрактів у 100 та 250 разів: він становив у порівнянні з контролем 16 % та 17 %, відповідно (табл. 1.). Одержані показники співпадають з показниками дії аутентичної речовини (ІОК, 10<sup>-5</sup>), яка забезпечила такий же приріст довжини колеоптилів пшениці. Проте найбільший приріст колеоптилів відмічено при розведенні екстракту у 500 разів: він становив 28 % до контролю. Подальше розведення екстракту (1:1000) також дало позитивні результати (23 % до контролю), проте приріст довжини колеоптилів дещо

знижувався, але все таки перевищував показники аутентичної речовини.

**Таблиця 1. Вплив екстрактів культуральної рідини *E. nimipressuralis* 32-3 на приріст колеоптилів проростків пшениці сорту Альбатрос Одеський**

Варіанти досліджу	Довжина відрізків колеоптилів, мм	Приріст, %
Контроль (вода)	10,5	100,0
ІОК 10 <sup>-4</sup>	11,5	110,0
ІОК 10 <sup>-5</sup>	12,2	116,0
Розведення екстракту 1:100	12,2	116,0
Розведення екстракту 1:250	12,3	117,0
Розведення екстракту 1:500	13,4	128,0
Розведення екстракту 1:1000	12,9	123,0
НІР <sub>05</sub>	0,61	–

За результатами наших досліджень виявлено, що незначний приріст мезокотилів кукурудзи відмічено вже при розведенні екстракту 1:100 – на 2 % проти контролю (табл. 2.). Розведення екстракту 1:250 сприяло зростанню приросту мезокотилів кукурудзи на 17 % порівняно з контролем, але воно не перевищувало показники дії аутентичної речовини (ГК, 10<sup>-5</sup>). Найбільший приріст мезокотилів відмічено при розведенні екстракту в 1000 разів: він становив 32 % до контролю, що також перевищувало показники аутентичної речовини на 10 %. Розведення екстракту (1:500) також дало позитивні результати (8 % до контролю), проте приріст довжини мезокотилів був нижчим, ніж за розведення 1:250 та 1:1000. Аналізуючи одержані результати, слід зробити припущення, що *E. nimipressuralis* 32-3 синтезує не одну, а принаймні дві речовини гіберелінової природи. Про це свідчить відмічене нами зростання приросту мезокотилів кукурудзи: як при розведенні культурального екстракту в 250, так і в 1000 разів.

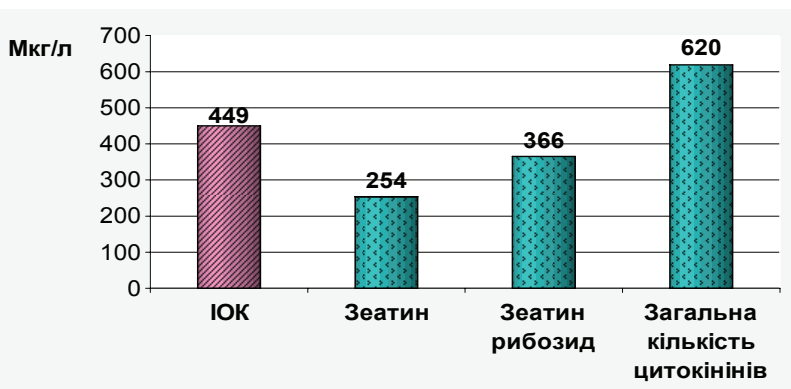
Результати проведених нами хроматографічних досліджень підтвердили попередні: у культуральній рідині *E. nimipressuralis* 32-3 виявлено присутність ІОК та речовин гіберелінової природи. Крім того, встановлено, що *E. nimipressuralis* 32-3 продукує фітогормони цитокінінової природи: як у вільному активному стані (зеатин), так і у зв'язаній формі (зеатин-рибозид). Оскільки

секрецію фітогормонів у культуральну рідину здійснюють клітини *E. nimipressuralis* 32-3, доцільно було зробити обрахунок їх вмісту на суху біомасу бактерій.

**Таблиця 2. Вплив екстрактів культуральної рідини *E. nimipressuralis* 32-3 на приріст мезокотилів кукурудзи гібриду Росава**

Варіанти досліду	Довжина відрізків мезокотилів, мм	Приріст, %
Контроль (вода)	8,6	100,0
ГК 10 <sup>-5</sup>	10,5	122,0
Розведення екстракту 1:100	8,7	102,0
Розведення екстракту 1:250	10,1	117,0
Розведення екстракту 1:500	9,32	108,0
Розведення екстракту 1:1000	11,3	132,0
НІР <sub>05</sub>	0,91	

Кількісне визначення фітогормонів у культуральній рідині показало, що *E. nimipressuralis* 32-3 продукує ауксини, які представлені  $\beta$ -індоліл-3-оцтовою кислотою (рис. 1). Її кількість у екстрактах культуральної рідини становила 449 мкг/л або 890 мкг/г сухої біомаси.



**Рис. 1. Вміст ауксинів та цитокінінів у культуральній рідині *E. nimipressuralis* 32-3**

Проведені дослідження дозволили виявити та ідентифікувати у культуральній рідині *E. nimipressuralis* 32-3 фізіологічно активні речовини, які належать до цитокінінів.

Показано, що вони представлені у вигляді як вільних (зеатин), так і зв'язаних (зеатин-рибозид) сполук. Кількість зеатину в культуральній рідині становила 254 мкг/л культуральної рідини або 408 мкг/г сухої біомаси, зеатин-рибозиду – 366 мкг/л та 588 мкг/г, відповідно (рис 1). Загальна кількість цитокінінів становила 620 мкг/л культуральної рідини, що відповідало 996 мкг/г сухої маси бактерій.

Як було відмічено вище, *E. nimipressuralis* 32-3 також синтезує гібереліни. За нашими результатами, у культуральній рідині виявлено не ідентифіковані речовини гіберелінової природи у достатньо високих кількостях. Їх загальний вміст становив 18781 мкг/л культуральної рідини або 30141 мкг/г сухої речовини.

Таким чином, за результатами проведених нами специфічних біотестів підтверджено, що *E. nimipressuralis* 32-3 продукує фітогормони, які належать до ауксинів та гіберелінів: у культуральній рідині виявлено  $\beta$ -індоліл-3-оцтову кислоту та речовини гіберелінової природи. Встановлено, що цей штам, окрім ауксинів та гіберелінів, продукує цитокініни: зеатин і зеатин-рибозид. Методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії проведено кількісне визначення фітогормонів, що продукує *E. nimipressuralis* 32-3. Встановлено, що при культивуванні на рідкому глюкозо-аспарагіновому середовищі протягом 48 годин в 1 мл міститься до 449 мкг/л ІОК, 254 мкг/л зеатину та 18781 мкг/л речовин гіберелінової природи

1. Цавкелова Е.А. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение (обзор) /Е.А. Цавкелова, С.Ю. Климова, Т.А. Чердынцева, А.И. Нетрусов //Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133-143.

2. Холмецкая М.О. Продукция индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) бактериями, взаимодействующими с растениями /М.О. Холмецкая, Е.В. Лобанок //Тез. Всерос. конф. «Сельскохозяйственная микробиология в 19-21 веках» (Санкт-Петербург, июнь 2001): тез. докл. – С-Пб, 2001. – С. 78-79.

3. Muronets E.M. Mutants of *Agrobacterium radiobacter* 5D1 impaired in indole-3-acetic acid biosynthesis, nitrogen metabolism and association with non-legume plants /E.M. Muronets, S.V. Kameneva, M.V. Ruslyakova, I.V. Elanskaya //Biology of Plant-Microbe Interactions; Ed. by I. Tikhonovich, B. Lutenberg and N. Provorov. – St. Paul, Minnesota – St.-Petersburg, 2004. – V. 4. – P. 402-404.

4. Plant Hormones-Biosynthesis, Signal Transduction, Action! /3<sup>rd</sup> ed., edited by J. Davies Peter. – Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer-Verlag, 2004. – 750 p.

5. Кравченко Л.В. Роль триптофана в корневых экзометаболитах для фитостимулирующей активности ризобактерий //Л.В. Кравченко, Т.С. Азарова, Н.М. Макарова, И.А. Тихонович //Микробиология. – 2004. – Т. 73, № 2. – С. 195-198.

6. Chaykovskaya L.A. The mechanism of influence of bacterium – secreting of physiological active substance /L.A. Chaykovskaya, N.V. Glumova //Abstract of III<sup>th</sup> Inter. Congr. “Weak and Hype-rweak Fields and Radiations in Biology and Medicine” (St.-Petersburg, Jule 7-10, 2003.). – St-Petersburg, 2003. – P. 69-70.

7. Чайковська Л.О. Алелопатичні аспекти впливу *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 на рослини //Л.О. Чайковська //Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Алелопатія: Зб. статей міжнар. наук. конф. (Київ, 4-6 жовтня, 2005). – К., 2005. – С. 298-303.

8. Чайковская Л.А. Бактерия *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 – продуцент физиологически активных веществ //Л.А. Чайковская, М.И. Баранская //Биологические препараты в растениеводстве: материалы междунар. конф. Radostim (Киев, 10-13 июня, 2008). – К., 2008. – С. 61-62.

9. Кулаева О.Н. Новейшие достижения в изучении механизма действия фитогормонов /О.Н. Кулаева, О.С. Прокопцева //Биохимия. – 2004. – Т. 69. – С. 293-310.

10. Мусієнко М.М. Фізіологія рослин: Підручник /М.М. Мусієнко. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 392 с.

11. Регулятори росту на основі природної сировини та їх застосування в рослинництві /[Яворська В.К., Драговоз І.В., Крючкова Л. О. та ін.]. – К.: Логос, 2006. – 176 с.

12. Методические рекомендации по определению фитогормонов. – К., 1988. – 31 с.

13. Бойчук О.Б. Застосування тесту коротких відрізків пшеничних колеоптилів для визначення ауксинів /О.Б. Бойчук, Л.М. Зайцева //Укр. бот. журн. – 1977. – № 6. – С. 632-639.

14. Гормоны растений гиббереллины /Муромцев Г.С., Агнестикова В.Н. – М.: Наука, 1973. – 448 с.

15. Савинский С.В. Определение зеатина, индолил-3-уксусной и абсцизовой кислот в одной растительной пробе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии /С.В. Савинский, И.В. Драговоз, В.К. Педченко //Физиол. и биохим. культурн. раст. – 1991. – Т. 23, № 6. – С. 611-619.

**БАКТЕРИЯ *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3  
– ПРОДУЦЕНТ ФИТОГОРМОНОВ**

**Чайковская Л.А., Баранская М.И.**

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной  
микробиологии УААН, Гвардейское

*Проведено определение качественного (методы биотестирования) и количественного (методы тонко-слойной хроматографии) состава фитогормонов, которые продуцирует бактерия *Enterobacter nimipressuralis* 32-3. Показано, что в культуральной жидкости штамма содержатся физиологически активные вещества, которые относятся к трём классам фитогормонов: ауксинам, гиббереллинам и цитокининам.*

*Ключевые слова: *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, фитогормоны, ауксин, гиббереллин, цитокинин.*

**BACTERIA *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3  
– THE PRODUCER OF PHYTOHORMONES**

**Chaykovska L.A., Baranska M.I.**

The South Experimental Station of Institute of Agricultural  
Microbiology UAAS, Gvardeyskoe

*Qualitative (bioassays) and quantitative (thin-layer chromatography) determination of phytohormones produced by the bacterium *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 were carried out. It was established, that cultural liquid of strain contains physiologically active substances of three classes of phytohormones: auxin, gibberellin and cytokinin.*

*Key words: *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, phytohormones, auxin, gibberellin, cytokinin.*