

ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРА РОСТУ РОСЛИН БІОЛАНУ НА ФІТОГОРМОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3

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

Досліджено вплив фіторегулятора росту рослин Біолану на активність продукування фітогормонів бактерією Enterobacter nimipressuralis 32-3. Встановлено, що додавання у поживне середовище Біолану збільшує кількість індоліл-оцтової кислоти (ІОК) та цитокінінів (на 13,6 та 18 % відповідно) та знижує на 15 % вміст речовин гіберелінової природи.

Ключові слова: *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, фітогормони, Біолан.

Відомо, що в технологіях виготовлення біологічних препаратів на основі ґрунтових мікроорганізмів важливим є накопичення мікробної біомаси та синтез біологічно активних речовин. Зростання цих показників можна досягти за оптимізації умов культивування мікроорганізмів та складу поживного середовища. Так, виявлено позитивний вплив природних регуляторів росту рослин на культуру фосфатмобілізувальної бактерії *Bacillus megaterim* 5: відмічено зростання фосфатазної активності та накопичення біомаси [1], а також стійкості до стресових факторів [2]. Встановлено, що додавання у поживне середовище регуляторів росту рослин позитивно впливає на накопичення біомаси бульбочкових бактерій [3]. Крім того, включення регуляторів росту рослин в оптимальних концентраціях до поживного середовища при виготовленні біологічних препаратів на основі корисних штамів мікроорганізмів рекомендовано як новий біотехнологічний захід, який сприяє збільшенню біомаси та зростанню фізіологічної активності культур [3].

У наших попередніх дослідженнях вивчено дію ріст-стимулюючих препаратів (Агростимулін, Емістим С, Біолан) на продуктивність біомаси та активність продукування лужної

фосфатази клітинами *Enterobacter nimipressuralis* 32-3. Показано, що додавання у поживне середовище для культивування *E. nimipressuralis* 32-3 зазначених препаратів сприяє збільшенню біомаси клітин та зростанню фосфатазної активності [4]. За результатами цих дослідів встановлено, що найкращим є регулятор росту Біолан (вдосконалений продукт біотехнологічного вирощування грибів-епіфітів з кореневої системи лікарських рослин).

Враховуючи вищесказане, мета наших досліджень полягала у визначенні дії стимулятора росту Біолану на кількісний та якісний вміст фітогормонів, що продукує бактерія *E. nimipressuralis* 32-3 – основа біопрепарату Фосфоентерину.

Матеріали і методи. Визначення активності синтезу фітогормонів бактерією *E. nimipressuralis* 32-3 проведено в умовах лабораторного досліді. Культивування штаму здійснювали на глюкозо-аспарагіновому (ГА) середовищі за динамічних умов (240 об./хв.) при температурі 28 °С протягом 48 годин. Інокулянтотом слугувала добова маточна культура, яку одержували на ГА середовищі (титр $2,2 \cdot 10^9$). Для аналізу використали нативне поживне середовище, в якому культивували *E. nimipressuralis* 32-3, та культуральне середовище, в яке додавали Біолан, люб'язно наданий нам С.П. Пономаренко. При цьому до 9 мл середовища додавали 1 мл маточної культури і 1 мл розчину рiстрегулятора (10^{-7} мг/л).

Перед екстракцією культуральну рідину центрифугували (20 хв) при 6000 об./хв. Екстракцію фітогормонів проводили у ділильних лійках: тричі по 15 хвилин при енергійному струшуванні суміші. Об'єднані екстракти висушували Na_2SO_4 (безводним), фільтрували, упарювали досуха та змивали 3 мл 70 %-ного етанолу. Для екстракції β -індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) застосовували діетиловий ефір (1:1 по об'єму) при рН 3, підкислення проводили 2н НСІ. Екстракцію гіберелінів проводили етилацетатом (1:3 по об'єму) при рН 2,5, підкислення – 1н НСІ; цитокінінів – н-бутанолом (1:1 при рН 8), підлуження – 1н NaOH [5].

Для визначення активності синтезу фітогормонів бактерією *E. nimipressuralis* 32-3 застосовували специфічні біотести: для ІОК – колеоптилі пшениці сорту Альбатрос одеський [6], гіберелінів – мезокотилі кукурудзи гібриду Росава [7].

Визначення вмісту фітогормонів у культуральній рідині

бактерії *E. nimipressuralis* 32-3 проводили методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [8]. Для екстракції використали 96 %-ний етанол. Попереднє очищення та концентрування етанольного екстракту проводили на хроматографічних пластинках марки Silufol UV₂₅₄ («Chemapol», Чехія). Експрес-очищення включало наступні кроки хроматографування: 1) у хлороформі, 2) в NH₃ 12,5 %, 3) у системі розчинників: етилацетат – оцтова кислота (20:1). Зони, що співпадали з Rf 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 використали 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. За результатами досліджень найвищі показники приросту колеоптилів пшениці відмічено при розведенні екстрактів у 500 і 1000 разів, як при застосуванні регулятора росту рослин, так і без нього, що підтверджує дані попередніх досліджень [9, 10]. Так, найбільший приріст колеоптилів пшениці спостерігали при розведенні екстракту, одержаного з культуральної рідини без додавання регулятора росту рослин, у 500 разів – 27,9 % до контролю. Додавання Біолану в поживне середовище для культивування штаму *E. nimipressuralis* 32-3 сприяло приросту колеоптилів пшениці на 24,9 та 27,9 % до контролю при розведенні екстракту у 500 та 1000 відповідно (табл. 1).

За результатами специфічних біотестів для гіберелінів встановлено, що більший ефект від їх дії спостерігався при розведенні екстрактів у 500 і 1000 разів. Найбільший приріст мезокотилів кукурудзи відмічено при розбавленні в 1000 разів екстракту культуральної рідини – 31,7 % порівняно з контролем. Виявлено також позитивну дію екстракту культуральної рідини і при додаванні Біолану в поживне середовище: приріст мезокотилів кукурудзи у випадку розбавлення в 500 та 1000 разів становив 23,3 та 28,0 % до контролю, відповідно (табл. 2).

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

Варіанти досліджу	Довжина відрізків, мм	Приріст до контролю, %
Контроль (вода)	10,5	–
ІОК 10 ⁻⁴	11,5	9,9
ІОК 10 ⁻⁵	12,2	15,8
Розбавлення екстракту 1:100	12,2 / 11,3	16,2 / 7,4
Розбавлення екстракту 1:250	12,3 / 12,5	16,9 / 18,8
Розбавлення екстракту 1:500	13,4 / 13,1	27,9 / 24,9
Розбавлення екстракту 1:1000	12,9 / 13,4	23,1 / 27,9
НІР ₀₅	0,64	–

Примітка: в чисельнику – без Біолану, в знаменнику – з додаванням Біолану.

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

Варіанти досліджу	Довжина відрізків, мм	Приріст до контролю, %
Контроль (вода)	8,6	–
ГК 10 ⁻⁵	10,5	22,3
Розбавлення екстракту 1:100	8,7 / 9,3	1,5 / 7,7
Розбавлення екстракту 1:250	10,1 / 9,9	17,0 / 14,8
Розбавлення екстракту 1:500	9,3 / 10,6	8,4 / 23,3
Розбавлення екстракту 1:1000	11,3 / 11,0	31,7 / 28,0
НІР ₀₅	0,67	

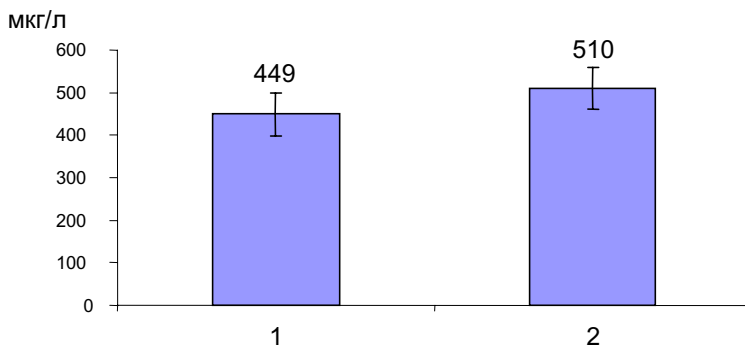
Примітка: в чисельнику – без Біолану, в знаменнику – з додаванням Біолану.

Таким чином, результати специфічних біотестів свідчать про те, що додавання у склад поживного середовища фіторегулятора Біолану мало впливає на синтез бактерією *E. nimipressuralis* 32-3 екзометаболітів: ІОК та речовин гіберелінової природи.

Результати проведених нами раніше хроматографічних досліджень свідчать, що *E. nimipressuralis* 32-3 продукує фітогормони: ауксини, які представлені індоліл-3-оцтовою кислотою,

цитокиніни (зеатин та зеатин-рибозид) та гібереліни [11].

При визначенні хроматографічним методом впливу Біолану на синтез ауксинів бактерією *E. nimipressuralis* 32-3 встановлено, що препарат слабо впливає на зміни показників. Так, кількість ІОК у зразках культуральної рідини без додавання регулятора росту рослин становила 449 мкг/л, а при додаванні Біолану – 510 мкг/л, що лише на 13,6 % перебільшувало значення контрольного варіанту (рис. 1).



1 – контроль; 2 – зразок з додаванням Біолану

Рис. 1. Вплив регулятора росту рослин Біолану на вміст β -індоліл-оцтової кислоти у культуральній рідині *E. nimipressuralis* 32-3

Відмічено різну дію Біолану на продукування бактерією зеатину та зеатин-рибозиду. Так, кількість зеатину у зразках без додавання регулятора росту рослин становила 254 мкг/л (рис. 2). Додавання Біолану сприяло зростанню кількості зеатину: в культуральній рідині з цього варіанту його вміст становив 615 мкг/л, що в 2,4 раза перебільшувало показники контролю.

При аналізі результатів наших досліджень необхідно відмітити протилежну дію регулятора росту рослин на вміст зеатин-рибозиду. Так, при культивуванні *E. nimipressuralis* 32-3 без додавання Біолану його кількість становила 366 мкг/л, а додавання регулятора росту рослин знизило вміст цього фітогормону в 3 рази – до 117 мкг/л (рис. 2). Загальна кількість цитокинінів у культуральній рідині *E. nimipressuralis* 32-3 у зразках без додавання Біолану та з додаванням регулятора росту рослин сягала 620 та 732 мкг/л відповідно.

Таким чином, додавання до складу поживного середовища фітостимулятора Біолану стимулює синтез цитокінінів на 18 %, причому їх більша частина знаходиться у вигляді зеатину – активній вільній формі.

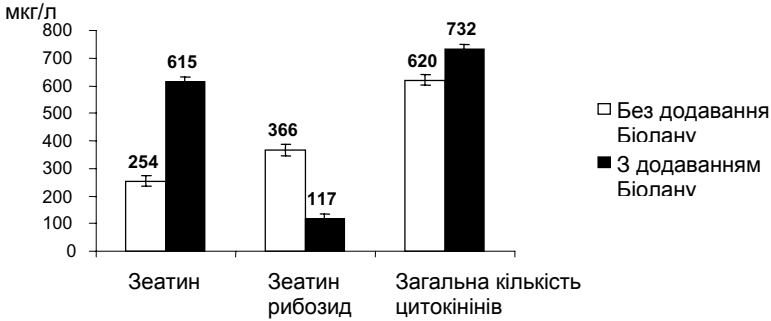
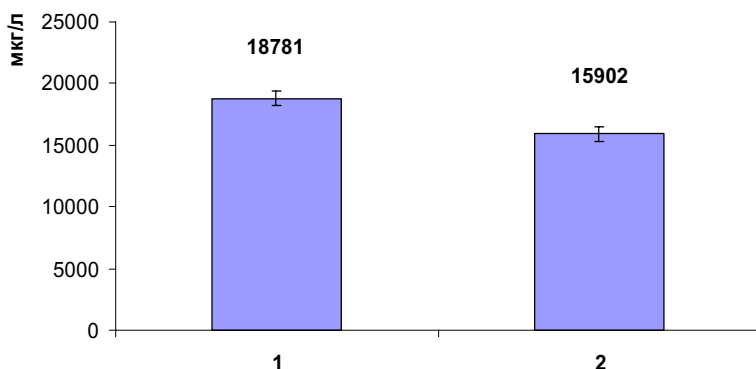


Рис. 2. Вплив Біолану на вміст цитокінінів у культуральній рідині *E. nimipressuralis* 32-3

Аналізуючи одержані результати, можна констатувати, що додавання Біолану в поживне середовище індукує помірне зростання синтезу β -індоліл-3-оцтової кислоти та цитокінінів, а також сприяє переходу останніх у вільні активні сполуки.

На наш погляд, ці зміни пов'язані саме з впливом фіторегулятора на активізацію фізіолого-біохімічної діяльності *E. nimipressuralis* 32-3, а не з механічним зростанням кількості фізіологічно активних речовин за рахунок додавання Біолану, оскільки в об'ємі рістрегулятора, доданому до поживного середовища, кількість фітогормонів незначна – 10^{-2} нг/л.

Кількісне визначення фітогормонів також свідчить про те, що в культуральній рідині *E. nimipressuralis* 32-3 виявлено неідентифіковані речовини гіберелінової природи у досить високих кількостях (рис. 3). Так, вміст гіберелінів у зразку без додавання Біолану становив 18781 мкг/л. Додавання Біолану дещо знизило продукування гіберелінів: їх кількість у культуральній рідині становила 15902 мкг/л, що на 15 % менше, ніж у контрольному варіанті.



1 – зразок без додавання Біолану; 2 – зразок з додаванням Біолану

Рис. 3. Вплив Біолану на вміст гіберелінів у культуральній рідині *E. nimipressuralis* 32-3

Таким чином, додавання у поживне середовище регулятора росту рослин Біолану впливає на синтез фітогормонів: збільшується вміст ІОК на 13,6 %, зростає загальна кількість цитокінінів – на 18 % та знижується вміст гіберелінів на 15 %. Відмічено позитивну дію Біолану на активний перехід зв'язаних форм цитокінінів (зеатин-рибозид) у вільні активні сполуки (зеатин).

1. Іутинський О.В. Вплив нових регуляторів росту рослин на *Bacillus megaterium* 5 – основу фосфобактерину /О.В. Іутинський, С.П. Пономаренко //Наукові записки Тернопільського держ. пед. ун-ту ім. Володимира Гнатюка. Сер. Біологія. – 2003. – С. 41-45.

2. Іутинський О.В. Резистентність фосфатмобілізівної бактерії *Bacillus megaterium* 5 до стресових факторів /О.В. Іутинський, А.А. Піндрус //Фосфор і калій у землеробстві. Проблеми мікробіологічної мобілізації. – Чернігів-Харків, 2004. – С. 48-55.

3. Иутинская Г.А. Разработка комплексных препаратов на основе микроорганизмов и фиторегуляторов /Иутинская Г.А. //Radostim 2007. Гуминовые кислоты и фитогормоны в растениеводстве: междунар. конф. – К., 2007. – С. 27-30.

4. Чайковская Л.А. Влияние регуляторов роста растений на фосфатмобилизирующую бактерию *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 /Чайковская Л.А., Баранская М.И. //Міжнародна наукова конференція «Мікробні біотехнології»: тези доп. – Одеса: Астропринт, 2006. – С. 105.

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

6. 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.

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

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

9. Чайковская Л.А. Влияние фиторегулятора биолана на синтез физиологически активных веществ бактерией *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 /Л.А. Чайковская, М.И. Баранская //Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: матер. междунар. науч. конф. (Минск, 2-6 июня 2008 г.): в 2 т. /под. ред. Э.И. Коломиец. – Минск: Изд. И.П. Логвинов. – Т. 1. – 2008. – С. 311.

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

11. Чайковська Л.О. Бактерія *Enterobacter nimipressuralis* 32-3. – продуцент фітогормонів /Чайковська Л.О., Баранська М.І. //С.-г. мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб. – Чернігів: ЦНТЕІ, 2009. – Вип. 9. – С. 68-75.

ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРА РОСТА РАСТЕНИЙ БИЛАНА НА ФИТОГОРМОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3

Чайковская Л.А., Баранская М.И.

Южная опытная станция Института сельскохозяйственной микробиологии УААН, пгт. Гвардейское

*Исследовано влияние фиторегулятора роста растений Биолана на активность продуцирования фитогормонов бактерией *Enterobacter nimipressuralis* 32-3. Показано, что добавление в питательную среду Биолана увеличивает количество индолилуксусной кислоты (ИУК) и цитокининов (на 13,6 и 18 % соответственно), а также снижает на 15 % содержание веществ гиббереллиновой природы.*

Ключевые слова: *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, фитогормоны, Биолан.

**THE INFLUENCE OF PLANT GROWTH REGULATOR
BIOLAN ON THE PHYTOHORMONAL ACTIVITY
OF *ENTEROBACTER NIMIPRESSURALIS* 32-3**

Chaikovska L.A., Baranska M.I.

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

*The influence of plant growth regulator Biolan on the ability of bacterium *Enterobacter nimipressuralis* 32-3 to synthesize phytohormones was investigated. It was revealed, that addition of Biolan in a nutrient medium had increased the quantity of indole-acetic acid (IAA) and cytokinins (by 13,6 and 18 % correspondingly), and had reduced on 15 % the content of gibberellin-like substances.*

Key words: *Enterobacter nimipressuralis* 32-3, phytohormones, *Biolan*.