

Л.О. Білявська

Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна,
тел.: +38(044)526 34 79, e-mail: bilyuvskal@gmail.com

БІОСИНТЕЗ АУКСИНІВ ГРУНТОВИМИ СТРЕПТОМІЦЕТАМИ – АНТАГОНІСТАМИ ФІТОПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ І НЕМАТОД

Мета. Дослідити біосинтез ауксинів ґрунтовими стрептоміцетами – антагоністами фітопатогенів та фітонематод. **Методи.** Ауксини в супернатанті культуральної рідини та етанольних екстрактах біомаси продуцентів визначали методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії. **Результати.** В стаціонарну фазу росту в супернатанті культуральної рідини та біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 накопичується значна кількість речовин ауксинової природи. Окрім основних активних форм ауксинів індол-3-оцтової та індол-3-масляної кислот серед метаболітів виявлені індол-3-оцтової кислоти гідразид, індол-3-карбінол, індол-3-карбоксальдегід і індол-3-карбонова кислота. **Висновок.** Рістстимулювальна активність метаболітних препаратів, розроблених на основі зазначених ґрунтових стрептоміцетів, значною мірою обумовлена їх здатністю до активного синтезу ауксинів, зокрема індол-3-оцтової та індол-3-масляної кислот.

Ключові слова: фітогормони ауксинової природи, індол-3-оцтова кислота, індол-3-масляна кислота, ґрунтові стрептоміцети.

Актинобактерії є досить поширеною в природі, а особливо в ґрунті, групою мікроорганізмів. Вони становлять від 20 до 46% усього різноманіття ґрунтової мікробіоти. Понад 10 000 сполук, що становить 45% від загальної кількості метаболітів мікробного походження, синтезовані актинобактеріями. Більшість речовин, що ними продукуються, виявляють антагоністичні властивості до збудників захворювань [14].

Активними продуцентами метаболітів для біоконтролю чисельності фітопатогенів є представники роду *Streptomyces* [9], оскільки синтезують речовини антибактеріальної, антигрибної та антипаразитарної дії. Крім того, вони продукують широкий спектр біологічно активних речовин: амінокислоти, ферменти, вітаміни, фосфоліпіди, стерини, ненасичені жирні кислоти, та інші, більшість з яких характеризується рістрегулюючою дією, а також є індукторами стійкості рослин до фітопатогенів та несприятливих факторів довкілля [4, 7, 10].

Значна роль у регуляції росту і розвитку рослин та встановленні мікробно-рослинних взаємодій належить фітогормонам, продуцентами яких в пере-



важній більшості є ґрунтова мікробіота [6]. До синтезу фітогормонів здатні ґрунтові асоціативні і вільноіснуючі мікроорганізми, що відносяться до родин *Azotobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* та ін. Найменш вивченими в цьому відношенні є представники родини Actinomycetaceae, які також є постійним компонентом ґрунтових і ризосферних мікробних угруповань [13].

Серед фітогормональних сполук важлива регуляторна роль в різноманітних ростових процесах як рослин, так і мікроорганізмів належить ауксином, які за хімічною природою є похідними індолу. Вони впливають на різні системи метаболізму: синтез нуклеїнових кислот, білка, вуглеводний і ліпідний обмін, синтез вторинних метаболітів та ін. Ауксини необхідні ґрунтовим мікроорганізмам для їх росту, розвитку, а також для встановлення зв'язків з рослинами та іншою мікробіотою. [11].

Дослідження синтезу комплексу фітогормонів ауксинової природи ґрунтовими стрептоміцетами, перспективними для створення на їх основі метаболітичних препаратів для агропромисловості, є актуальним. Імовірно, що шляхи і активність біосинтезу ауксинів стрептоміцетами будуть різнитися залежно від умов культивування, зокрема складу поживного середовища.

Метою роботи було дослідити біосинтез ауксинів ґрунтовими стрептоміцетами – антагоністами фітопатогенів і фітонематод за умов культивування на синтетичному та органічному середовищах.

Матеріали та методи досліджень

Об'єктами досліджень були свіжовиділені співробітниками відділу загальної і ґрунтової мікробіології Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України (ІМВ НАНУ) з каштанового ґрунту та ідентифіковані штами стрептоміцетів *Streptomyces netropsis* УКМ Ас-2186 та *S. violaceus* УКМ Ас-2191, які виявляють антагонізм до фітопатогенних мікроорганізмів і нематод, а також позитивно впливають на ріст і розвиток рослин [1].

Для вивчення ауксинсинтезувальної здатності досліджувані штами стрептоміцетів вирощували на рідких середовищах: синтетичному – крохмалоаміачному та органічному – соєвому. Культивування проводили впродовж 7-ми діб (стаціонарна фаза росту) на роторних качалках (240 об./хв) у скляних колбах об'ємом 750 мл за температури $+28 \pm 1$ °C [2]. Етанольні екстракти з біомаси продуцентів отримували за модифікованою методикою [2].

Вміст ауксинів в супернатанті культуральної рідини та етанольних екстрактах біомаси продуцентів визначали методом кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії з використанням приладу «Camag TLC Scanner» (Швейцарія) [3]. Як стандарти використовували чисті сполуки: індол-3-оцтову кислоту (ІОК), індол-3-масляну кислоту (ІМК), індол-3-оцтової кислоти гідразид, індол-3-карбінол, індол-3-карбоксальдегід та індол-3-карбонову кислоту («Sigma» США).

Біомасу визначали гравіметричним методом і виражали у мг (г) в перерахунку на 1 мл (л) культуральної рідини [2].



Досліди проводили в чотирьох повторностях. Розрахунки і статистичну обробку отриманих даних виконували за допомогою комп'ютерних програм Statistica 6.0 та Microsoft Excel '00.

Результати та їх обговорення

Біохімічні дослідження супернатанту культуральної рідини та екстракту біомаси досліджуваних стрептоміцетів *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 показали їх здатність до синтезу ауксинів як на синтетичному, так і на органічному середовищах (таблиця). Аналіз комплексу ауксинів в супернатанті культуральної рідини та біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191, вирощених в умовах глибинного культивування, показав, що окрім індол-3-оцтової кислоти (ІОК) в них виявлено індол-3-масляну кислоту (ІМК), що утворюється на шляху біосинтезу ІОК, а також індол-3-оцтової кислоти гідрозид, індол-3-карбоксальдегід, індол-3-карбінол і індол-3-карбонову кислоту, які є продуктами трансформації ІОК [4].

Рівень синтезу стрептоміцетами ІОК, яка проявляє найбільшу біологічну активність та є основним ауксином, в супернатанті культуральної рідини та біомасі значно різнився. В біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 вирощених як на синтетичному, так і на органічному середовищах накопичення ІОК було більшим ніж в супернатанті культуральної рідини в 61,6–131,4 та 15,2–18,2 разів відповідно. На синтетичному крохмало-аміачному середовищі рівень синтезу ІОК досліджуваними стрептоміцетами був нижчим в середньому в 1,2–4,6 рази порівняно з органічним соєвим середовищем, що пов'язано з наявністю в останньому джерела триптофану. Відомо, що у мікроорганізмів функціонує декілька альтернативних шляхів біосинтезу ІОК [4, 14], але основні пов'язані з використанням як попередника незамінної амінокислоти триптофану, який входить до складу компонентів соєвого середовища. При рості стрептоміцетів на синтетичному крохмало-аміачному середовищі біосинтез похідних попередників ауксинів відбувається *de novo*. З літератури відомо, що для стрептоміцетів характерна значна мінливість у продукуванні ІОК (від 1,04 до 22,56 мкг/мл), а додавання в середовище культивування триптофану (2 мг/мл) сприяє збільшенню рівня накопичення ауксинів від 60,95 до 144 мкг/мл [5, 15]. Це значно вище ніж у рослин, що, імовірно, може сприяти ґрунтовим стрептоміцетам у встановленні відповідних взаємозв'язків з ними та мікроорганізмами. Більш того, відомо, що епіфітні та ризосферні мікроорганізми відіграють першочергову роль у перетворенні триптофану рослинних ексудатів в ІОК [4].

Найбільш інтенсивно *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 продукували індол-3-масляну кислоту (ІМК), рівень накопичення якої в біомасі був відповідно у 2–3 та 2,5–5,5 рази вищим ніж ІОК. ІМК може бути запасною формою ІОК, так і самостійно проявляти значну ауксинову активність [8]. Слід зазначити, що ІМК є більш стабільною сполукою ніж ІОК, а за потреби можливе їх швидке взаємоперетворення [8].



Таблиця
Table

Біосинтез ауксинів стрептоміцетами на синтетичному та органічному середовищах

Auxins biosynthesis by streptomycetes on the synthetic and organic nutrient mediums

Фітогормони	Вміст фітогормонів, мкг/мл або г АСБ*					
	<i>S. peptoris</i> УКМ Ас-2186			<i>S. violaceus</i> УКМ Ас-2191		
	Крохмало-аміачне середовище		Сосве середовище	Крохмало-аміачне середовище		Сосве середовище
СКР	Б	СКР	Б	СКР	Б	
Індол-3-оцтова кислота	0,10±0,01	6,04±0,82	0,21±0,09	27,85±1,76	0,55±0,19	9,90±1,05
Індол-3-масляна кислота	4,16±0,67	18,82±1,45	4,88±0,74	54,54±2,46	3,24±0,6	24,76±1,66
Індол-3-оцтової кислоти гідразид	0,75±0,29	0,46±0,23	1,22±0,37	14,27±1,26	0,69±0,23	5,00±0,75
Індол-3-карбоксамільдегід	0,42±0,21	1,47±0,4	0,56±0,25	7,54±0,92	0,26±0,12	4,01±0,67
Індол-3-карбінол	0	0,37±0,12	0	0,06±0,03	0	0
Індол-3-карбоксілова кислота	0,46±0,22	0,02±0,01	0,33±0,11	2,68±0,55	0,25±0,13	0,01±0,002
Всього ауксинів	5,89±0,81	27,18±1,74	7,20±0,89	106,94±3,45	4,99±0,74	43,68±2,20
Накопичення біомаси (г/л)	-	5,10±0,75	-	21,10±1,53	-	5,30±0,77

Примітка: * АСБ – абсолютно суха біомаса, СКР – супернатант культуральної рідини, Б – біомаса

Note: * АСБ – absolutely dry biomass, СКР – supernatant of cultural liquid,

Б – biomass



Рістстимулювальна активність інших виявлених індолних сполук є дещо слабшою, але не менш важливою. Визначені в досліджуваних стрептоміцетах індол-3-карбоксальдегід та індол-3-оцтової кислоти гідразид за літературними даними можуть інгібувати розвиток фітопатогенних мікроорганізмів [12]. Виявлені нами індол-3-карбінол, індол-3-карбоксальдегід та індол-3-карбонова кислота є неактивними формами ауксинів, які утворюються в результаті деградації ІОК. Більшість мікроорганізмів мають активні ферментні системи (пероксидазну та ІОК-оксидазну), здатні за короткий час здійснювати деградацію надлишкових кількостей ІОК [4].

Загальний вміст фітогормонів ауксинової природи при рості на синтетичному середовищі в супернатанті культуральної рідини та біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 був у 1, 2 і 3,9 та 1,7 і 2,6 рази меншим ніж на органічному середовищі, відповідно. Різниця між двома штамами у рівні накопичення ауксинів в супернатанті культуральної рідини була майже незначною. Тоді як у біомасі *S. violaceus* УКМ Ас-2191 кількість ауксинів була у 1,6 рази вищою порівняно з *S. netropsis* УКМ Ас-2186. Частка ІОК в сумарній фракції ауксинів в супернатанті культуральної рідини і біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 в середньому склала 2,3–24% та 10,3–16,7% відповідно.

Досліджувані стрептоміцети більшість ауксинів накопичували в біомасі, рівень синтезу якої був у 3,3–4,0 рази вищим на органічному середовищі ніж на синтетичному. Це говорить про переваги застосування соєвого середовища перед крохмало-аміачним для максимального використання біотехнологічного потенціалу досліджуваних стрептоміцетів.

З літератури відомо про здатність ауксинів в оптимальних концентраціях сприяти збільшенню накопичення біомаси стрептоміцетів, споруляції та інтенсифікації деяких процесів метаболізму, в тому числі і синтезу антибіотиків [4, 12]. Існують дані, що вони можуть виконувати певні біокаталітичні функції в самій мікробній клітині, регулювати біосинтез інших гормонів та ін. [4], однак це питання потребує подальшого вивчення.

Таким чином, нами показано, що в стаціонарну фазу росту в супернатанті культуральної рідини та біомасі *S. netropsis* УКМ Ас-2186 і *S. violaceus* УКМ Ас-2191 накопичується значна кількість речовин ауксинової природи як при культивуванні на синтетичному, так і органічному середовищах. Окрім основних активних форм ауксинів (індол-3-оцтової та індол-3-масляної кислот) серед метаболітів були виявлені також індол-3-карбінол, індол-3-карбонова кислота, індол-3-карбоксальдегід і індол-3-оцтової кислоти гідразид, що є продуктами деградації ІОК, а останні можуть проявляти антимікробну дію. Важливе значення має той факт, що серед ауксинів, синтезованих досліджуваними стрептоміцетами, в значній кількості накопичується індол-3-масляна кислота, яка поряд з високою фітогормональною активністю є більш стійкою сполукою порівняно з ІОК. Рістстимулювальна активність препаратів, розроблених на основі метаболітів досліджуваних ґрунтових стрептоміцетів, на нашу думку, значною мірою зумовлена їх підвищеною здатністю до синтезу



ауксинів, зокрема індол-3-оцтової (6,04–27,85 мкг/г АСБ) та індол-3-масляної (3,24–67,22 мкг/г АСБ) кислот. Розуміння оптимальних умов біосинтезу останніх, надає нові інструменти для вирішення складних питань взаємозв'язків рослина-мікроорганізм та мікроорганізм-мікроорганізм. Як супернатанти культуральних рідин досліджуваних штамів ґрунтових стрептоміцетів, так і етанольні екстракти їх біомаси є перспективними для створення нових ефективних поліфункціональних біопрепаратів, що поєднують у собі антагоністичну активність до фітопатогенів і фітонематод і одночасно проявляють властивості регуляторів росту рослин та адаптогенів.

Л.А. Белявская

Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина,
тел. : +38 (044) 526 34 79, e-mail: bilyuvskal@gmail.com

БИОСИНТЕЗ АУКСИНОВ ПОЧВЕННЫМИ СТРЕПТОМИЦЕТАМИ – АНТАГОНИСТАМИ ФИТОПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ И НЕМАТОД

Реферат

Цель. Исследование биосинтеза ауксинов почвенными стрептомицетами – антагонистами фитопатогенов и фитонематод. **Методы.** Ауксины в супернатанте культуральной жидкости и этанольных экстрактах биомассы продуцентов определяли методом количественной спектроденситометрической тонкослойной хроматографии. **Результаты.** В стационарную фазу роста в супернатанте культуральной жидкости и биомассе *S. petropolis* УКМ Ас-2186 и *S. violaceus* УКМ Ас-2191 накапливается значительное количество ауксинов. Кроме основных активных форм индол-3-уксусной и индол-3-масляной кислот среди метаболитов обнаружены индол-3-уксусной кислоты гидразид, индол-3-карбинол, индол-3-карбоксальдегид и индол-3-карбоновая кислота. **Выводы.** Рострегулирующая активность метаболитных препаратов, разработанных на основе указанных почвенных стрептомицетов в значительной степени обусловлена их способностью к активному синтезу ауксинов, в частности индол-3-уксусной и индол-3-масляной кислот.

Ключевые слова: фитогормоны ауксиновой природы, индол-3-уксусная кислота, индол-3-масляная кислота, почвенные стрептомицеты.



L.O. Biliavska

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NASU,
154, Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine, tel. +38 (044) 526 34 79,
e-mail: bilyuvskal@gmail.com

AUXINS BIOSYNTHESIS BY SOIL STREPTOMYCES – THE ANTAGONISTS OF PHYTOPATHOGENIC MICROORGANISMS AND NEMATODES

Summary

Aim. Research of the auxins biosynthesis by soil streptomycetes – the antagonists of phytopathogenic microorganisms and plant parasitic nematodes on synthetic and organic nutrient mediums. **Methods.** Auxins were determined by the quantitative of spectrodensitometric thin layer chromatography in the supernatants of cultural liquid and ethanol extracts of biomass. **Results.** In the stationary growth phase in the supernatants of cultural liquid and biomass of *S. netropsis* UCM Ac-2186 and *S. violaceus* UKM Ac-2191 accumulated a significant amount of auxins. Besides the basic active forms of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid the metabolites contained the indole-3-acetic acid hydrazide, indole-3-carbinol, indole-3-carboxaldehyde and indole-3-carboxylic acid. **Conclusions.** The plant growth regulate activity of metabolite bioformulations developed on the basis of soil streptomycetes is largely due to their increased ability to auxins biosynthesis, particularly indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid.

Key words: phytohormones of auxin nature, indole-3-acetic acid, indole-3-butyric acid, soil streptomycetes.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Білявська Л.О., Козирицька В.Є., Коломісць Ю.В., Бабич О.Г., Іутинська Г.О. Фітозахисні та рістрегулювальні властивості метаболітичних препаратів на основі ґрунтових стрептоміцетів // Доповіді НАН України. – 2015. – № 1. – С. 131–137.
2. Белявская Л.А., Козырицкая В.Е., Валагурова Е.В., Иутинская Г.А. Биологически активные вещества препарата аверком // Микроб. журнал. – 2012. – Т. 74, № 3. – С. 10–15.
3. Савинский С.В., Драгозов И.В., Педченко В.К. Определение зеатина, индоллил-3-уксусной и абсцизовой кислот из одной растительной пробы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Физиология и биохимия культ. растений. – 1991. – Т. 23, № 6. – С. 606–614.
4. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы – продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 133–143.



5. *Abd-Alla M.H., El-Sayed A., Rasmey A.-H.M.* Indole-3-acetic acid (IAA) production by *Streptomyces atrovirens* isolated from rhizospheric soil in Egypt // *Journal of Biology and Earth Sciences*. – 2013. – V. 3, № 2. – P. B1 82–B1 93.

6. *Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J.* Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria // *Curr Opin Plant Biol*. – 2001. – V. 4, № 4. – P. 343–350.

7. *Brader G., Compant S., Mitter B. et al.* Metabolic potential of endophytic bacteria // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2014. – V. 27. – P. 30–37.

8. *Epstein E. and Müller J.-L.* Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport // *Physiologia plantarum*. – 1993. – V. 88. – P. 382–389.

9. *Genilloud O., Ganzalez I., Salazar O., Martin J., Tormo J.R., Vicente F.* Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – V. 38, № 3. – P. 375–389.

10. *Iutyńska G.* Elaboration of natural polyfunctional preparations with antiparasitic and biostimulating properties for plant growing // *Mikrobiol. J.* – 2012. – V. 74, № 4. – P. 3–12.

11. *Khamna S., Yokota A., Peberdy J. F., Lumyong S.* Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils // *Eurasian Journal of BioSciences*. – 2010. – V. 4. – P. 23–32.

12. *Lacret R., Oves-Costales D., Gómez C., Díaz C., Cruz M., Pérez-Victoria I., Vicente F., Genilloud O., Reyes F.* New ikarugamycin derivatives with antifungal and antibacterial properties from *Streptomyces zhaozhouensis* // *Mar. Drugs*. – 2015. – V. 13. – P. 128–140; doi:10.3390/md13010128

13. *Mac Millan S.* Promoting growth with PGPR // *The Canadian Organic Growth Grower*. – 2007. – № 9. – P. 32–34.

14. *Otto-Hanson L.K., Grabau Z., Rosen C., Salomon C.E., and Kinkel L.L.* Pathogen variation and urea influence selection and success of *Streptomyces* mixtures in biological control // *Phytopathology*. – 2013. – V. 103, № 1. – P. 34–42.

15. *Shutsrirung A., Chromkaew Y., Patnom-Aree W., Choonluchanon S., Boonkerd N.* Diversity of endophytic actinomycetes in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. // *Soil Science and Plant Nutrition*. – 2013. – V. 59. – P. 322–330.

Стаття надійшла до редакції 06.03.2015 р.

