

**І.В. Драгозов, Н.О. Леонова, С.В. Лапа,  
О.В. Піскова, Л.О. Крючкова, Л.В. Авдєєва**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного 154, Київ, МСП, Д03680, Україна*

## **СИНТЕЗ ПОЗАКЛІТИННИХ ФІТОГОРМОНІВ ШТАМАМИ BACILLUS, ВИДІЛЕНИМИ З РІЗНИХ ПРИРОДНИХ ДЖЕРЕЛ**

*Досліджено синтез позаклітинних фітогормонів штамами бактерій роду *Bacillus*, виділеними з різних екологічних ніш (грунт і рослина). Показано, що гормонсинтезувальна здатність вільноіснуючого і ендofітного штамів бацил суттєво відрізняється як за рівнем, так і за спектром синтезованих сполук. Зроблено висновок, що такі відмінності у синтезі бацилами позаклітинних фітогормонів обумовлені різним типом взаємовідносин досліджуваних мікроорганізмів з рослиною-хазяїном.*

*Ключові слова: бактерії роду *Bacillus*, вільноіснуючі сапробіонти, ендofіти, фітогормони, система рослина – грунт.*

Створення ефективних препаратів для рослинництва передбачає, насамперед, дослідження асоціативних та симбіотичних взаємовідношень між мікро- та макроорганізмами, що відбуваються в природних біоценозах. З іншого боку, регуляція процесу формування взаємовідносин між мікроорганізмами та рослиною за допомогою екзосметаболітів штамів-антагоністів лежить в основі біологічного методу захисту рослин.

Мікроорганізми, що активно розвиваються в ризосфері рослин, є ідеальними агентами біоконтролю, оскільки ризосфера забезпечує захист кореневої системи від впливу фітопатогенів. Ризосферні мікроорганізми, що здатні здійснювати біоконтроль, складають менше 10 % від загальної популяції мікробіоти [2, 15, 18]. У цій групі аеробні спороутворюючі бактерії роду *Bacillus* заслуговують на особливу увагу як потенційні агенти біоконтролю, оскільки характеризуються високою життєздатністю в оточуючому середовищі, толерантністю до антропогенних впливів, а також технологічністю у виробництві та застосуванні [1, 13]. Як відомо, бактерії-антагоністи роду *Bacillus* здатні синтезувати комплекс біологічно-активних речовин – антибіотики, вітаміни, ферменти тощо, а також мають високу гормонсинтезувальну здатність [2, 10, 17, 20]. Вважається, що поряд із синтезом антибіотичних сполук, синтез позаклітинних фітогормонів бактеріями, що колонізують ризоплану, має важливе значення для захисту рослин від фітопатогенів.

Метою роботи було дослідження синтезу позаклітинних фітогормонів бактеріями-антагоністами роду *Bacillus*, виділеними з різних екологічних ніш.

**Матеріали і методи.** В роботі використовували два штами бактерій роду *Bacillus*, що зберігаються в Депозитарії ІМВ ім. Д.К. Заболотного НАН України: *Bacillus amyloliquefaciens* 26 Д (ІМВ В-7100) та *B. subtilis* 1401 (ІМВ В-7243). Штам *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100 виділений з внутрішніх частин бавовнику і вважається ендofітним. Він є основою біопрепарату для захисту рослин Спорofіт (комерційна назва «ФітоДоктор»). Препарат застосовується для захисту деяких зернових та технічних культур від хвороб, спричинених фітопатогенними грибами [6].

Штам *B. subtilis* ІМВ В-7243 виділений з ґрунту і є вільноіснуючим сапробіонтом. До характерних особливостей цього штаму слід віднести високу антагоністичну дію до фітопатогенних бактерій роду *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, що викликають бактеріозни зернобобових культур. Штам рекомендовано як основу біопрепарату для захисту бобових рослин від хвороб, збудниками яких є фітопатогенні гриби і бактерії [5].

Культивування кожного із штамів проводили окремо періодичним способом в колбах ємністю 750 мл на качалці (200 об/хв.) при +37°C протягом 18–24 год. у рідкому поживному синтетичному середовищі наступного складу: глюкоза – 2 %, натрію цитрат – 1,29 %, амонію фосфат двозаміщений – 4,75 %, калію фосфат однозаміщений – 9,6 %, натрію гідроксид – 0,18 % (для доведення рН до 6,5–7,0).

Як посівний матеріал використовували культуру бацил в експоненційній фазі росту (18 год). Кількість посівного матеріалу складала 5 % (за об'ємом). Рідку культуру штамів *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100 і *B. subtilis* ІМВ В-7243 в експоненційній фазі росту центрифують.

© І.В. Драгозов, Н.О. Леонова, С.В. Лапа, О.В. Піскова, Л.О. Крючкова, Л.В. Авдєєва, 2013

гували 30 хв. при 15000 г і температурі +4°C. Позаклітинні фітогормони ауксини, цитокініни, гібереліни та абсцизову кислоту (АБК) виділяли із супернатанту культуральних рідин бацил методом перерозподілу у двох не змішуваних між собою фазах [3]. Подальше їх концентрування та очищення проводили методом препаративно-накопичувальної тонкошарової хроматографії. Визначення якісного та кількісного складу ауксинів, цитокінінів та АБК здійснювали методом спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [7]. Кількість позаклітинних фітогормонів розраховували у мкг на 1 г абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента.

Гіберелову активність мікробних екзометаболітів визначали за подовженням гіпокотелю проростків огірків методом Брайена і Хеммінга в модифікації Муромцева і Агністикової [4]. В роботі використовували насіння огірків сорту Фенікс. Як контроль використовували дистильовану воду, як препарат еталон – гіберелову кислоту (ГК<sub>3</sub>) у концентрації 10<sup>-5</sup> М.

Синтез етилену бацилами визначали методом газової хроматографії. Бактерії культивували у флаконах об'ємом 25 мл на твердому скошеному синтетичному середовищі, склад якого наведено вище. Флакони щільно закривали гумовими пробками та спеціальними металевими фіксаторами для запобігання витоку синтезованого етилену. Подальше культивування штамів проводили впродовж 24 год. при температурі +28 °С. Газову суміш аналізували на газовому хроматографі "Хром-5" (Чехія) з полум'яно-іонізаційним детектором (колонка з β-β'оксидіпропіонітрилом). Перерахунок проводили за калібрувальним графіком, побудованим згідно з розведеннями етилену. Кількість аналітичних повторностей – 6-ти кратна.

**Результати та обговорення.** Отримані результати засвідчили, що гормонсинтезувальні здатності двох досліджуваних штамів суттєво відрізнялися між собою як за рівнем, так і за спектром синтезу фітогормональних сполук. Вільноіснуючий штам *B. subtilis* IMB B-7243 характеризувався високим загальним рівнем синтезу фітогормонів та більш широким їх спектром порівняно з ендofітним штамом *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100 (таблиця). Так, нами встановлено, що сумарний рівень синтезу ауксинів штамом *B. subtilis* IMB B-7243 у 4,5 рази перевищував аналогічний показник синтезу у штаму *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100. Останній при цьому не синтезував фізіологічно активної для рослин індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК). Низький сумарний рівень синтезу ауксинів та відсутність фізіологічно активної ІОК у досліджених бактерій деякими дослідниками пояснюється, зокрема, особливостями біології ендofітних штамів бацил. Вважається, що ауксини є звичайними інтермедіатами метаболізму триптофану у цих бактерій і досить часто присутні в культуральній рідині бацил [8, 11, 16]. З іншого боку, високий рівень синтезу ауксинів притаманний більшості фітопатогенних бактерій і розглядається як один із факторів їх патогенності [14, 16, 19]. Це не є характерним для ендofітних мікроорганізмів, що можуть перебувати усередині здорових рослин, не викликаючи симптомів захворювання [9, 11, 15]. Ймовірно, низький базовий рівень синтезу ІОК ендofітним штамом *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100 свідчить про те, що вона не відіграє вирішальної фізіологічної ролі у взаємодії даного мікроорганізму з рослиною.

Таблиця

**Синтез позаклітинних фітогормонів штамми бактерій *B. subtilis* IMB B-7243 і *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100**

Фітогормони		мкг/г АСБ	
		<i>B. subtilis</i> IMB B-7243	<i>B. amyloliquefaciens</i> IMB B-7100
Ауксини	ІОК	3,17	не виявлено
	Індол-3-карбінол	84,77	21,95
	Індол-карбоксальдегід	не виявлено	1,37
	Індол-3-оцтової кислоти гідразин	33,68	3,84
	<b>Сумарний рівень</b>	<b>121,64</b>	<b>27,16</b>
Цитокініни	Зеатин	21,25	112,90
	Зеатин-рибозид	262,99	не виявлено
	Ізопентеніл-аденозин	9,49	18,80
	Ізопентеніл-аденін	19,06	9,28
	<b>Сумарний рівень</b>	<b>312,79</b>	<b>140,98</b>
Абсцизова кислота		5,77	не виявлено
Етилен (нмоль/1 год · АСБ)		3,70	7,96

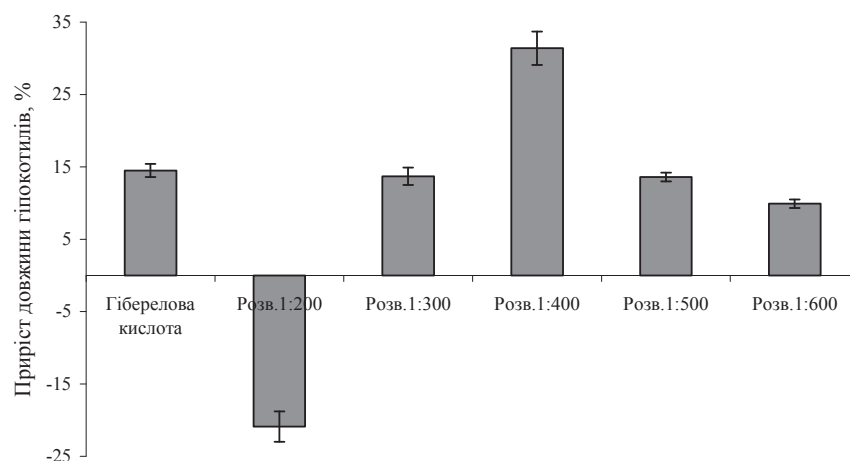
У екстракті культуральної рідини штаму *B. subtilis* ІМВ В-7243 сумарний рівень цитокінінів у 2,2 рази перевищував аналогічний показник у ендоефітного штаму і складав 312,8 мкг/г АСБ проти 141 мкг/г АСБ. Досліджувані штами суттєво відрізнялися і за спектром синтезованих цитокінінів. Так, у штаму *B. subtilis* ІМВ В-7243 більше 80 % від загальної кількості цитокінінів було представлено транспортною формою – зеатин-рибозидом, у той час, як у ендоефітного штаму, навпаки – 80 % спектру цитокінінів було представлено фізіологічно активним цитокініном – зеатином, і повністю був відсутній транспортний цитокінін зеатин-рибозид.

Вищенаведені дані щодо показників гормонсинтезувальної здатності двох штамів, виділених з різних екологічних ніш, дозволяють зробити певні припущення стосовно біологічних особливостей цих двох видів мікроорганізмів. Рівень і спектр синтезу ауксинів і цитокінінів у досліджуваних штамів свідчить про різний характер взаємовідносин мікроорганізмів з рослиною-хазяїном. Так, якщо штам *B. subtilis* ІМВ В-7243 є ґрунтовим сапробіонтом, що синтезує високі рівні ауксинів та цитокінінів, зокрема, ІОК та зеатин-рибозиду, то фітогормони в такій формі ефективно поглинаються рослиною і транспортуються ксилемою до атрагуючих центрів рослини. Мікроорганізми в свою чергу отримують від рослини темнові продукти фотосинтезу (вуглеводи) через кореневі екsudати, стимулюючи в такий спосіб розвиток кореневої системи. Ендоефітні бактерії, ймовірно, розвиваючись у безпосередньому зв'язку з рослиною-хазяїном за спільними еволюційними законами, синтезують нижчий рівень та інший спектр гормонів-стимуляторів, що чітко показано у наших дослідках із синтезу цитокінінів та ауксинів. Ендоефіти, перебуваючи всередині рослинної тканини, забезпечують її фізіологічно активним цитокініном – зеатином, що регулює в рослинній тканині процеси поділу клітин, біосинтезу білка і хлорофілів.

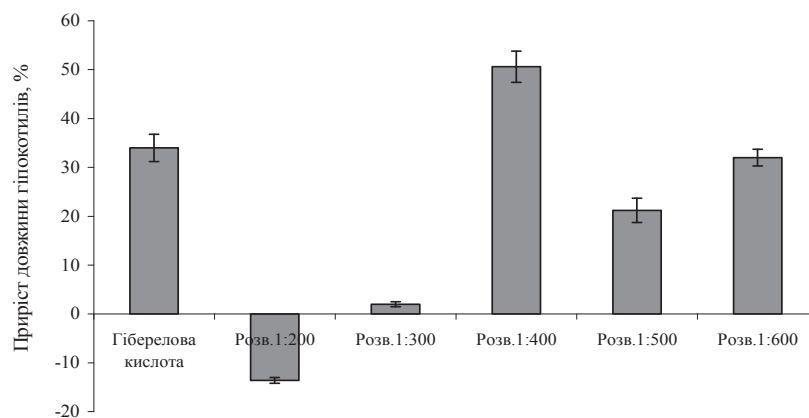
Стосовно синтезу гіберелінів слід зазначити, що обидва штами здатні до синтезу гіберелових кислот, що підтверджується методами специфічного біотестування (рисунок). Приріст довжини гіпокотилів огірків сорту Фенікс за дії екстракту культуральної рідини *B. subtilis* ІМВ В-7243 у розведенні 1:400 перевищував аналітичний показник препарату еталону (синтетична гіберелова кислота) у 2,2 рази, а за дії такого ж розведення екстракту *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100 – у 1,5 рази. Здатність аеробних спороутворюючих бактерій роду *Bacillus* синтезувати фітогормони гіберелової природи відома достатньо давно. Зокрема, штами бактерій *B. cereus* MJ-1, *B. macroides* CJ-29 та *B. pumilis* CJ-69В, виділені із ризосфери рослин перцю, при вирощуванні в рідкій культурі синтезували гібереліни [12]. Для остаточних висновків щодо здатності бацил синтезувати гіберелові кислоти, необхідно провести додаткові дослідження та модифікацію методу підготовки зразків до високоефективного рідинно-хроматографічного аналізу.

В результаті досліджень встановлена відсутність синтезу АБК ендоефітним штамом *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100, у той час як вільноіснуючий штам *B. subtilis* ІМВ В-7243 синтезував невелику кількість АБК. Отримані результати свідчать на користь ендоефітного способу виживання певних бацил (відсутній синтез стресового для рослин гормону), оскільки фізіологічна доцільність синтезу різних класів фітогормонів безпосередньо пов'язана з формуванням взаємовідносин з рослиною-хазяїном. Підтвердженням цього припущення можуть бути і результати щодо здатності синтезувати в системі *in vitro* інший фітогормон-інгібітор – етилен чистими культурами досліджуваних штамів мікроорганізмів. Так, штам-ендоефіт *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100 має більш ніж у 2 рази вищий рівень синтезу інгібіторного фітогормону етилену (7,96 проти 3,7 нмоль/1 год · г АСБ). Спираючись на корелятивні зв'язки між синтезом всіх класів фітогормонів у рослин (т.з. непряма взаємодія), підвищення ендоефітного пулу етилену в тканинах рослини може знижувати рівень синтезу і транспортування ІОК [14]. Ймовірно, в такий спосіб ендоефітні мікроорганізми можуть впливати на метаболізм ауксинів в рослинних тканинах.

Таким чином, як показали наші дослідження, синтез позаклітинних фітогормонів штамом-ендоефітом *B. amyloliquefaciens* ІМВ В-7100 та штамом-сапробіонтом *B. subtilis* ІМВ В-7243, виділеними з різних екологічних ніш, суттєво відрізняється як за рівнем, так і за спектром синтезованих сполук. Такі відмінності у гормонсинтезувальній здатності бацил обумовлені, ймовірно, різним типом взаємовідносин досліджуваних мікроорганізмів з рослиною-хазяїном, адже спосіб виживання бактерій вимагає від них адаптивних біосинтетичних модифікацій метаболізму фітогормональних сполук для ефективної взаємодії з рослиною.



А



Б

**Рисунок. При́рїст довжини гіпокотїлїв огїркїв сорту Фенїкс за дїї екстрактїв культуранїї рїдини *B. subtilis* IMB B-7243 (А) та *B. amyloliquefaciens* IMB B-7100 (Б) (специфїчний біотест на гїберелову активнїсть).**

*И.В. Драговоз, Н.О. Леонова, С.В. Лапа, Е.В. Писковая, Л.А. Крючкова, Л.В. Авдеева*

*Институт мїкробїологїи и вирусологїи им. Д.К. Заболотного НАН України, Киев*

### **СИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФИТОГОРМОНОВ ШТАММАМИ *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРИРОДНЫХ ИСТОЧНИКОВ**

#### **Резюме**

Исследован синтез внеклеточных фитогормонов штаммами бактерий рода *Bacillus*, выделенными из различных экологических ниш (почва и растение). Показано, что гормонсинтезирующая способность эндофитного и свободноживущего штаммов бацилл существенно отличается как уровнем синтеза, так и спектром синтезированных веществ. Сделан вывод, что такие отличия в синтезе бациллами внеклеточных фитогормонов обусловлены различным типом взаимоотношений исследованных микроорганизмов с растением-хозяином.

**Ключевые слова:** бактерии рода *Bacillus*, свободноживущие сапробионты, эндофиты, фитогормоны, система растение-почва.

I.V. Dragovoz, N.O. Leonova, S.V. Lapa, E.V. Piskova, L.A. Kryuchkova, L.V. Avdeeva

Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

## SYNTHESIS OF EXTRACELLULAR PHYTOHORMONES BY *BACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT ECOLOGICAL SOURCES

### Summary

Synthesis of extracellular phytohormones by bacteria strains of the genus *Bacillus* isolated from different ecological sources (soil and plant) has been researched. It has been shown that phytohormone's synthesis ability of the endophytic and free-living *Bacillus* strains is significantly different as regards the level and spectrum of synthesized compounds. It was concluded that such differences in synthesis of extracellular phytohormones by bacilli are associated with different type of interactions between the studied microorganisms and host plant.

The paper is presented in Ukrainian.

**Key words:** bacteria of *Bacillus* genus, free-living saprobionts, endophytes, phytohormones, plant-soil system.

**The author's address:** Dragovoz I.V., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus Cohn*. в агроэкосистемах. – М.: Наука, 2007. – 148 с.
2. Мелентьев А.И. Аэробные спорообразующие бактерии *Bacillus Cohn*. как агенты биологического контроля болезней растений: Автореф. дис... д-ра биол. наук. – Казань, 2000. – 15 с.
3. Методические рекомендации по определению фитогормонов. – Киев: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. – 78 с.
4. Муромцев Г.С., Агнстикова В.Н. Гормоны растений гиббереллины. – М., «Наука», 1973. – 272 с.
5. Пат. UA №90181, МПК (2009) C12N1/20. Штам *Bacillus subtilis* – антагоніст фітопатогенних бактерій та грибів та біопрепарат на його основі. // Лапа С.В., Авдєєва Л.В., Данкевич Л.А. – Опубл. 12.04.2010, Бюл. №7.
6. Перелік пестицидів і агрохімікатів, дозволених до використання в Україні. – Київ: Юнівєст Медіа, 2010. – 359 с.
7. Савинский С.В., Кофман И.Ш., Кофанов В.И., Стасевская И.И. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиология и биохимия культ. растений. – 1987. – 19, № 2. – С. 210–215.
8. Цавкелова Е.А., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Образование ауксинов бактериями, ассоциированными с корнями орхидей // Микробиология. – 2005. – 74, № 1, С. – 55–62.
9. Ahmed A., Hasnain S. Auxin-producing *Bacillus* sp.: auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum* // Pure Appl. Chem. – 2010. – 82, N 1. – P. 313–319.
10. Araújo F.F., Henning A.A., Hungria M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – 21, N 8-9. – P. 1639–1645.
11. Idris E.E., Bochow H., Ross H., Borriss R. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. VI. Phytohormone like action of culture filtrates prepared from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* FZB24, FZB42, FZB45 and FZB37 // J. Plant Diseases and Protect. – 2004, – 111, N 6. – P. 583–597.
12. Joo G.J., Kim Y.M., Lee I. J. et al. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilis* // Biotechnol. Lett. – 2004, – 26, N 6. – P. 487–491.
13. Krebs B., Höding B., Kübart S.M., Workie A., Junge H., Schmiedeknecht G., Grosch R., Bochow H., Hevesi M. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. I. Activities and characterization of *Bacillus subtilis* strains // J. Plant Diseases and Protect. – 1998, – 105. – P. 181–197.
14. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! / Ed. P.J. Davies. – Springer, 2004. – 750 p.
15. Rosenblueth M., Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2006. – 19. – P. 827–837.
16. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – 31. – P. 425–448.
17. Strobel G., Daisy B., Castillo U., Harper J. Natural products from endophytic microorganisms // J. Natural Products. – 2004. – 67, N 2. – P. 257–268.
18. Sturz A.V., Nowak J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield