

УДК 759.873.088.5:661.185

INFLUENCE OF CULTIVATION CONDITIONS OF SURFACTANT PRODUCERS *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMV B-7241, *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMV AC-5017 AND *NOCARDIA VACCINII* IMV B-7405 ON SYNTHESIS OF PHYTOGORMONES

T. Pirog, D. Gavrylkina

National university of food technologies

N. Leonova, T. Shevchuk

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology

National Academy of Sciences of Ukraine

Key words:

Microbial surfactants

Auxins

Cytokinins

Biosynthesis

Carbon source nature

Article history:

Received 06.09.2017

Received in revised form

20.09.2017

Accepted 05.10.2017

Corresponding author:

Pirog T.

E-mail:

npuht@ukr.net

ABSTRACT

The synthesis of phytohormones under cultivation of surfactant producers *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 on various carbon substrates, including industrial waste, was studied in the article. The level of extracellular auxins and cytokinins synthesis and their qualitative composition depended on the nature of carbon source in cultivation media of the strains under investigation. The highest quantity of auxins (770 µg/l) and widest spectrum of these phytohormones were synthesized by *N. vaccinii* IMV B-7405, when grown on refined oil. The concentration of cytokinins was maximal (348—364 µg/l) when cultivating *N. vaccinii* IMV B-7405 and *A. calcoaceticus* IMV B-7241 on refined oil and purified glycerol, respectively. When all strains were grown on fried sunflower oil, the concentration of synthesized phytohormones was on average 40—70 µg/l. The possibility of developing waste-free technology for obtaining complex microbial preparations with various biological properties of multifunctional applying is being discussed.

DOI: 10.24263/2225-2924-2017-23-5-1-4

ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОДУЦЕНТІВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН *ACINETOBACTER CALCOACETICUS* IMB B-7241, *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* IMB AC-5017 І *NOCARDIA VACCINII* IMB B-7405 НА СИНТЕЗ ФІТОГОРМОНІВ

Т. Пирог, Д. Гаврилкіна

Національний університет харчових технологій

Н. Леонова, Т. Шевчук

Інститут мікробіології і вірусології НАН України ім. Д.К. Заболотного

У статті досліджено синтез фітогормонів за умов росту продуцентів поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rho-*

dococcus erythropolis IMB Ac-5017 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на різних вуглецевих субстратах, у тому числі й промислових відходах. Рівень синтезу позаклітинних ауксинів і цитокінінів та їх якісний склад залежав від природи джерела вуглецю у середовищі культивування досліджуваних штамів. Найвищу кількість ауксинів (770 мкг/л) і найширший спектр цих фітогормонів синтезував штам *N. vaccinii* IMB B-7405 за умов росту на рафінованій олії. Концентрація цитокінінів була максимальною (348—364 мкг/л) у разі культивування *N. vaccinii* IMB B-7405 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241 на рафінованій олії й очищеному гліцерині відповідно. За умов росту всіх штамів на відпрацьованій соняшниковій олії концентрація синтезованих фітогормонів становила в середньому 40—70 мкг/л. Проаналізовано можливість розробки безвідходної технології одержання комплексних мікробних препаратів з різноманітними біологічними властивостями мультифункціонального призначення.

Ключові слова: мікробні поверхнево-активні речовини, ауксини, цитокініни, біосинтез, природа джерела вуглецевого живлення.

Постановка проблеми. Раніше [1] під час дослідження антимікробної активності поверхнево-активних речовин (ПАР) *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 було встановлено, що за наявності супернатантів культуральної рідини, що містить ПАР, спостерігали стимуляцію росту деяких тест-культур мікроорганізмів. Такі результати стали основою для припущення, що досліджувані штами-продуценти одночасно з поверхнево-активними речовинами можуть синтезувати і метаболіти стимулювальної дії, зокрема фітогормони. Пізніше [2] це припущення було підтверджене експериментально. У [2] встановлено, що за умов росту на традиційних субстратах *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 утворюють ауксини і цитокініни.

Зазначимо, що на сьогодні відсутні відомості про синтез фітогормонів продуцентами поверхнево-активних речовин. Водночас у літературі є дані про те, що мікробні ПАР беруть участь у регуляції рослинно-мікробної взаємодії [3], а також здатні стимулювати ріст рослин [4]. Цілком імовірно, що ефект ПАР, описаний у [3; 4], зумовлений синтезом продуцентами ПАР регуляторів росту рослин, проте автори це не досліджували.

Оскільки фітогормони, як і поверхнево-активні речовини, є вторинними метаболітами і синтезуються у вигляді комплексу подібних сполук, їх співвідношення може змінюватися в різних умовах культивування продуцента, що супроводжуватиметься зміненням біологічних властивостей цільового продукту, як це було встановлено нами для ПАР штамів *N. vaccinii* IMB B-7405 і *A. calcoaceticus* IMB B-7241 [5; 6]. Крім того, впродовж процесу біосинтезу може змінюватися і співвідношення утворюваних поверхнево-активних речовин і фітогормонів, що призводить до зміни біологічних властивостей синтезованого комплексу вторинних метаболітів.

Зазначимо, що здатність мікроорганізмів до синтезу комплексу метаболітів з різноманітними біологічними властивостями значно розширює сфери їх практичного застосування. Крім того, залежно від галузі використання

мікробних препаратів (природоохоронні технології, сільське господарство, медицина тощо) їх біологічні властивості можуть виявитися різними.

Мета статті: дослідити синтез фітогормонів у різних умовах культивування продуцентів поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405.

Матеріали і методи. Об'єкти дослідження — штами *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Nocardia vaccinii* К-8, зареєстровані у Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номерами ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 та ІМВ В-7405 відповідно.

R. erythropolis ІМВ Ас-5017 вирощували у рідкому середовищі (г/л): NaNO_3 — 1,3—2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001, рН 6,8—7,0. Як субстрати використовували етанол, гліцерин, н-гексадекан, рафіновану і відпрацьовану після смаження м'яса соняшниковою олією у концентрації 1% (об'ємна частка).

Для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 використовували середовище такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35—1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14, рН 6,8—7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 (об'ємна частка). Джерело вуглецю — очищений гліцерин, етанол, рафінована і відпрацьована після смаження м'яса соняшникова олія у концентрації 1% (об'ємна частка).

Штам *N. vaccinii* ІМВ В-7405 вирощували у середовищі, що містило (г/л): NaNO_3 — 0,5—1,25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,001; дріжджовий автолізат — 0,5% (об'ємна частка). Джерело вуглецю та енергії — очищений гліцерин, рафінована, а також відпрацьована після смаження м'яса і картоплі «фрі» соняшникова олія в концентрації 1% (об'ємна частка).

Як інокулянт використовували культури в експоненційній фазі росту, вирощені на відповідних рідких середовищах, що містили 0,5—1% (об'ємна частка) субстрату. Кількість посівного матеріалу (10^4 — 10^5 кл/мл) становила 5—10% від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл з 100 мл середовища на качалці (320 об./хв) при 28—30° С упродовж 120 год.

Фітогормони визначали у супернатанті, для отримання якого культуральну рідину центрифугували (5000 г) упродовж 25 хв. Залишки соняшникової олії з культуральної рідини видаляли шляхом її трикратної екстракції петролейним ефіром або гексаном (співвідношення 1:1).

Позаклітинні фітогормони ауксини, цитокініни й абсцизову кислоту виділяли методом перерозподілу фітогормонів у двох фазах розчинників, що не змішуються між собою: етилацетаті (для ауксинів і абсцизової кислоти), рН 3,0; н-бутанолі (для цитокінінів), рН 8,0 [7]. Отримані екстракти випарювали під вакуумом при 40—45° С, сухий залишок розчиняли в етанолі і використовували для фізико-хімічного аналізу фітогормонів.

Попереднє очищення і концентрування фітогормонів проводили на пластинках із силікагелем марки “Silufol UV254” (Chemapol, Чехія) у суміші

розчинників, що вводили послідовно: хлороформ, 12,5% водний амміак, етилацетат: оцтова кислота (20:1). Очищені таким чином екстракти цитокінінів, АБК та індольних сполук розділяли на пластинках з окисом алюмінію і кремнію (Merck, Німеччина) [8]. Кількісне визначення фітогормонів встановлювали за допомогою скануючого спектроденситометра Сорбфіл (Росія), як стандарти використовували синтетичні фітогормони фірм Sigma-Aldrich (Німеччина) і Acros Organics (Бельгія). Кількість позаклітинних фітогормонів розраховували у мкг/л супернатанту.

Усі досліди проводили в трьох повторностях, кількість паралельних визначень в експериментах становила від 3 до 5. Статистичну обробку експериментальних даних проводили, як описано раніше [1; 2]. Відмінності середніх показників вважали достовірними при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати і обговорення. Серед мікроорганізмів здатність до синтезу фітогормонів властива насамперед ґрунтовим ризосферним і епіфітним мікроорганізмам, а також бактеріям-симбіонтам, фітопатогенним бактеріям і грибам [9—11]. Деякі з них (гібереліни, цитокініни, фузикоцини) ідентифіковані в мікробних культурах раніше, ніж в рослинах. Зазначимо, що фітогормони синтезують і ті мікроорганізми, життєдіяльність яких не пов'язана безпосередньо з рослинами.

На основі аналізу літературних даних, що стосуються синтезу фітогормонів мікроорганізмами [9—11], можна зробити такі висновки:

- велика кількість мікроорганізмів здатна синтезувати фітогормони, що належать до трьох основних груп гормонів-стимуляторів: ауксини, цитокініни і гібереліни. Причому представники одного роду і навіть виду здатні до синтезу відразу кількох гормонів;

- здатні до синтезу фітогормонів мікроорганізми стимулюють і ріст вищих рослин, що підтверджено великою кількістю досліджень;

- не підтверджується зв'язок фітогормональної активності з патогенністю мікроорганізмів або їх епіфітним (ендофітним) способом існування;

- здатність до синтезу фітогормонів відрізняється великою варіабельністю не тільки в межах одного роду, а й навіть виду;

- для мікроорганізмів характерним є синтез фітогормонів за типом вторинного метаболізму, коли максимум концентрації продукту припадає на стаціонарну фазу росту, а накопичення продукту відбувається лінійно.

У табл. 1—3 наведено дані щодо синтезу фітогормонів за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241, *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на різних вуглецевих субстратах, у тому числі й відпрацьованій (пересмаженій) соняшниковій олії.

Ці дані засвідчують, що всі досліджувані штами синтезували ауксини, цитокініни і абсцизову кислоту, проте рівень синтезу фітогормонів і їх якісний склад залежав як від природи джерела вуглецю у середовищі культивування, так і штамових особливостей.

Найменш «продуктивним» щодо синтезу ауксинів і цитокінінів виявився штам *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 (табл. 2). Разом з тим найвищу кількість фітогормонів ауксинової (91,3 мкг/л) і цитокінінової (37,8 мкг/л) природи цей штам синтезував на відпрацьованій олії. Зазначимо, що практично аналогічну

кількість ауксинів і цитокінінів (43,6—83,2 мкг/л) на цьому субстраті утворював і штам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 (табл. 1). Здатність до синтезу фітогормонів за умов росту *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на відпрацьованій олії залежала від якості субстрату: кількість ауксинів була вищою і становила 84,7 мкг/л на відпрацьованій після смаження картоплі, тоді як концентрація цитокінінів (53,9 мкг/л) — на відпрацьованій після смаження м'яса олії (табл. 3).

Таблиця 1. Синтез позаклітинних фітогормонів за умов росту *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на різних вуглецевих субстратах

Фітогормони	Концентрація (мкг/л) за умов росту на			
	етанолі	гліцерині	рафінованій олії	відпрацьованій олії
Ауксини:				
Індоліл-3-оцтова кислота	24,9	14,3	4,9	—
Індол-3-карбоксилова кислота	24,9	12,1	22,3	45,8
Індол-3-масляна кислота	51,0	95,6	—	32,7
Індол-3-оцтової кислоти гідрозид	3,4	—	5,0	4,7
Індол-3-карбоксальдегід	—	—	7,4	—
<i>Загальна кількість ауксинів</i>	104,2	122,0	39,6	83,2
Цитокініни:				
Кінетин	—	214,0	25,2	12,0
Зеатин	3,5	42,2	28,3	17,5
Зеатин-рибозид	—	96,3	16,8	9,3
Ізопентеніл-аденін	—	—	—	—
Ізопентеніл-аденозин	—	11,4	4,8	4,8
<i>Загальна кількість цитокінінів</i>	3,5	363,9	75,1	43,6
Абсцизова кислота	1,3	0,9	—	2,3

Примітки: «—» — не виявлено. Вирощування штаму здійснювали на відпрацьованій після смаження м'яса олії.

Таблиця 2. Вплив природи джерела вуглецю у середовищі культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на синтез позаклітинних фітогормонів

Фітогормони	Концентрація (мкг/л) за умов росту на			
	етанолі	н-гекса-декані	рафінованій олії	відпрацьованій олії
1	2	3	4	5
Ауксини:				
Індоліл-3-оцтова кислота	81,1	21,4	4,5	42,5
Індол-3-карбоксилова кислота	—	—	10,3	—
Індол-3-масляна кислота	—	—	—	44,7
Індол-3-оцтової кислоти гідрозид	3,2	—	—	4,1
Індол-3-карбоксальдегід	—	23,4	4,6	—
<i>Загальна кількість ауксинів</i>	84,3	44,8	19,4	91,3
Цитокініни:				
Кінетин	—	—	—	—
Зеатин	—	1,9	5,3	7,2
Зеатин-рибозид	—	19,5	5,9	15,5

1	2	3	4	5
Ізопентеніл-аденін	—	—	—	—
Ізопентеніл-аденозин	—	—	5,9	15,1
Загальна кількість цитокінінів	—	21,4	17,1	37,8
Абсцизова кислота	3,6	3,2	1,5	8,8

Примітки: «—» — не виявлено. Вирощування штаму здійснювали на відпрацьованій після смаження м'яса олії.

Таблиця 3. Утворення позаклітинних фітогормонів *N. vaccinii* ІМВ В-7405 залежно від природи ростового субстрату

Фітогормони	Концентрація (мкг/л) за умов росту на			
	гліцерині	рафінованій олії	Відпрацьованій після смаження картоплі олії	Відпрацьованій після смаження м'яса олії
Ауксини:				
Індоліл-3-оцтова кислота	—	290,0	30,6	—
Індол-3-карбоксилова кислота	—	297,3	31,1	—
Індол-3-масляна кислота	139,9	—	—	—
Індол-3-оцтової кислоти гідрозид	—	20,7	—	—
Індол-3-карбоксальдегід	—	162,4	23,0	23,3
Загальна кількість ауксинів	139,9	770,4	84,7	23,3
Цитокініни:				
Кінетин	—	—	2,5	3,2
Зеатин	—	8,2	6,4	—
Зеатин-рибозид	—	46,6	5,6	11,8
Ізопентеніл-аденін	—	—	0,4	—
Ізопентеніл-аденозин	—	293,2	1,2	38,9
Загальна кількість цитокінінів	—	348,0	15,9	53,9
Абсцизова кислота	3,1	12,6	—	—

Примітки: «—» — не виявлено.

Найвищу кількість ауксинів (770 мкг/л) і найширший спектр цих фітогормонів синтезував штаму *N. vaccinii* ІМВ В-7405 за умов росту на рафінованій олії. Концентрація цитокінінів була максимальною (348—364 мкг/л) у разі культивування *N. vaccinii* ІМВ В-7405 і *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на рафінованій олії й очищеному гліцерині відповідно (табл. 4). Загалом, синтез ауксинів спостерігався під час вирощування всіх досліджуваних штамів на всіх субстратах, тоді як у процесі культивування *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017 на етанолі і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 на гліцерині утворення цитокінінів не відбувалося (табл. 4).

Рівень синтезу абсцизової кислоти (фітогормон інгібіторного типу) за умов росту досліджуваних штамів практично на всіх субстратах був невисоким і перебував у межах 1—4 мкг/мл. Дещо вищою (9—13 мкг/л) була концентрація цього фітогормону у процесі культивування штаму ІМВ Ас-5017 і ІМВ В-7405 на відпрацьованій після смаження м'яса і рафінованій олії відповідно (табл. 4).

Таблиця 4. Вплив умов культивування *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 на синтез фітогормонів

Субстрат	Штам	Концентрація (мкг/л)		
		ауксини	цитокініни	абсцизова кислота
Етанол	IMB B-7241	104,2	3,5	1,3
	IMB Ac-5017	84,3	—	3,6
Гліцерин	IMB B-7241	122,0	363,9	0,9
	IMB B-7405	139,9	—	3,1
н-Гексадекан	IMB Ac-5017	44,8	21,4	3,2
Рафінована олія	IMB B-7241	39,6	75,1	—
	IMB B-7405	770,4	348,0	12,6
	IMB Ac-5017	19,4	17,1	1,5
Відпрацьована після смаження м'яса олія	IMB B-7241	83,2	43,6	2,3
	IMB B-7405	23,3	53,9	—
	IMB Ac-5017	91,3	37,8	8,8
Відпрацьована після смаження картоплі олія	IMB B-7405	84,7	15,9	—

Примітки: «—» — не виявлено.

Зазначимо, що в літературі переважно наводяться дані щодо синтезу ауксинів і цитокінінів мікроорганізмами, асоційованими з рослинами [9; 10; 12]. Звичайно ж, рівень синтезу фітогормонів у таких бактерій і грибів є вищим (від 600 до 40000 мкг/л), ніж у досліджуваних нами штамів. Проте враховуючи, що фітогормони проявляють стимулювальну дію у надзвичайно низьких концентраціях (10^{-12} — 10^{-5} моль/л), показники їх синтезу продуцентами поверхнево-активних речовин є прийнятними для практичного використання у рослинництві.

Висновок

Здатність *A. calcoaceticus* IMB B-7241, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 і *N. vaccinii* IMB B-7405 до одночасного синтезу поверхнево-активних речовин і фітогормонів за умов росту на різних субстратах, у тому числі й на дешевих промислових відходах, дає змогу розробити економічно вигідну безвідходну технологію одержання комплексних мікробних препаратів з різноманітними біологічними властивостями (антимікробними, антиадгезивними, рістстимулювальними), а також перспективними для використання у природоохоронних технологіях для очищення довкілля від ксенобіотиків.

Література

1. Pirog T.P., Konon A.D., Sofilkanich A.P., Iutinskaia G.A. Effect of surface-active substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on phytopathogenic bacteria. *Appl. Biochem. Microbiol.* 2013; 49(4): 360—367. doi:10.1134/S000368381304011X.
2. Pirog T.P., Leonova N.O., Shevchuk T.A., Savenko I.V., Iutinskaya G.A. Synthesis of phytohormones bacteria of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Nocardia vaccinii* IMV B-7405 — producers of surface-active substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series.* 2016; 1: 90—95.

3. Sachdev D.P., Cameotra S.S. Biosurfactants in agriculture. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(3): 1005—1016. doi: 10.1007/s00253-012-4641-8.
4. Карпенко О.В., Корецька Н.І., Щеглова Н.С., Карпенко І.В., Баранов В.І. Стимулювання росту злакових рослин поверхнево-активними рамноліпідами. Biotechnologia acta. 2013; 6(6): 94—99.
5. Pirog T.P., Panasyuk E.V., Nikityuk L.V., Iutinska G.O. Influence of cultivation conditions on antimicrobial properties of Nocardia vacciniі IMV B-7405 surfactants. Biotechnologia acta. 2016; 9(1): 38—47. doi: 10.15407/biotech9.01.038.
6. Pirog T.P., Sidor I.V., Lutsai D.A. Calcium and magnesium cations influence on antimicrobial and antiadhesive activity of Acinetobacter calcoaceticus IMV B-7241 surfactants. Biotechnologia Acta. 2016; 9(6): 50—57. doi: 10.15407/biotech9.06.050.
7. Методические рекомендации по определению фитогормонов. Киев: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. — 78 с.
8. Савинский С.В., Кофман И.Ш., Кофанов В.И., Стасевская И.Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии. Физиол. и биохим. культ. раст. 1987; 19(2): 210—215.
9. Enders T.A., Strader L.C. Auxin activity: past, present, and future. Amer. J. Botany. 2015; 102(2): 180—196. doi:10.3732/ajb.1400285.
10. Стрелецкий Р.А. Эколого-таксономические аспекты распространения фитогормональной активности среди дрожжей. Дисс. канд. биол. наук. — Москва, 2017. — 132 с.
11. Shi T.Q., Peng H., Zeng S.Y., Ji R.Y., Shi K., Huang H., Ji X.J. Microbial production of plant hormones: Opportunities and challenges. Bioengineered. 2017; 8(2): 124—128. doi: 10.1080/21655979.2016.1212138.
12. Дімова С.Б. Фітогормони — продукти життєдіяльності мікроорганізмів. Методи визначення Сільськогосподарська мікробіологія. — 2013. — № 18. — С. 159—185.