

ОБРАЗОВАНИЕ ГИББЕРЕЛЛИНА И ГИББЕРЕЛЛИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ

Аннотация. У 50 штаммов углеводородокисляющих бактерий рода *Pseudomonas* изучена способность к синтезу гиббереллина и гиббереллиноподобных соединений. Установлено, что способность к образованию гиббереллинов широко распространена среди этих микроорганизмов. Показано, что общее количество гибберелловой кислоты и гиббереллиноподобных веществ, продуцируемое некоторыми штаммами, может достигать 200-250 мкг/мл среды. Добавление нефти в питательную среду оказало благоприятное воздействие на синтез гиббереллинов.

Ключевые слова: углеводородокисляющие бактерии, гиббереллин, гиббереллин-подобные вещества

Взаимодействие растений с симбиотическими и полезными ризосферными микроорганизмами играют важную роль в развитии растений, обеспечивая их соответствующим питанием и регуляторами роста, защищая от патогенных микроорганизмов, адаптируя к стрессам [1; 2].

Среди ризосферных микроорганизмов чаще других позитивным действием на растения отличаются бактерии из родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azomonas*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*. Им присуща высокая динамичность роста, способность поселяться в ризосфере и ризоплане культивируемых растений, вытесняя тем самым микроорганизмы, негативно влияющие на рост растений. Все указанные бактерии в большей или меньшей степени способны синтезировать различные фитогормоны. Большинство авторов отмечает, что бактерии родов *Pseudomonas* и *Bacillus* являются наиболее перспективными для применения в качестве биологических удобрений [3, 4]. Эти бактерии продуцируют широкий спектр вторичных метаболитов, включая регуляторы роста и антибиотики, а также хорошо приспосабливаются к условиям ризосферы.

Цель нашей работы состояла в оценке способности чистых культур углеводородокисляющих штаммов бактерий рода *Pseudomonas* и *Bacillus* проявлять гиббереллин и/или гиббереллин-подобную активность.

Объектами исследования служили 50 штаммов углеводородокисляющих бактерий, полученных из Коллекции микроорганизмов Института микробиологии НАН Азербайджана (AZCC). Бактерии выращивали в жидкой минеральной среде Раймонда (субстрат глюкоза – 2,0% или гексадекан – 1,0%) либо мясопептонном бульоне в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на круговой качалке (180–200 об/мин) при температуре 28°C в течение 24–120 ч. Отбирая пробы через определенные промежутки времени, следили за динамикой роста культур по изменению величины оптической плотности.

Для определения способности продуцировать гиббереллин и гиббереллин-подобные вещества (ГПВ) в зависимости от кислотно-щелочных условий среды бактерии выращивались на среде МПБ с начальным значением pH среды 5,0; 6,0; 7,0; 8,0. Влияние различных источников азота и углерода устанавливали на среде Раймонда. Источниками азотного питания были следующие: азотнокислый калий, аммоний фосфорнокислый двузамещенный, пептон и дрожжевой автолизат. Эти вещества вносились в количестве 0,02% в пересчете на азот. Источники углерода – глюкоза 2,0% или гексадекан 1,0%. Для изучения влияния углеводов на синтез гиббереллина и ГПВ в среду Раймонда вноси-

ли 0,1%, 0,5%, 1,0% и 5,0% и 10,0% (об) Нефтчалинской нефти (Азербайджан). Биотесты на удлинение первого междоузлия проростков огурцов проводили по методу Муромцева [5].

Для выявления гиббереллина использовался метод круговой и нисходящей хроматографии. Хроматограммы проявляли 5%-ным раствором H_2SO_4 . Для определения количества гиббереллина использовалась хроматограмма различных концентраций гибберелловой кислоты (А3).

В предварительных исследованиях нами была оценена ростостимулирующая активность 50 штаммов углеводородокисляющих бактерий рода *Pseudomonas*. 23 штамма оказали стимулирующее влияние (46%) на удлинение первого междоузлия проростков огурцов сорта Шахин относительно контроля. На основании этих данных предположено, что ростостимуляция связана с действием синтезируемых данными штаммами фитогормонов; отобранные штаммы были проверены на способность синтезировать гиббереллины и ГПВ. Опыты по определению гиббереллинов и ГПВ при помощи ТСХ показали, что большинство экстрактов супернатантов, полученных из культуральных жидкостей исследуемых в опыте микроорганизмов, образуют хорошо выраженные пятна с ярким свечением, примерно равным концентрации 115-125 мкг/мл с $R_f = 0,4$. Это соответствовало положению пятна метчика гибберелловой кислоты. Некоторые бактерии рода *Pseudomonas* отличались исключительно высокой способностью синтеза изученных гормонов (150-200 мкг/мл). В то же время у восьми культур синтез гибберелловой кислоты не наблюдалось. При этом, как правило, большого размера пятна и с более ярким свечением наблюдались при хроматографировании экстрактов из супернатантов культуральных жидкостей микроорганизмов, выращенных в мясопептонном бульоне. Применение нисходящей хроматографии позволило выделить из культуральных жидкостей всех изученных нами микроорганизмов 12 различных компонентов, дающих на хроматограммах пятна, проявляемые обычными для ГПВ реактивами (положение их на хроматограммах характеризовались следующими значениями: 0,05 (1); 0,1 (2); 0,3 (3); 0,4 (4); 0,5 (5); 0,7 (6); 0,75 (7); 0,81 (8); 0,86 (9); 0,90 (10); 0,94 (11); 0,96 (12). Наиболее часто и в сравнительно больших количествах встречались ГПВ, образующие пятна с R_f равными 0,1; 0,4; 0,5; 0,7; 0,9.

Испытание в качестве биотеста культуральных жидкостей позволило отобрать три активных штамма – *P. fluorescens* AZ2182, *P. putida* AZ2268 и *P. putida* AZ2269. В экстрактах супернатантов культуральных жидкостей этих микроорганизмов обнаруживалась гибберелловая кислота. Количество гибберелловой кислоты, как правило, было значительно выше, чем у других штаммов - продуцентов гиббереллина. По полученным данным, у этих штаммов оно колеблется от 150 мкг/мл до 200 мкг/мл среды. Таким образом, рассматриваемые нами углеводородокисляющие бактерии могут считаться активными продуцентами гиббереллина. Однако при этом следует учесть, что для синтеза гиббереллина и ГПВ большое значение имеет состав среды. В наших опытах, как правило, гиббереллин и ГПВ образовывались на азотсодержащих средах в большем количестве, чем на безазотных.

Влияние различных источников азота на синтез гиббереллина штаммами *P. fluorescens* AZCC1182, *P. putida* AZCC1168 и *P. putida* AZCC1169 устанавливалось на синтетической среде Раймонда. Следует отметить, что на этой среде образуется гораздо меньше компонентов гиббереллиновой природы по сравнению с синтезом их на органической среде – МПБ. Данные о синтезе гиббереллина и ГПВ бактериями на средах с различными источниками азота приведены в табл.1.

Таблица 1

Влияние различных источников азота на продукцию гиббереллина (АЗ) и ГПВ (мкг/мл) углеводородокисляющими бактериями рода *Pseudomonas* (Рост в среде Раймонда)

Штаммы	пептон		ДЭ*		KNO ₃		NH ₄ NO ₃	
	АЗ	ГП	АЗ	ГП	АЗ	ГП	АЗ	ГП
<i>P. fluorescens</i> AZCC1182	135	125	135	122	128	121	126	124
<i>P. putida</i> AZCC1168	145	115	140	111	137	14	139	18
<i>P. putida</i> AZCC1169	135	110	133	110	129	17	135	110

* - дрожжевой экстракт

Из приведенных в таблице 1 данных видно, что минеральные источники азота задерживают, а органические – пептон и дрожжевой автолизат увеличивают образование гиббереллинов. Наиболее благоприятным источником азота для всех культур в условиях опыта оказался пептон. Гиббереллин АЗ обнаружен в культуральных жидкостях всех штаммов. Достаточно четких различий в продукции гиббереллина АЗ бактериями при использовании различных источников азота не установлено. Можно только отметить, что штаммы *P. fluorescens* AZCC1182, *P. putida* AZCC1168 и *P. putida* AZCC1169 синтезируют его больше на среде с пептоном. Последний в одинаковом количестве образует гиббереллин АЗ на среде с пептоном и нитратом аммония.

Следующим этапом исследований было изучение влияния температуры, pH среды и условий аэрации на рост и синтез гиббереллинов штаммами *P. fluorescens* AZCC1182, *P. putida* AZCC1168 и *P. putida* AZCC1169 в условиях глубинного культивирования. Динамика роста и синтеза гиббереллинов при глубинном культивировании в мясопептонном бульоне исследована при температурах 20°C, 30°C и 37°C. Установлено, что оптимальной температурой для штаммов *P. putida* AZCC1168 и *P. putida* AZCC1169 является 37°C, а для штамма *P. fluorescens* AZCC1182 – 30°C.

Таблица 2

Влияние различных температуры инкубирования на продукцию гиббереллина (АЗ) и ГПВ (мкг/мл) углеводородокисляющими бактериями рода *Pseudomonas* (рост в среде МПБ)

Штаммы	20°C		30°C		37°C	
	АЗ	ГП	АЗ	ГП	АЗ	ГП
<i>P. fluorescens</i> AZCC1182	115	15	136	122	128	121
<i>P. putida</i> AZCC1168	122	Сл.	140	12	147	14
<i>P. putida</i> AZCC1169	110	14	125	19	129	17

Данные о влиянии кислотно-щелочных условий среды на образование углеводородокисляющими бактериями гиббереллина представлены в табл.3.

Влияние pH среды на продукцию компонентов гиббереллина и ГПВ (Rf)
углеводородоокисляющими бактериями рода *Pseudomonas*
(рост в среде МПБ)

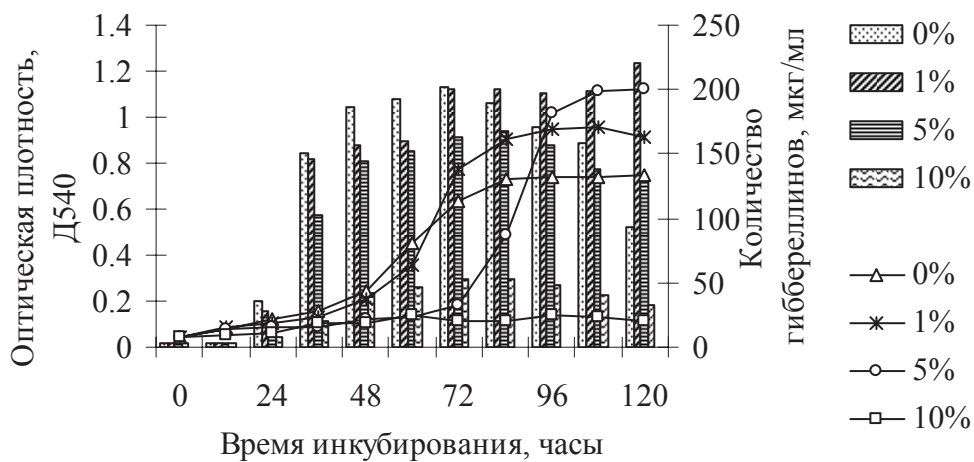
Штаммы	pH среды			
	5,0	6,0	7,0	8,0
<i>P. fluorescens</i> AZCC1182	1, 3, 4, 5, 6, 11	1, 4, 5, 6, 3,12	2, 4, 6, 3, 12	2, 5, 10
<i>P. putida</i> AZCC1168	1, 4, 5, 6, 9, 11	1, 4, 5, 6, 9,12	1, 4, 6, 7, 12	1, 6, 7, 12
<i>P. putida</i> AZCC1169	1, 4, 5, 6, 9, 11	1, 4, 5, 6, 8, 9	4, 6, 8, 9, 12	6, 7, 8, 12

Исследуемые бактерии продуцировали различные количества гиббереллина и компонентов гиббереллиновой природы в зависимости от начального pH среды. При нейтральном значении бактерии синтезируют пять компонентов гиббереллиновой природы, в число которых входят биологические активные компоненты 4 (гиббереллин А3) и 6. Гиббереллин А3 накапливается в небольших количествах всеми штаммами. Активный компонент 6 обнаружен в значительных количествах в культуральной жидкости штамма *P. fluorescens* AZCC1182. При щелочном значении pH среды исследуемые бактерии синтезировали лишь три-четыре компонента. Смещение pH в щелочную сторону отрицательно сказывалось на образовании гиббереллина А3. Исследуемые штаммы не образовали ее при pH равном 8. В противоположность этому низкие значения pH среды благоприятно действовали на образование веществ гиббереллиновой природы. При кислой реакции обнаружено наибольшее количество всех синтезируемых компонентов, в том числе биологически активных. В этих условиях гиббереллин А3 обнаружен в культуральных жидкостях всех исследуемых штаммов на третьи сутки в больших количествах по сравнению с продукцией при нейтральной реакции среды. При кислом pH штамм *P. putida* AZCC1168 продуцировал наибольшее количество активного компонента 6. Только при pH близком к 5 в культуральных жидкостях бактерий в значительных количествах образовывался новый активный компонент 11. Способность к образованию гиббереллина А3 в кислых условиях среды у бактерий была одинакова. Таким образом, кислотно-щелочные условия среды влияют на качественный состав и количественное образование гиббереллина А3 и ГПВ. Смещение pH в кислую сторону обеспечивает максимальное образование гиббереллина А3 и биологически активных компонентов гиббереллиновой природы.

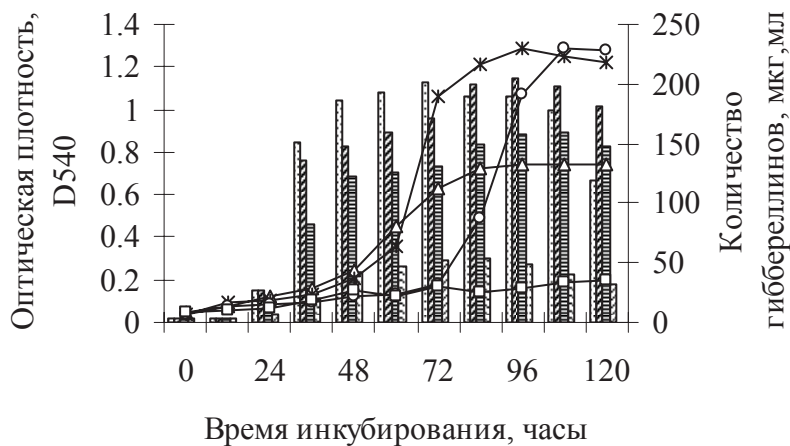
Проведены исследования динамики роста штаммов *P. fluorescens* AZCC1182 и *P. putida* AZCC1168 в среде Раймонда с добавлением нефти при различных условиях насыщения кислородом воздуха: без аэрации и с принудительной аэрацией 0,5 л/мин. В условиях принудительной аэрации со скоростью 0,5 л/мин оба штамма росли лучше, чем в условиях отсутствия аэрации.

С целью установить влияние нефти на исследуемые штаммы нами были проведены эксперименты (рис.1) с введением в питательную среду Раймонда 0,1%, 0,5%, 1,0% и 5,0% и 10,0% (об.) нефти. Оба штамма оказались способны расти в питательной среде с нефтью при её содержании в пределах 0,1-10,0%. Добавление нефти в питательную среду оказало благоприятное воздействие на синтез гиббереллинов.

P. putida AZ2269



P. putida AZ2268



P. fluorescens AZ2182

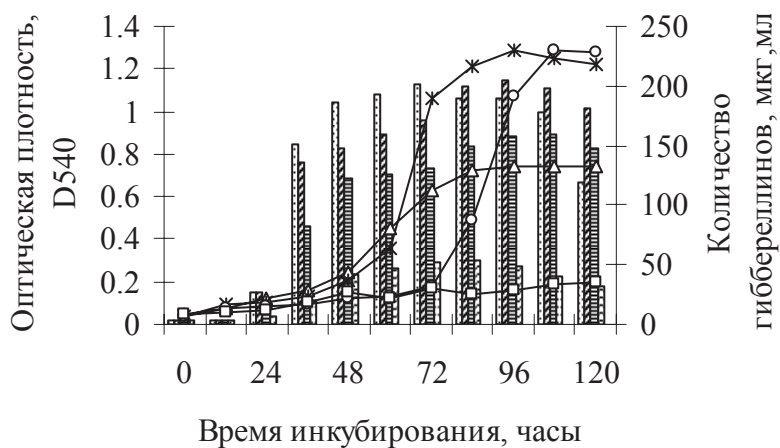


Рис 1. Влияние различных концентраций нефти на рост и продукцию гиббереллинов бактериями рода *Pseudomonas*

Таким образом, исследуемые нами углеводородокисляющие бактерии рода *Pseudomonas* и разработанные на их основе биопрепараты являются потенциальными объектами как агробиотехнологии - для стимуляции роста и повышения продуктивности растений, так и экотехнологии, где они могут использоваться совместно с растениями в ходе фиторемедиации нефтезагрязненных почв.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lindow S.E. and M. T. Brandl. Microbiology of the Phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol. 2003, Vol. 69, № 4. P. 1875–1883.
2. Gage D. J. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. Microbiol. Molecul. Biol. Rev. 2004, Vol. 68, № 2. - P. 280–300.
3. Кочетков В.В., Дубейковский А.Н., Боронин А.М. Ризосферные псевдомонады для защиты растений от фитопатогенов // Новые направления в биотехнологии. - Пушкино, 1990. - С. 36-37.
4. Гораль В.М., Лаппа Н.В., Гораль С.В., Гарагуля А.Д., Киприанова Е.А., Омелянец Т.Г., Смирнов В.В. Инсектофунгицидный препарат гаупсин на основе штаммов *Pseudomonas aureofaciens* // Прикл. биох. и микробиол. - 1999. 35, № 5. С. 596-598.
5. Муромцев Г.С., Агнестикова В.Н. Гормоны растений гиббереллины. - М.: Наука, 1973. - 269 с.

К. Isayeva

PRODUCTION OF GIBBERELLIN AND GIBBERELIN LIKELY SUBSTANCES BY HYDROCARBON DEGRADING BACTERIA

Annotation. The ability to synthesize gibberellin and gibberellin likely substances by 50 hydrocarbon degrading *Pseudomonas* strains was investigated. It was established, that such ability is widely spread among these microorganisms. The maximum amount of gibberellin acids and gibberellin likely substances produced by bacteria reached 200-250 mkg / ml. Addition of petroleum in a nutrient medium rendered favorable influence on gibberellin synthesis.

Key words: hydrocarbon degrading bacteria, gibberellin, gibberellin likely substances