

ЯМБОРКО Н.А. ✉, ЛЕОНОВА Н.О.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
Украина, 03143, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 154, e-mail: kremenina@ukr.net

✉ kremenina@ukr.net, (097) 961-56-21

СИНТЕЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ФИТОГОРМОНОВ ПОЧВЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ-ДЕСТРУКТОРАМИ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ

Исследовали качественный и количественный состав внеклеточных фитогормонов, синтезируемых почвенными микроорганизмами – деструкторами хлорорганических соединений гексахлорциклогексана и гексахлорбензола: *Pseudomonas putida* ИМВ В-7289, *Bacillus megaterium* ИМВ В-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* ИМВ В-7288 и *Pseudomonas putida* 9.

P. putida 9 является активным продуцентом внеклеточных легкодоступных для растений ауксинов и цитокининов: максимальное содержание зеатина и зеатинрибозида превышало синтез этого фитогормона другими исследуемыми штаммами в 8,3–15,4 раза. Штамм *P. putida* 9 представляет интерес как перспективный компонент комплексного микробного препарата для ремедиации загрязненных хлорорганическими пестицидами территорий. Штамм может быть использован в комплексе с эффективными деструкторами *B. megaterium* ИМВ В-7287 и *P. putida* ИМВ В-7289, которые проявили более низкую способность синтезировать исследуемые фитогормоны. Спектр синтезируемых микроорганизмами внеклеточных фитогормонов – это штаммовая характеристика.

В связи с возрастающим загрязнением окружающей среды химически синтезированными соединениями повышается интерес к экологически безопасным способам их биодетоксикации, направленным на улучшение экологического состояния почвы. Основная цель этих мероприятий – создание благоприятных условий для роста растений одновременно с детоксикацией загрязненных территорий. Одним из положительных свойств почвенных микроорганизмов является их способность синтезировать фитогормоны, стимулирующие рост и развитие растений [1]. Бактерии, которые относятся к группе PGP-бактерий (plant-growth-promoting bacteria), представители родов *Bacillus* и *Pseudomonas* известны как продуценты фитогормонов [2, 3]. Отмечено стабилизирующее действие PGP-бактерий в условиях ла-

бораторных вегетационных опытов на структуру и функционирование аборигенного микробного сообщества лесной почвы в ризосфере сосны посевной [4]. Ранее нами были селекционированы эффективные штаммы-деструкторы хлорорганических соединений. Поэтому представляло интерес изучить возможность синтеза внеклеточных фитогормонов штаммами *Pseudomonas putida* ИМВ В-7289, *Bacillus megaterium* ИМВ В-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* ИМВ В-7288 [5], интродукция которых перспективна для создания более благоприятных условий для роста растений, а также восстановления и стабилизации природных микробных сообществ почв на загрязненных территориях.

Материалы и методы

Исследовали штаммы микроорганизмов – эффективных деструкторов хлорорганических соединений, селекционированные в отделе общей и почвенной микробиологии Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины: *Pseudomonas putida* ИМВ В-7289, *Bacillus megaterium* ИМВ В-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* ИМВ В-7288 и *Pseudomonas putida* 9. Культивирование микроорганизмов проводили в периодических условиях по разработанной и описанной ранее методике [5]. Культуры указанных штаммов исследовали в экспоненциальной фазе роста. Для отделения биомассы культуральную жидкость бактерий центрифугировали в течение 20 мин при 9000 об/мин и температуре +4°C. Клетки бактерий отмывали от остатков экзополимеров физиологическим раствором трижды. Надосадочные жидкости использовали для экстракции фитогормональных соединений, а осадок клеток суспендировали в дистиллированной воде, затем высушивали при +103–105°C в сушильном шкафу до постоянной массы. Количество абсолютно сухой биомассы (АСБ) микроорганизмов определяли весовым методом. Внеклеточные фитогор-

моны ауксины, цитокинины и абсцизовую кислоту (АБК) экстрагировали методом перераспределения фитогормонов в двух фазах растворителей, не смешивающихся между собой (растворитель и надосадочная жидкость): в этилацетате (для ауксинов и АБК), рН 3,0 и н-бутаноле (для цитокининов), рН 8,0 [6]. Полученные экстракты упаривали под вакуумом при +40–45°C. Сухой остаток растворяли в этаноле и использовали для физико-химического анализа фитогормонов. Предварительную очистку и концентрирование фитогормонов проводили на ТСХ-пластинках с силикагелем марки «Silufol UV₂₅₄» («Chemapol», Чехия) в смеси растворителей, применяемых последовательно: хлороформ, 12,5 % водный аммиак, этилацетат:уксусная кислота (20:1). Очищенные таким образом элюаты цитокининов, индольных соединений и АБК вновь хроматографировали на пластинках с оксидом алюминия и кремния «Merck», F₂₅₄ (Германия). В первом случае использовали смесь н-бутанол:аммиак: вода (86:5:9), во втором – хлороформ: этилацетат: уксусная кислота (100:100:1) [7]. Количественное детектирование фитогормонов осуществляли с помощью сканирующего спектроденситометра «Сорбфил» (РФ). Количество внеклеточных фитогормонов рассчитывали в мкг на 1 г АСБ продуцента.

Результаты и обсуждение

Известно, что почвенные ризосферные микроорганизмы, относящиеся к PGP-бактериям, способствуют росту растений по принципам мутуалистических взаимоотношений за счет синтеза комплекса биологически активных веществ, в том числе и фитогормонов. Синтез фитогормонов выгоден микроорганизмам, поскольку при этом возрастает выделение растениями корневых экссудатов, обеспечивающих питание и самих микроорганизмов [8]. Для PGP-бактерий характерна способность оптимизировать гормональную систему растений, стимулируя также их рост, в отличие от патогенных микроорганизмов, синтезирующих избыточное количество фитогормонов и нарушающих рост и развитие растений, приводя к возникновению целого ряда заболеваний [9]. Общеизвестна также способность ауксинов стимулировать прорастание семян, ветвление и рост корней в длину, повышать устойчивость к стрессовым факторам [10].

Качественный и количественный состав (профиль) исследуемых внеклеточных ауксинов (индол-3-уксусной кислоты (ИУК), ин-

дол-3-карбоксальдегида, индол-3-гидразида уксусной кислоты) и АБК был индивидуальным у каждого штамма микроорганизмов. Все штаммы синтезировали преимущественно ИУК, некоторые – АБК, в то же время индол-3-карбоксальдегид и индол-3-гидразид уксусной кислоты были выявлены в следовых количествах.

Так, исследуемый нами штамм-деструктор *P. putida* 9 продуцировал в достаточно больших количествах ауксины – ИУК (9,9 мкг/г АСБ) и индол-3-карбоксальдегид (3,5 мкг/г АСБ). Согласно полученным нами данным, только в культуральной жидкости *P. putida* 9 была выявлена АБК в количестве 0,88 мкг/г АСБ, что значительно ниже количества синтезированных ауксинов. Подобная закономерность, по данным Драговоца И.В. с соавторами [11], характерна и для целого ряда штаммов ризобий – синтез внеклеточных фитогормонов стимулирующего действия (цитокининов и ауксинов) был значительно выше (в 20–430 раз), чем синтез АБК.

Штамм *S. maltophilia* ИМВ В-7288 единственный продуцировал в среду культивирования индол-3-гидразид уксусной кислоты (2,6 мкг/г АСБ), а *B. megaterium* ИМВ В-7287 синтезировал ИУК в количестве 5,9 мкг/г АСБ (рис.). Это достаточно высокий уровень синтеза ауксинов, который можно сравнить с показателями синтеза, например, ИУК, для некоторых биотехнологических штаммов симбиотических клубеньковых бактерий сои *Bradyrhizobium japonicum* УКМ В-6018 – на уровне 8,9 мкг/г АСБ [11]. Вероятно, исследуемые нами почвенные микроорганизмы-деструкторы не являются ассоциативными и удалены на некоторое расстояние от корневых систем растений, поэтому для стимулирования роста и формирования взаимодействия с растительностью необходим достаточный потенциал синтеза экзометаболитов фитогормональной природы [12].

Известно, что бактериальные ауксины стимулируют процесс формирования корневых волосков так же эффективно, как и ауксины растительного происхождения [13]. Показано позитивное влияние ауксинов, синтезируемых *B. megaterium*, на формирование корневых волосков и корневой системы в целом у *Arabidopsis thaliana* [2]. Интродукция ауксинсинтезирующих бактерий в ризосферу *Triticum aestivum* L. повышала содержание этих гормонов в растениях [14].

Исследование цитокининов в составе культуральных жидкостей культур-деструкторов хло-

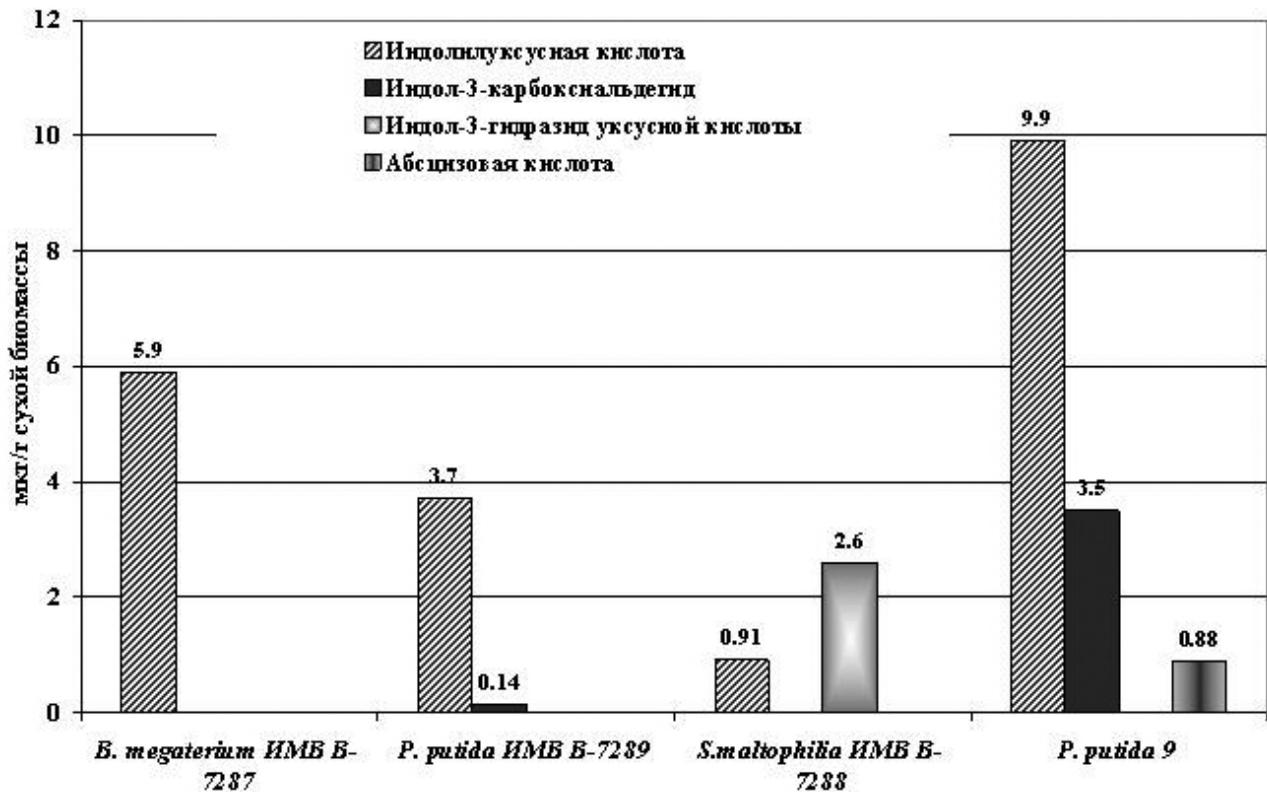


Рис. Количество внеклеточных ауксинов и абсцизовой кислоты у микроорганизмов-деструкторов хлорорганических соединений

органических соединений показали, что в большей или меньшей степени исследуемые штаммы микроорганизмов синтезировали зеатин и/или зеатинрибозид, но их максимальное содержание выявляли в культуральной жидкости *P. putida* 9 – 133,9 и 189,5 мкг/г АСБ соответственно, что превышало синтез этого фитогормона другими исследуемыми штаммами в 8,3–15,4 раза (табл.).

Способность продуцировать цитокинины обнаружена у меньшего количества видов и штаммов PGP-бактерий по сравнению с продуцентами ауксинов [15]. Полученные нами результаты подтверждают эти сведения и объясняют факт сравнительно низкого содержания зеатина и следовых количеств изопентенил-аденозина и изопентенил-аденина в составе культуральных жидкостей *S. maltophilia* ИМБ В-7288 и *B. megaterium* ИМБ В-7287. В культуральной жидкости *P. putida* ИМБ В-7289 присутствовали все исследуемые цитокинины приблизительно в равных количествах (табл.).

Известно, что механизм рибозилирования используется как один из методов инактивации цитокининов у растений, при этом их активность снижается или полностью исчезает. Устранение

рибозилирования зеатина обозначает конец этапа транспортирования и начало активной его функции [16]. По данным Архиповой Т.Н. с соавторами [17], присутствие в ризосфере цитокининов, синтезированных PGP-бактериями *Bacillus subtilis*, достоверно активировало накопление растениями биомассы побегов и корней у растений латука.

Зеатин и зеатинрибозид у микроорганизмов синтезируется внутри клетки и подвергается рибозилированию, превращаясь в транспортную форму – зеатинрибозид, который может использоваться растением. Это соответствует данным о том, что именно в виде транспортной рибозилированной формы зеатин легче транспортируется за пределы клеток [1]. Это положение полностью подтверждается полученными данными у штамма *P. putida* ИМБ В-7289: в супернатанте культуральной жидкости были выявлены достаточные количества зеатина и зеатинрибозида – 8,71 и 9,12 мкг/г АСБ.

Исследовали также наличие и других цитокининов в культуральных жидкостях исследуемых микроорганизмов, а именно – изопентенил-аденозина и изопентенил-аденина (табл.).

Синтез внеклеточных цитокининов микроорганизмами-деструкторами, мкг/г АСБ.

Штамм микроорганизмов	Изопентениладе- нозин	Изопентениладенин	Зеатин	Зеаинрибозид
<i>B. megaterium</i> ИМВ В-7287	0,105	0,075	0,01	9,24
<i>P. putida</i> ИМВ В-7289	6,08	7,70	8,71	9,12
<i>P. putida</i> 9	8,42	0,0001	133,9	189,50
<i>S.maltophilia</i> ИМВВ-7288	0,0001	0,0001	0,83	22,80

Так, кроме значительных количеств зеатина и зеаинрибозид в супернатанте культуральной жидкости *P. putida* 9 было выявлено наибольшее количество изопентенил-аденозина – 8,42 мкг/г АСБ, а штамм *P. putida* ИМВ В-7289 продуцировал максимальное количество внеклеточного изопентенил-аденина – 7,7 мкг/г АСБ. У штаммов *B. megaterium* ИМВ В-7287 и *S. maltophilia* ИМВ В-7288 указанные цитокинины определялись в незначительных или следовых количествах (рис.).

PGR-бактерии, синтезирующие фитогормоны, могут быть полезны для растений на загрязненных пестицидами территориях, поскольку известно, что пестициды в большинстве случаев снижают количество фитогормонов в растениях [18].

Выводы

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что спектры синтезируемых микроорганизмами-деструкторами хлорорганических

соединений фитогормонов отличаются друг от друга не только в зависимости от вида и рода бактерий, но и в зависимости от штамма микроорганизмов. Это четко прослеживается на примере *P. putida* 9 и *P. putida* ИМВ В-7289, принадлежащих к одному виду. Очевидно, что спектр синтезируемых микроорганизмами фитогормонов – это штаммовая характеристика.

Из всех исследованных культур только *P. putida* 9 является активным продуцентом внеклеточных легкодоступных для растений ауксинов и цитокининов и представляет интерес как перспективный компонент комплексного микробного препарата для ремедиации загрязненных хлорорганическими пестицидами территорий и стимулирования развития растений, выращиваемых на этих землях. Штамм может использоваться в комплексе с такими эффективными деструкторами, как *B. megaterium* ИМВ В-7287 и *P. putida* ИМВ В-7289, которые проявили более низкую способность синтезировать исследуемые фитогормоны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мишке И.В. Микробные фитогормоны в растениеводстве. – Рига: Зинатне, 1988. – 151 с.
2. Lipez-Bucio J., Campos-Cuevas J.C., Hernández-Calderon E., Velásquez-Becerra C., Farias-Rodriguez R., Macías-Rodriguez L.I., Valencia-Cantero E. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root-system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana* // Mol. Plant-Microbe Inter. – 2007. – 20, N 2. – P. 207–217.
3. Choudhary D.K., Prakash A., Wray V., Johri B.N. Insights of the fluorescent pseudomonads in plant growth regulation // Curr. Sci. – 2009. – 97, N 2. – P. 170–179.
4. Shishido M., Chanway C.P. Forest soil community responses to plant growth-promoting rhizobacteria and spruce seedlings // Biol Fertl Soils. – 1998. – 26. – P. 179–186.
5. Ямборко Н.А., Пиндрус А.А. Токсическое и мутагенное действие гексахлорциклогексана и продуктов его микробной деструкции на микробный ценоз почвы // Микробиол. журн. – 2011. – 73, № 6. – С. 56–63.
6. Методические рекомендации по определению фитогормонов. – К.: Ин-т ботаники АН УССР, 1988. – 78 с.
7. Савинский С.В., Кофанов В.И., Кофанов В.И., Стасевская И.Л. Методические подходы к определению фитогормонов с помощью спектроденситометрической тонкослойной хроматографии // Физиол. биохим. культ. раст. – 1987. – 19, № 2. – С. 210–215.
8. Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // Ann. Rev. Plant Biol. – 2006. – 57. – P. 233–266.
9. Кудоярова Г.Р., Курдиш И.К., Мелентьев И.К. Образование фитогормонов почвенными и ризосферными бактериями как фактор стимуляции роста растений // Известия Уфимского научного центра РАН. – 2011. – № 3–4. – С. 5–16.

10. Цавкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Нетрусов А.И. Микроорганизмы-продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение // Прикл. биохим. микробиол. – 2006. – 42, № 2. – С. 133–143.
11. Драговоз И.В., Леонова Н.О., Иутинская Г.А. Синтез фитогормонов штаммами *Bradyrhizobium japonicum* различной симбиотической эффективности // Микробиол. журн. – 2011. – 73, № 4. – С. 29–35.
12. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling // FEMS Microbiol. Rev. – 2007. – 31. – P. 425–448.
13. Wittenmayer L., Merbach W. Plant responses to drought and phosphorus deficiency: contribution of phytohormones in root-related processes // Plant Nutr. Soil Sci. – 2005. – 168. – P. 531–540.
14. Ali B., Sabri A.N., Ljung K., Hasnain S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. // Lett. Appl. Microbiol. – 2009. – 48. – P. 542–547.
15. Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Belimov A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status // Ann. Appl. Biol. – 2010. – 157. – P. 361–379.
16. Кулаева О.Н., Кузнецов В.В. Новейшие достижения и перспективы в области изучения цитокининов // Физиол. раст. – 2002. – 49, № 4. – С. 626–640.
17. Архипова Т.Н., Весёлов С.Ю., Мелентьев А.И., Мартыненко С.Е., Кудоярова Г.Р. Сравнение действия штаммов, различающихся по способности синтезировать цитокинины, на рост и содержание цитокининов в растениях пшеницы // Физиол. раст. – 2006. – 53, № 4. – С. 506–510.
18. Шевчук О.А., Кур'ята В.Г. Вплив паклобутразолу на активність гіберелінів і вміст різних форм абсцизової кислоти у листках цукрового буряка // Вісник ХНАУ. Серія Біологія. – 2007. – Вип. 1 (10). – С. 71–75.

YAMBORKO N.A., LEONOVA N.O.

Institute of Microbiology and Virology ASU,

Ukraine, 03143, Kyiv, Zabolotny str., 154, e-mail: kreminna@ukr.net

THE SYNTHESIS OF EXOGENOUS PHYTOHORMONES BY SOIL MICROORGANISMS-DESTRUCTORS OF ORGANOCHLORINE CONTAMINANTS

Aim. It has been studied the qualitative and quantitative compositions of the exogenous phytohormones synthesized by soil microorganisms-destructors of organochlorine pollutants hexachlorocyclohexane and hexachlorobenzene: *Pseudomonas putida* IMV B-7289, *Bacillus megaterium* IMV B-7287, *Stenotrophomonas maltophilia* IMV B-7288 and *Pseudomonas putida* 9. **Results.** *P. putida* 9 is an active strain-producer of exogenous auxins and cytokinins readily available for plant: the maximum content of Zeatin and Zeatinrhizobid exceeded their synthesis by another testing strain in 8.3–15.4 times. *P. putida* 9 is interesting as a component of a complex microbial preparation for the remediation of areas contaminated by organochlorine pesticides. **Conclusions.** The strain may be used in combination with effective destructors *B. megaterium* B-7287, and *P. putida* IMV B-7289, which showed lower ability to synthesize phytohormones investigated. The spectrum of the synthesized extracellular microbial phytohormones is strain characteristic. It has been shown that the total production of exogenous cytokinins.

Keywords: exogenous microbial phytohormones, pollutant remediation.