

УДК 579.222.+547+579.852.1

Л.С. Церковняк, А.О. Рой, І.К. Курдиш

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

СИНТЕЗ АМІНОКИСЛОТ *BACILLUS SUBTILIS* ІМВ В-7023 В СЕРЕДОВИЩІ З ГЛІЦЕРОФОСФАТОМ

*Показано, що при вирощуванні *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 в живильному середовищі з гліцерофосфатом в культуральній рідині накопичуються біологічно активні речовини, які позитивно впливають на схожість насіння та формування проростків рослин. Бактерії синтезують у цьому середовищі амінокислоти, кількісний склад яких відрізняється залежно від типу вуглецевого живлення клітин та часу культивування.*

*Ключові слова: амінокислоти, *Bacillus subtilis*, гліцерофосфат.*

В системі органічного землеробства важлива роль відводиться управлінню факторами природної родючості ґрунтів, серед яких особливе значення відіграють мікробні угруповання кореневої зони рослин. Для корекції їх складу і функцій та підвищення врожайності рослин застосовують мікробні препарати [6; 7]. З цією метою у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях ІМВ НАН України був селекціонований високоактивний штам фосфатомобілізівних бактерій *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023, здатний до мобілізації фосфору з важкорозчинних фосфоровмісних сполук ґрунту. Цей штам характеризувався високою антагоністичною активністю до фітопатогенів [10–12].

Одним із механізмів впливу інтродукованих в агроєкосистему мікроорганізмів на ріст і розвиток рослин є виділення ними біологічно активних сполук [7]. Відомо, що бактерії роду *Bacillus* здатні продукувати різні біологічно активні речовини: білки, вітаміни [13, 14, 19], інсектициди [2], ауксини, гібереліни, цитокініни [18], а також ряд низькомолекулярних сполук, таких як органічні кислоти [16], амінокислоти [14]. Амінокислоти беруть участь у білковому і вуглецевому обміні, включаються в процеси синтезу вітамінів, ферментів, входять до складу алкалоїдів, токсинів і багатьох інших метаболітів, а також впливають на процес проростання насіння та розвиток рослин [5; 9]. Прикладом може

© Л.С. Церковняк, А.О. Рой, І.К. Курдиш, 2009

бути препарат «Ліорастим» – регулятор росту рослин, створений на основі природних амінокислот [15].

Здатність фосфатмобілізівних бактерій *B. subtilis* IMB B-7023 продукувати амінокислоти в середовищі з гліцерофосфатом досліджено недостатньо. Тому метою роботи було визначити можливість *B. subtilis* IMB B-7023 синтезувати амінокислоти залежно від типу вуглецевого живлення в середовищі та часу культивування.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень був штам фосфатмобілізівних бактерій *B. subtilis* IMB B-7023, виділений у відділі мікробіологічних процесів на твердих поверхнях IMB НАНУ [10]. Бактерії вирощували в періодичних умовах при температурі 28°C на качалці (n=240 об/хв) в колбах Ерленмейера, що містили 100 мл відповідного середовища (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 0.5; MgSO₄·7H₂O – 0.3; NaCl – 0.3; KCl – 0.3; CaCO₃ – 5.0; MnSO₄·7H₂O – 0.001; FeSO₄ – 0.001; глюкоза – 10.0; гліцерофосфат кальцію – 2.0, рН середовища 7.0–7.2. Це середовище містило глюкозу (джерело вуглецю) і гліцерофосфат (джерело фосфору). Другий варіант середовища відрізнявся від вищезазначеного відсутністю глюкози як джерела вуглецю. Чисельність життєздатних клітин у суспензії визначали шляхом висіву з десятикратних розведень на агаризоване середовище і підрахунком колоній (КУО/мл). Після культивування клітини осаджували центрифугуванням на центрифугі УПЦ – 50 протягом 15 хв при 8 тис. об/хв. В культуральному середовищі вміст амінокислот визначали на амінокислотному аналізаторі BIOTRONIC (Німеччина).

Вплив культуральної рідини (КР) бактерій та їх культурального середовища (КС) на схожість насіння і формування проростків рослин визначали за ДСТУ 4138 – 2002 [3].

Визначення фосфату проводили в культуральному середовищі за методом Фіске-Суббароу [17]. Результати дослідів обробляли статистично [8].

Результати та їх обговорення. Результати дослідів свідчать про залежність фізіологічної активності *B. subtilis* IMB B-7023 від джерела вуглецевого живлення. Показано, що культивування цих бактерій в живильному середовищі з глюкозою (джерело вуглецю) і гліцерофосфатом (джерело фосфору) супроводжувалось активним їх ростом, який досягав максимуму на другу добу інкубації (рис. 1). Після 48 год. культивування чисельність життєздатних клітин у культуральній рідині становила 7,8·10⁸ клітин в 1 мл, а вміст фосфату перевищував 400 мг/мл (рис. 2). У той самий час рН КС знижувалось із 7,2 до 5,3.

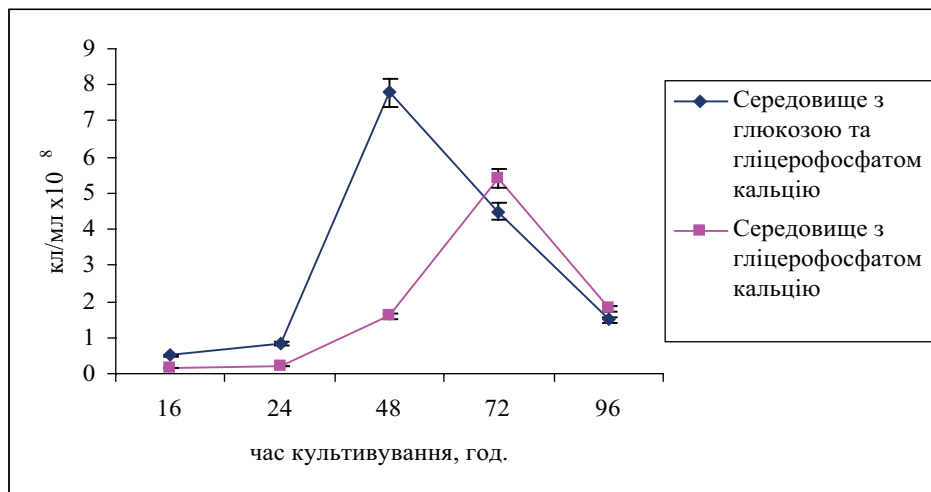


Рис. 1. Чисельність бактерій *Bacillus subtilis* IMB B-7023 залежно від часу культивування та типу вуглецевого живлення

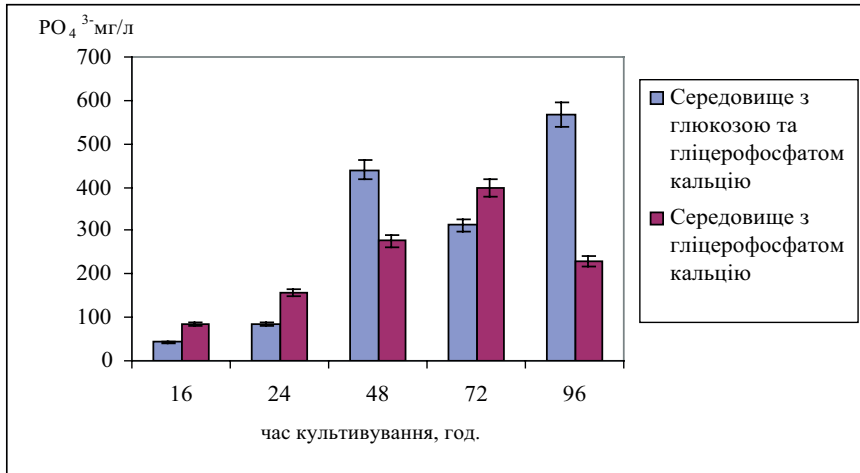


Рис. 2. Накопичення фосфату в культуральному середовищі *Bacillus subtilis* IMB B-7023 залежно від часу культивування та типу вуглецевого живлення

Деякі інші результати спостерігали при вирощуванні бацил у середовищі, де гліцерофосфат був єдиним джерелом енергії, вуглецю і фосфору. В цьому випадку чисельність бактерій зростала менш інтенсивно. Максимальну чисельність бактеріальних клітин і накопичення PO_4^{3-} реєстрували після 72 год. культивування (рис. 1, 2). При цьому рН культурального середовища практично не змінювалось і становило 7,1–6,8.

Показано, що обробка насіння досліджуваних овочевих та злакових культур КР *B. subtilis*, одержаних після вирощування в середовищі з глюкозою та гліцерофосфатом, підвищувала схожість насіння порівняно з контролем на 18,1–62,5 % (табл. 1). Подібні результати одержані нами при дослідженні впливу КР *B. subtilis* на насіння озимої пшениці сорту Веселка, схожість якого порівняно з контролем була більшою на 9,6 % (табл. 2). Одержані результати свідчать про те, що речовини, які стимулюють схожість насіння і подальший розвиток проростків, значною мірою концентруються в КС, оскільки воно діє подібно до КР (табл. 2).

Таблиця 1

Схожість насіння рослин після обробки культуральною рідиною *Bacillus subtilis* IMB B-7023

Насіння рослин	Схожість насіння, % до контролю
Огірки сорту Ніжинські	124,1
Томати сорту Світанок	118,1
Буряк сорту Екстра	149,9
Кукурудза сорту Титан	123,3
Томати сорту Перемога	162,5

Примітка: культуральна рідина в розведенні 1:10; контроль – насіння, оброблене водою (100 %).

Таблиця 2

Вплив культуральної рідини та культурального середовища *Bacillus subtilis* IMB B-7023 на схожість насіння озимої пшениці сорту Веселка

Варіант обробки насіння	Схожість насіння	
	шт.	% до контролю
Контроль*	115,0±10,7	100,0
Культуральна рідина	121,0±10,8	105,2
Культуральна рідина : вода 1:20	126,1±11,7	109,6
Культуральне середовище	126,0±11,2	109,6
Культуральне середовище : вода 1:20	125,1±10,2	108,7

Примітка: * – насіння оброблено стерильною водопровідною водою

Дослідження синтезу амінокислот даним штамом *B. subtilis* ІМВ В-7023 залежно від типу вуглецевого живлення клітин показало, що при вирощуванні цих бактерій у поживному середовищі з глюкозою і гліцерофосфатом, а також в середовищі, що містило гліцерофосфат як джерело фосфору, вуглецю і енергії, в культуральному середовищі накопичувались амінокислоти: лізин, серін, ізолейцин, глютамінова, аспарагінова та інші, якісний склад яких був майже однаковим за виключенням гліцину та аланіну. Так, синтез аланіну відмічали тільки після 72 год. культивування бацил у середовищі з глюкозою та гліцерофосфатом, а гліцину – після 48 год. їх вирощування в середовищі з гліцерофосфатом, який був єдиним джерелом вуглецю та фосфору. Концентрація інших амінокислот у КС зростала із збільшенням часу інкубації (табл. 3).

При вирощуванні *B. subtilis* ІМВ В-7023 в середовищі з гліцерофосфатом і глюкозою в стаціонарній фазі росту клітини синтезували в 1,2 рази більше лізину та ізолейцину порівняно з бактеріями, які культивували в середовищі, де гліцерофосфат був єдиним джерелом вуглецю та фосфору. За останніх умов в стаціонарній фазі росту (72 год.) синтезували в 1,1 рази більше лейцину, в 1,9 разів більше глютамінової кислоти та в 4,5 разів більше аспарагінової кислоти.

Відомо, що на проростання насіння та формування проростків впливають різноманітні сполуки фітогормональної дії, які продукуються мікроорганізмами. Серед них певна роль належить речовинам фенольної природи [4], в синтезі яких попередниками виступають L-тирозин і L-фенілаланін [1].

Таблиця 3

Вміст амінокислот в культуральному середовищі *Bacillus subtilis* ІМВ В-7023 залежно від джерела вуглецевого живлення та часу культивування

Амінокислоти	Середовище з глюкозою та гліцерофосфатом				Середовище з гліцерофосфатом			
	Кількість амінокислот в залежності від часу культивування (год), (%)							
	24	48	72	96	24	48	72	96
Лізин	2,53	7,39	4,44	2,55	3,98	4,85	6,06	23,58
Аспарагінова	10,80	2,18	2,26	3,89	10,20	4,68	9,87	3,00
Серін	12,15	0,00	15,55	0,00	19,13	9,66	0,00	0,00
Глютамінова	31,61	1,63	12,69	5,82	12,44	5,25	3,17	4,04
Гліцин	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	17,44	0,00	0,00
Аланін	0,00	0,00	11,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ізолейцин	2,97	17,22	5,65	25,94	4,68	6,93	14,23	4,03
Лейцин	17,52	27,60	21,01	24,10	2,12	26,28	31,45	26,76
Тирозин	12,39	23,13	16,28	20,0	17,55	19,31	21,75	22,21
Фенілаланін	10,02	20,85	10,80	17,70	7,89	11,20	13,34	16,38

Примітка: числові дані є розрахунком амінокислоти в Мкмоль (%) до загальної кількості амінокислот.

Проведені дослідження КС *B. subtilis* ІМВ В-7023, одержаного в стаціонарній фазі росту після культивування в середовищі з гліцерофосфатом та глюкозою, показали наявність в ньому L-фенілаланіну і L-тирозину. Кількість цих сполук при вирощуванні бактерій в даних умовах збільшувалась після 24 і 48 год. культивування (табл. 3). Після 72 год. їх вміст зменшувався і надалі знову збільшувався через 96 год. Синтез клітинами L-фенілаланіну і L-тирозину в середовищі, де гліцерофосфат був єдиним джерелом вуглецевого та фосфорного живлення, зростав поступово.

Таким чином, встановлено позитивний вплив продуктів метаболізму *B. subtilis* ІМВ В-7023 на схожість насіння рослин та формування їх проростків. Якісний склад амінокислот, які синтезували бацили при інкубуванні в середовищі з різними типами вуглецю (глюкоза, гліцерофосфат), майже не відрізнявся. Наявність синтезованих *B. subtilis* амінокислот стимулює процеси проростання та схожості насіння рослин, їх росту та розвитку.

СИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ *BACILLUS SUBTILIS* ИМВ В-7023 В СРЕДЕ С ГЛИЦЕРОФОСФАТОМ

Резюме

Показано, что при выращивании *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 в питательной среде с глицерофосфатом в культуральной среде накапливаются биологически активные вещества, которые положительно влияют на всхожесть семян и формирование проростков растений. Бактерии синтезируют в этой среде аминокислоты, количественный состав которых отличается в зависимости от типа углеродного питания и времени культивирования.

Ключевые слова: аминокислоты, *Bacillus subtilis*, глицерофосфат.

L.S. Tsercovniac, A.A. Roy, I.K. Kurdish

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

SYNTHESIS OF AMINOACIDS OF *BACILLUS SUBTILIS* IMV V-7023 IN THE MEDIUM WITH GLYCEROPHOSPHATES

Summary

It was shown that under cultivation of *Bacillus subtilis* IMV V-7023 in the nutrient medium with glycerophosphate biologically active substances are accumulated in the culture liquid. They influence positively the seeds growth and formation of plant germs. The bacteria synthesize amino acids in this medium, their quantitative structure differs from the type of carbon nutrition and cultivation time of the cells.

The paper is presented in Ukrainian.

Keywords: amino acids, *Bacillus subtilis*, glycerophosphate.

The authors' addresses: L.S. Tsercovniac, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154, Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Биохимия фенольных соединений / Под ред. Дж.Харборна — Москва: Мир, 1968. — 451 с.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — Москва: Мир, 2002. — 589 с.
3. ДСТУ 4138 — 2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. Чинний від 2004 — 01 — 01. — Київ: Держспоживстандарт України, 2003. — 173 с.
4. Калінін В.Ф. Застосування регуляторів росту в сільському господарстві. — Київ: Урожай, 1989. — 166 с.
5. Кротович В.Л. Основы биохимии растений. — Москва: Высшая школа, 1971. — 46 с.
6. Курдиш И.К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. — К.: КВЦ, 2001. — 142 с.
7. Курдиш И.К., Рой А.А., Чуйко Н.В. и др. Взаимодействие бактерий — компонентов препарата комплексного действия с некоторыми видами растений // Мат. Всерос. конф. с Междунар. участием: Фундаментальные и прикладные аспекты исследования симбиотических систем 25–27 сентября 2007. — Саратов: Научная книга, 2007. — С. 11.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. — Москва: Высшая школа., 1968. — 284 с.
9. Майстер А. Биохимия аминокислот. — Москва: Изд. иностранной литературы, 1961. — 530 с.
10. Патент України. 2003. № 54923 А. Штам бактерій *Bacillus subtilis* для одержання бактеріального добрива для рослинництва / Курдиш І.К., Рой А.О. Україна. Заявл. 22.05.2002. Опубл. 17.03.2003. Бюл. №3.
11. Рой А.А., Залоцко О.В., Чернова Л.С., Курдиш И.К. Антагонистическая активность фосфатмобилизирующих бацилл к фитопатогенным грибам и бактериям. — Агроекологічний журнал, 2005, №1. — С. 50–55.
12. Рой А.А., Рева О.Н., Смирнов В.В., Курдиш И.К. Биологические свойства фосфатмобилизирующего штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Прикладная биохимия и микробиология. — 2004. — Т. 40, №5. — С. 551–557.
13. Смирнов В.В., Резник С.Р., Василевская И.А. Спорообразующие аэробные бактерии — продуценты биологически активных веществ. — Киев: Наукова думка, 1982. — 277 с.
14. Смирнов В.В., Сорокулова И.В., Пинчук И.В. Бактерии рода *Bacillus* — перспективный источник биологически активных веществ. // Мікробіологічний журнал. — 2001. — Т. 63, №1. — С. 72–91.

15. Справочник пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению в 2000 году. — Москва: Агрорус, 2000. — 277 с.
16. Токмакова Л.Н. Штаммы *Bacillus polymyxa* и *Achromobacter album* — основа для создания бактериальных препаратов // Микробиол. журнал. — 1997. — Т. 59. №4. С. 131–138.
17. Унифицированные методы анализа вод /Под ред. Ю.Ю.Лурье. — Москва: Химия, 1971. — 207 с.
18. Давкелова Е.А., Климова С.Ю., Чердынцева Т.А., Непрусов А.И. Микроорганизмы — продуценты стимуляторов роста растений и их практическое применение. // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42, №2. — С. 133–143.
19. Sauer U., Cameron D. C., Bailey G. E. Metabolic capacity of *Bacillus subtilis* for the production of purine nucleosides, riboflavin and folic acid // Biotechnol. and Bioeng. — 1998. — 59, N2. — P. 227 — 238.

Отримано 15. 01. 2009