

**Г. Ю. Грабова¹, І. В. Драговоз¹, Н. О. Леонова¹,
А. М. Остапчук², Л. В. Авдєєва¹**

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,
вул. Акад. Д.К. Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

² Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ЕКЗОМЕТАБОЛІТИ ШТАМУ *BACILLUS* *AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM* ІМВ В-7524 З РІСТСТИМУЛЮВАЛЬНОЮ АКТИВНІСТЮ

Мета. Визначити якісний та кількісний склад екзометаболітів штаму *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7524, що зумовлюють його рістстимулювальну активність. **Методи.** Мікробіологічні, фізіологічні, фізико-хімічні: спектроденситометрична тонкошарова хроматографія, рідинна хромато-мас-спектрометрія. **Результати.** Встановлено, що супернатант культуральної рідини штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7524 за розведення у 200 та більше разів стимулює схожість насіння та накопичення біомаси рослинами озимої пшениці. За результатами специфічного біотестування встановлено, що такий ефект забезпечується речовинами з ауксиновою, цитокініновою та гіберелловою активностями. Показано, що їх вміст у культуральній рідині становить 42, 70,5 та 341,9 мкг/г абсолютно сухої біомаси відповідно. Також серед екзометаболітів досліджуваного штаму виявлена абсцизова кислота. **Висновки.** Рістстимулювальна активність дослідженого штаму баціл зумовлена присутністю фітогормонів-стимуляторів у складі екзометаболітів: ауксинів, цитокінінів, гіберелінів, які можуть відігравати певну роль в індукції захисних реакцій рослин.

Ключові слова: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7524, екзометаболіти, рістстимулювальна активність, фітогормони.

Перспективним напрямком у сільськогосподарському рослинництві є використання plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) як альтернативи пестицидам, оскільки це дозволяє суттєво зменшити хімічне навантаження на навколишнє середовище [1]. Серед багатьох PGPR особливо виділяються аеробні спороутворювальні бактерії роду *Bacillus*, оскільки вони характеризуються потужним біосинтетичним потенціалом, високою екологічною пластичністю та є типовими представниками ґрунтової мікробіоти [2].

Для PGPR характерним є різновекторна взаємодія із рослинами, опосередкована антибіотичними, фітогормональними сполуками, вітамінами тощо. Вважається, що здатність синтезувати фітогормони – одна з основних властивостей ризосферних, епіфітних, ендодітних та симбіотичних бактерій, що стимулюють ріст і розвиток рослин. Серед мікроорганізмів така властивість притаманна, перш за все, ґрунтовим ризосферним, епіфітним і бактеріям-симбіонтам родів: *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas* [3]. Також біосинтез ауксинів поширений у представників вільноіснуючих і симбіотичних ціанобактерій. У зв'язку з наведеним вище, одним з важ-

ливих етапів дослідження штамів, перспективних при створенні біопрепаратів для рослинництва, є оцінка їх фітостимулювальної активності та встановлення природи екзометаболітів, що її зумовлюють.

Раніше нами було виділено штам *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7524 з високим та середнім рівнем антагонізму щодо фітопатогенних мікроміцетів [4]. Було показано, що культуральна рідина цього штаму не містить фітотоксичних речовин, а за певних розведень значно стимулює ріст та розвиток рослин озимої пшениці [5]. Метою даної роботи було провести якісний та кількісний аналіз екзометаболітів цього штаму, що зумовлюють його рістстимулювальну активність.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження був штам *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7524, який був виділений нами з ґрунту. Культивування бацил проводили в колбах при 200 об/хв за 37°C впродовж 18–24 год у рідкому поживному синтетичному середовищі такого складу (г/л): глюкоза – 10,00; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 1,29; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 4,75; KH_2PO_4 – 9,60; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,18; (рН = 7,2–7,6). Середовище засівали 18-годинною культурою бацил в експоненційній фазі росту. Культуральну рідину штаму центрифугували 30 хв при 15000g і температури 4°C.

Загальну рістстимулювальну активність супернатанту культуральної рідини (СКР) штаму ІМВ В-7524 досліджували за допомогою рулонного методу на водній культурі озимої пшениці сорту Смуглянка [6]. Оцінку схожості та біомаси рослин проводили на 7-му добу після посіву. Позитивним контролем був препарат Ендофіт-Л1 (ЧП «ПКФ Импортсервис», Україна), що використовується як стимулятор росту рослин.

Для проведення специфічного біотестування на біологічних об'єктах з СКР штаму ІМВ В-7524 отримували накопичувальні фракції фітогормональних сполук. Штам культивували за описаних вище умов, клітини видаляли центрифугуванням. Для отримання ауксинового екстракту СКР підкиснювали до рН 3, гіберелового – до рН 2,5, цитокінінового – підлужували до рН 8, тричі екстрагували рівним об'ємом етилацетату (н-бутанолу для цитокінінового). Етилацетатні (бутанольні) фракції об'єднували, випарювали насухо та перерозчиняли у 80%-ному етанолі. Отримані екстракти зберігали при –24°C для використання у подальших дослідженнях.

Для визначення ауксинової активності використовували відрізки колеоптилів пшениці (сорт Альбатрос одеський) [7]. Насіння пшениці промивали, стерилізували 10%-им розчином H_2O_2 , замочували в кюветах і ставили для пророщування у термостат при $t = 24^\circ\text{C}$. Чотирьохдобові етиольовані проростки пшениці використовували для біотесту. Як позитивний контроль використовували розчин індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК, Sigma-Aldrich, США) у концентрації 10^{-5}M .

Визначення цитокінінової активності проводили на ізольованих сім'ядолях огірка сорту Фенікс [8]. Використовували 6-денні проростки огірків, вирощені у термостаті (при 26°C) в темряві. Контролем був розчин 6-бензоамінопурину (БАП) (Serva, Німеччина) у концентрації 10^{-5}M . Зміни маси сім'ядолей виражали у відсотках приросту до відповідної маси у контрольному варіанті.

Для визначення гіберелової активності використовували гіпокотилі

проростків огірка за методикою Браєна та Лемінга у модифікації Агністікової [9]. Контролем слугували проростки огірка, оброблені водою, позитивним контролем – розчином гіберелової кислоти (ГК_3 , 10^{-5}M).

Для кількісного визначення вмісту ауксинів, абсцизової кислоти та цитокинінів застосовували метод кількісної спектроденситометричної тонкошарової хроматографії [10]. Детектування фітогормонів здійснювали за допомогою скануючого спектроденситометра «Сорбфіл» (Росія). Кількість синтезованих позаклітинних фітогормонів розраховували у мкг на грам абсолютно сухої біомаси (АСБ) продуцента та в мкг на літр СКР.

Визначення кількісного вмісту гіберелінів проводили методом високоефективної рідинної хромато-мас-спектрометрії (ВЕРХ, LC/MS) з використанням рідинного хроматографа Agilent Technologies 1200 (США) з мас-спектрометричним детектором Agilent Technologies G1956B (США). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (2,1мм×150мм, 3 мкм) (Agilent Technologies, США), швидкість потоку рухомої фази через колонку 0,35 мл/хв., температура термостату колонки 30°C, об'єм інжекції 3 мкл. Детекцію проводили з використанням діодноматричного детектора з реєстрацією сигналів при 198 та 210 нм з фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 190-400 нм. Флуоресцентний детектор використовували з довжиною хвилі екстинкції – 210 нм, емісії – 410 нм. Як рухому фазу використовували 0,1% розчин мурашиної кислоти в ацетонітрилі (А) та 0,1% розчин мурашиної кислоти у воді (В). Елюювання проводили у градієнтному режимі: витримували 20% А впродовж 5 хв, змінювали вміст А від 20 до 80 % за 5 хв з наступним збільшенням А до 100% за 1 хв. Таке співвідношення залишали впродовж 10 хв. Як стандарт порівняння використовували розчин ГК_3 (63492, Aldrich, США).

Для визначення молекулярних мас досліджуваних гіберелінів використовували одноквадрупольний мас-спектрометричний детектор. Іонізацію проводили у режимі електростатичного розпилення (ESI) з формуванням негативних іонів. Для ідентифікації досліджуваних компонентів фіксацію іонів проводили у режимі SCAN в діапазоні 200-500 m/z. ГК_3 ідентифікували шляхом порівняння часів утримання, значень мас молекулярних іонів, спектральних характеристик досліджуваних піків та піків стандартних розчинів. Кількісний вміст ГК_3 визначали методом зовнішньої калібровки з використанням режиму SIM за іоном 345 m/z [11].

Для оцінки достовірності експериментальних даних, представлених в роботі, використовували параметричні критерії нормального розподілу, розраховуючи середнє арифметичне і середнє квадратичне відхилення за рівня значущості <0,05. Аналіз проводили із застосуванням *Microsoft Excel*.

Результати та обговорення. Раніше, при визначенні фітотоксичності було показано, що серед екзометаболітів штаму *B. amyloliquifaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7524 не зустрічаються речовини, що пригнічують ріст та розвиток рослин озимої пшениці [5]. Нами було встановлено (рис. 1), що СКР у розведенні 200 та більше разів стимулює схожість та приріст біомаси рослин озимої пшениці. Слід зазначити, що СКР, розведений у 200 разів, стимулює схожість рослин на рівні препарату-еталону (стимуляція на 49 та 50 % відповідно) і навіть перевищує його за показником накопичення загальної маси рослин майже на 20% (51 та 70 % відповідно).

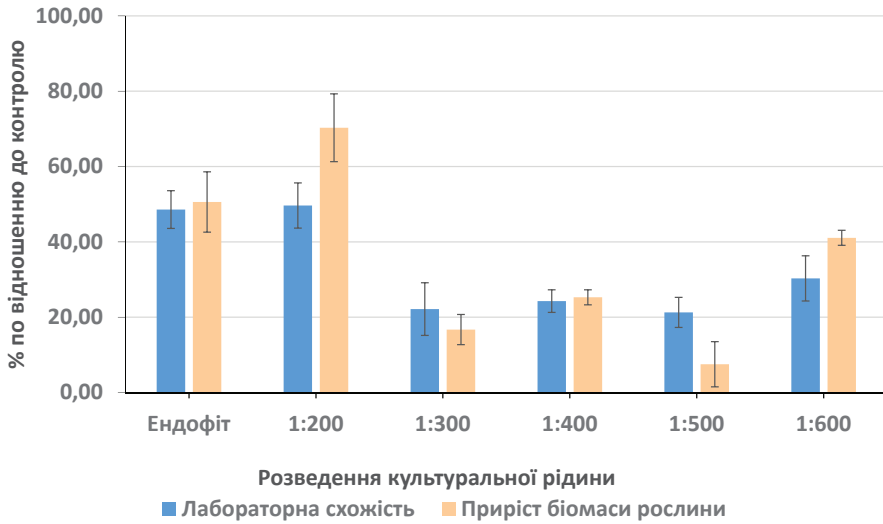


Рис. 1. Загальна фітостимулювальна активність супернатанту культуральної рідини *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7524

Отже, отримані результати свідчать про наявність у СКР речовин із фітостимулювальною активністю. У той же час, метод рулонної культури не дає можливості ані ідентифікувати їх, ані встановити їх кількість та співвідношення. Тому на наступному етапі ми провели відповідне специфічне біотестування на об'єктах, чутливих до трьох класів фітогормонів-стимуляторів: ауксинів, цитокінінів та гіберелінів.

Дослідженням ауксинової активності (рис. 2) встановлено, що екстракт СКР штаму стимулює приріст довжини відрізків колеоптилів з вираженою концентраційною залежністю. Препарат-еталон (ІОК, 10^{-5} М) стимулював приріст довжини колеоптилів на 21%. Під дією екстракту СКР, розведеного у 100 разів, спостерігалось інгібування росту колеоптилів, а у розведенні 200 разів – стимуляція на 15 % по відношенню до контролю.

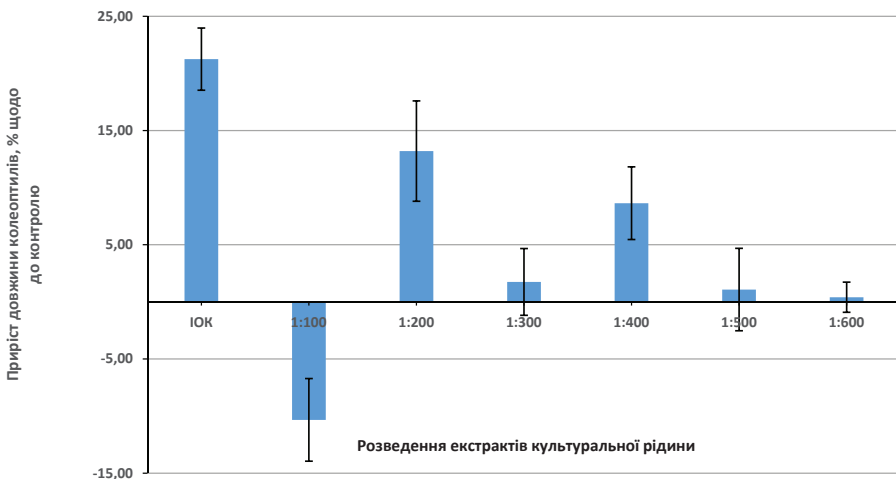


Рис. 2. Приріст довжини відрізків колеоптилів озимої пшениці за дії екстрактів СКР *B. amyloliquefaciens subsp. plantarum* IMB B-7524

При подальшому розведенні екстракту його дія на відрізки колеоптилів зменшувалась. Однак слід підкреслити нелінійну залежність між концентрацією розчинів та ефективністю впливу. Такий характер дії може бути пояснений наявністю не лише широкого спектру ауксиноподібних речовин серед екзометаболітів штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524, але й негормональних регуляторів росту (зокрема, вітамінів), а також їх кооперативним ефектом [12].

Проведення цитокінінового біотесту показало, що екстракт СКР досліджуваного штаму бацил, розведений у 400 разів, пригнічує накопичення біомаси сім'ядоль (рис. 3), що може бути пояснене високою концентрацією цитокінінів та інших коекстрактивних сполук у бутанольному екстракті. Слід зазначити, що при розведеннях 1:100 та 1:200 разів спостерігалася навіть деструкція останніх, ймовірно, ще й за рахунок залишкових концентрацій бутанолу у досліджуваних розчинах.

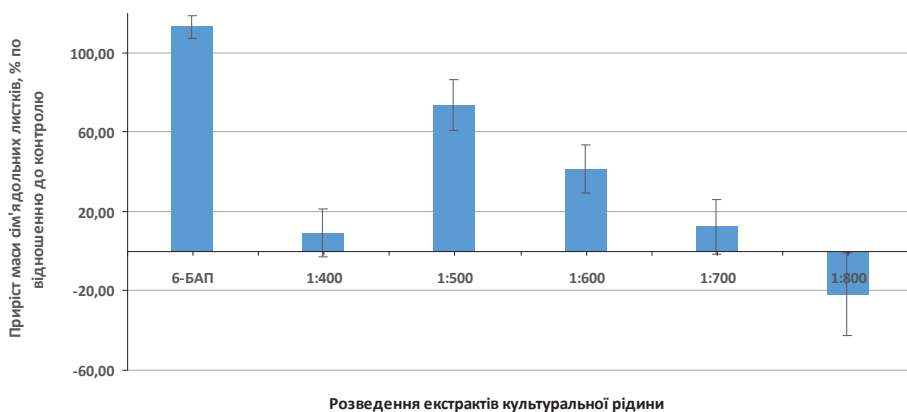


Рис. 3. Приріст маси сім'ядольних листків огірків за дії екстрактів СКР *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524

Найбільшу стимулювальну дію екстракту СКР штаму IMB B-7524 спостерігали у розведенні 1:500 разів. При більших розведеннях досліджуваної фракції вплив на сім'ядольні листки зменшувався та нівелювався у розведенні 1:700. Отже, встановлено, що у культуральній рідині штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524 присутні гормони-стимулятори, що відносяться до класу цитокінінів.

Гібереліни є третім класом фітогормонів, що характеризуються фітостимулювальною дією. Вони регулюють процеси проростання насінини, подовження стебла, формування плодів тощо. [13]. Біотестуванням на гіберелову активність (рис 4.) встановлено, що екстракт СКР досліджуваного штаму бацил збільшує приріст гіпокотилів огірків у розведенні 1:200 та 1:300 на 41 та 20 % відповідно. Більш концентрований екстракт пригнічував ріст рослин, а у розведенні 1:400 та більше не спостерігалось достовірного впливу.

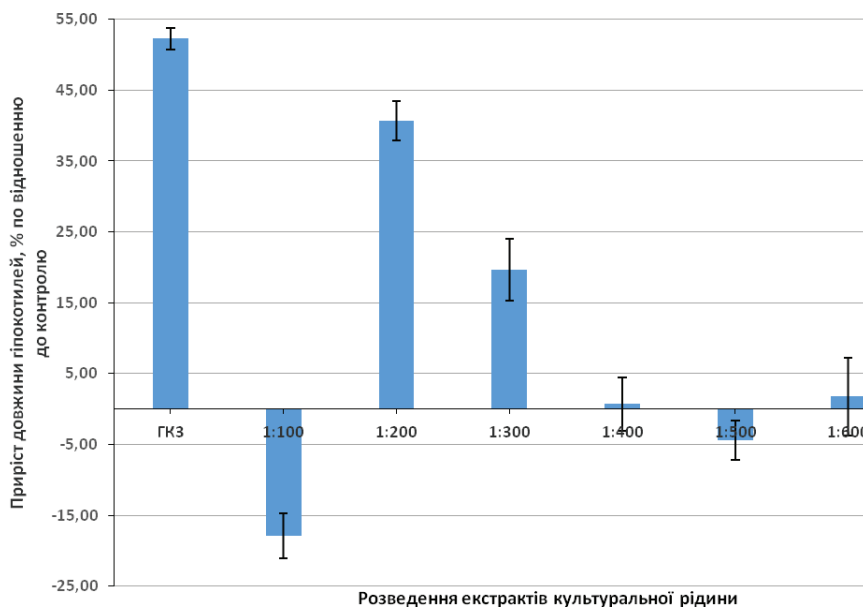


Рис. 4. Приріст довжини гіпокотилей огірків за дії екстрактів СКР *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524

Отже, за допомогою специфічного біотестування на колеоптилях пшениці, сім'ядольних листках та гіпокотиліях огірків показано, що у СКР штаму IMB B-7524 присутні речовини з ауксиною, цитокініною та гібереловою активностями. На наступному етапі було проведено якісний та кількісний аналіз цих речовин методом ТШХ, а також визначено їх кількісний вміст у перерахунку на грам АСБ клітин бацил та на 1 л СКР. Результати дослідження наведені у таблиці.

Встановлено, що досліджуваний штам бацил синтезує відносно невелику загальну кількість ауксинів (42 мкг/г АСБ), зокрема фізіологічно активну ІОК (32,3 % від загального пулу ауксинів). Ймовірно, синтез ауксинів штамом IMB B-7524 може бути збільшений за рахунок введення у середовище культивування триптофану, оскільки він є прекурсором синтезу цих речовин [14].

Таблиця
Вміст фітогормонів у супернатанті культуральної рідини штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524

Фітогормони		мкг/г АСБ		мкг/л СКР	
Ауксини	Індол-3-карбінол	1,1	Σ 42,0	1,2	Σ 48,8
	Індоліл-3-оцтової кислоти гідрозид	27,9		32,4	
	Індоліл-3-оцтова кислота	13,0		15,1	
Цитокініни	Зеатин	12,2	Σ 70,5	14,2	Σ 82,0
	Ізопентеніл-аденін	37,2		43,3	
	Ізопентеніл-аденозин	21,1		24,5	
Гіберелова кислота (ГК ₁)		341,9		397,9	
Абсцизова кислота		7,85		9,1	

Так, за даними літератури, у присутності триптофану синтез ІОК штамми бацил підвищувався у 5-6 разів. [15, 16] У той же час відомо, що здатність до синтезу високих концентрацій ауксинів притаманна фітопатогенним мікроорганізмам і навіть розглядається, як один з факторів патогенності [17, 18]. Згідно даних літератури, низькі концентрації екзогенних ауксинів підвищують швидкість подовження коренів [19]. Ймовірно, досліджуваний нами штам продукує ауксини в оптимальній для видовження коренів концентрації. На користь такого припущення свідчать результати, отримані біотестуванням культуральної рідини (рис. 2).

Одним з ефектів впливу екзогенного ауксину на рослину є те, що ІОК сприяє формуванню кращої кореневої системи рослини, активує метаболічні функції рослинних клітин та прискорює, таким чином, її ріст на ранніх етапах розвитку, коли проросток є найбільш чутливим до інфікування фітопатогенними мікроорганізмами [20]. Раніше нами було показано, що за допосівної обробки рослин озимої пшениці СКР досліджуваного штаму спостерігається зменшення їх ураження гелмінтоспориозом [21]. Таким чином, екзометаболіти штаму *B. amyloliquifaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7524 із ауксиною активністю, ймовірно, можуть брати участь в індукції захисних реакцій рослин.

Сумарний рівень синтезу цитокінінів порівняно до ауксинів виявився дещо вищим (70,5 мкг/г АСБ). У пулі цитокінінових сполук також не виявлено транспортної форми цитокініну – зеатинрибозиду, активність якого набагато менша порівняно із зеатином [22]. Показано, що понад 50 % від загального пулу складає ізопентеніл-аденін, якому притаманна висока фізіологічна активність. Встановлено, що штам здатний синтезувати також незначну кількість абсцизової кислоти (7,85 мкг/г АСБ), що відноситься до стресових фітогормонів з інгібуючою активністю. Наявність цієї речовини серед екзометаболітів штаму ІМВ В-7524 може свідчити про її важливі функції у формуванні взаємовідносин між бактеріями та рослиною: регуляція водного режиму рослин, стійкості до абіотичних стресів, а також важлива роль в індукції стійкості до фітопатогенних грибів [23] Згідно даних літератури, обробка рослин 0,1 мМ розчином абсцизової кислоти значно знижувала ураженість рису бурю плямистістю. Вважається, що одним з механізмів, за яким екзогенна абсцизова кислота підвищує стійкість рослин до фітопатогенних мікроміцетів, є її участь в утворенні активних форм кисню [24].

Слід також зазначити, що відносно низький вміст ауксинів, цитокінінів та абсцизової кислоти у екстрактах СКР може бути пояснений значними втратами речовин у результаті багатоетапної підготовки проб, що включає дві ТШХ. За даними літератури, за такої попередньої очистки повнота визначення цих фітогормонів може складати 25 – 30 % від їх початкового вмісту [10]. Враховуючи втрати, загальну кількість ауксинів та цитокінінів можна припустити у межах 140-170 та 230-280 мкг/г АСБ відповідно.

Визначення вмісту гіберелінів, на відміну від інших фітогормонів, є найбільш складним, оскільки їх налічується понад 90 форм [25], близьких за структурними та фізико-хімічними властивостями. Відомі методи визначення гіберелінів біотестуванням не дозволяють отримати результати щодо їх якісного складу [26]. Використання спектроденситометрії на тонкому шарі обмежено через особливості структури цих речовин – за недос-

татньої кількості подвійних зав'язків у молекулі вони слабо поглинають світло за стандартної для УФ моніторингу довжини хвилі (254 нм) [11]. На сьогодні, одним із вживаних методів, які використовують для аналізу цього класу фітогормонів, є ВЕРХ [27].

Отже, методами препаративно-накопичувальної ТШХ з подальшим ВЕРХ-аналізом було встановлено, що серед екзометаболітів фітогормональної природи штаму ІМВ В-7524 присутні також гіберелові кислоти, а саме ГК₃, наявність якої характерна і для більшості рослин. Відзначимо, що досліджуваний штам здатний синтезувати значну кількість ГК₃ (341,9 мкг/г АСБ), що узгоджується з даними, отриманими методом специфічного біотестування.

Значна відмінність між виявленим вмістом цього та інших класів фітогормональних сполук у СКР штаму пояснюється, у першу чергу, різними методами кількісного аналізу, оскільки ВЕРХ перевищує за чутливістю спектроденситометрію. Крім того, нам вдалося уникнути одного з попередніх етапів очистки за допомогою ТШХ, що значно зменшило втрати речовин, що досліджувались.

Таким чином, було досліджено якісний та кількісний склад екзометаболітів, що зумовлюють фітостимулювальну активність штаму *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ІМВ В-7524. Встановлено, що розведений СКР штаму стимулює схожість та нагромадження біомаси рослин озимої пшениці. Показано, що штам синтезує речовини, що відносяться до 3 класів гормонів-стимуляторів (ауксинів, цитокінінів та гіберелінів) та гормон-інгібітор абсцизову кислоту. За даними літератури, вміст цих сполук у СКР штаму суттєво не відрізняється від інших штамів бактерій роду *Bacillus* [28], окрім гіберелової кислоти, синтез якої у дослідженій бацили вище у декілька разів [29, 30]. Рівень та спектр фітогормональних сполук, що синтезує досліджуваний штам, може свідчити про їх роль у прояві різновекторної біологічної активності бактерій при формуванні ефективних взаємовідносин із рослиною. Вони можуть впливати на ріст та розвиток рослин на певних етапах онтогенезу, сприяти стійкості до абіотичних стресів, зокрема високих або низьких температур, посухи, засолення [31] тощо, а також відігравати певну роль у захисті рослин від фітопатогенних бактерій та мікроміцетів.

**Г. Ю. Грабова¹, И. В. Драговоз¹, Н. А. Леонова¹,
А. М. Остапчук², Л. В. Авдеева¹**

¹ Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України,
ул. Ак. Заболотного 154, Київ 03143, Україна

² Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одеса, 65082, Україна

ЭКЗОМЕТАБОЛИТЫ ШТАММА *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* SUBSP. *PLANTARUM* ИМВ В-7524 С РОСТСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

Резюме

Цель. Определить качественный и количественный состав экзометаболитов штамма *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* ИМВ В-7524, определяющих его ростстимулирующую активность. **Методы.** Микробиологические, физиологические, физико-химические: спектроденситометрическая тонкослойная хроматография, жид-

костная хромато-масс-спектрометрия. **Результаты.** Установлено, что супернатант культуральной жидкости штамма *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524 при разведении в 200 и более раз стимулирует всхожесть семян и накопление биомассы растениями озимой пшеницы. По результатам специфического биотестирования установлено, что такой эффект обеспечивается веществами с ауксиновой, цитокининовой и гиббереллиновой активностями. Показано, что их содержание в культуральной жидкости составляет 42, 70,5 и 341,9 мкг/г абсолютно сухой биомассы соответственно. Также среди экзометаболитов исследуемого штамма обнаружена абсцизовая кислота. **Выводы.** Ростстимулирующая активность исследуемого штамма бацилл связана с присутствием фитогормонов-стимуляторов в составе экзометаболитов: ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, которые, вероятно, играют определенную роль в индукции защитных реакции растений при их обработке культуральной жидкостью штамма B-7524.

Ключевые слова: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMB B-7524, экзометаболиты, ростстимулирующая активность, фитогормоны.

**A. Yu. Grabova¹, I. V. Dragovoz¹, N. O. Leonova¹,
A. N. Ostapchuk², L. V. Avdeeva¹**

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Science of Ukraine,
154 Acad. Zabolotny str., Kyiv, 03143, Ukraine;

² I. I. Mechnikov Odessa National University, 2 Dvoryanskaya str., Odessa 65082, Ukraine

**EXOMETABOLITES OF *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS*
SUBSP. *PLANTARUM* IMV B-7524 STRAIN
WITH GROWTH-STIMULATING ACTIVITY**

Summary

Purpose. To perform qualitative and quantitative analysis of exometabolites of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMV B-7524 strain, causing its growth-stimulating activity. **Methods.** Microbiological, physiological and physical-chemical methods have been used, such as TLC spectrodensitometry, liquid chromatography-mass spectrometry. **Results.** It has been found that supernatant cultural liquid of *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMV B-7524 strain at a dilution of 1:200 and higher stimulates germination of seeds and biomass accumulation by winter wheat plants. According to the results of a specific bioassay it has been determined that this effect is provided by substances with auxin, cytokinin and gibberellic activity. It has been shown that the content of these substances in the cultural liquid is 42, 70.5 and 341.9 µg/g absolutely dry biomass, respectively. Abscisic acid also has been found among exometabolites of the strain. **Conclusions.** The growth-stimulating activity of the studied strain of *Bacillus* is caused by the presence of phytohormones–stimulants among the exometabolites, such as auxins, cytokinins, gibberellins, which can take a part in the induction of protective reaction of plants.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMV B-7524, exometabolites, growth-stimulating activity, phytohormones.

1. Cakmakci R, Erat M, Erdogan U, Donmez MF The influence of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. J. Plant Nutr. Soil. Sci. 2007;170(2):288-295.

2. Melent'ev AI. Aerobic spore-forming bacteria *Bacillus* Cohn. in agro-ecosystems. – M:Nauka; 2007.
3. Tsavkelova EA, Klimova SYu, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. The microorganisms – producers of plant growth stimulants and their practical application. J. Appl. Biochemistry and Microbiology. 2006;42(2):133-143.
4. Grabova AY, Dragovoz IV, Kruchkova LA, Pasichnik LA, Avdeeva LV. [Bacillus strains's screening – active antagonists of bacterial and fungal phytopathogens]. Mikrobiol Z. 2015;77(6):21-30. Ukrainian.
5. Grabova AY, Dragovoz IV, Avdeeva LV. [Biosecurity, phytotoxicity and sensitivity for antibiotics of the *Bacillus* sp. C6 strain – antagonist of phytopathogenic bacteria and fungi]. Bulletin of Kharkiv National Agricultural University, Series Biology. 2015;35(2):80-86. Russian.
6. Vasilkova MV, Pylaeva GI, Sintsov KN, Zlobin AA [Evaluation of pathogenic properties of microorganisms – destructors organophosphorus compounds]. Proceedings of the Intern. Conf. “Science and Education for the purposes of biosafety” Pushchino Oct 6-9; 2008 – Pushchino. Russian.
7. Boychuk OB Zaitsev LM [Application of short segments wheat coleoptiles test to determine the auxin]. Ukr. Botan. Zh. 1977;6:632-636. Ukrainian.
8. Kholodny Institute of Botany. [Guidelines on determination of plant hormones]. – Kyiv; 1988. Russian.
9. Muromtsev GS, Agnistikova VN. [Gibberellins: Monography]. Moscow: Nauka; 1984. Russian.
10. Savinskiy SV, Dragovoz IV, Pedchenko VK. [Determination of indole-3-acetic acid and abscisic acid in a plant sample by HPLC]. Fiziol. and Biochem. cult. sol. 1991;23(6):611-619. Russian.
11. Bhalla K. Singh SB, Agarwal R. Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium strains*. Environmental Monitoring and Assessment. 2010;167(1):515-520.
12. Kefeli VI. [Vitamins and some other members of non-hormonal plant growth regulators]. // J. Appl. Biochemistry and Microbiology. 1981;18(1):5-24. Russian.
13. Davies PJ, editor. Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action! Dordrecht: Springer; 2004.
14. Sarwar M, Arshad M, Martens DA, Frankenberger WT. Tryptophan-dependent biosynthesis of auxins in soil. Plant and Soil. 1992;147:207-215.
15. Idris EE, Iglesias DJ, Talon M, Borriss R. Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. MPMI. 2007;20(6):619–626.
16. Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Netrusov AI. Auxin Production by Bacteria Associated with Orchid Roots. Microbiology. 2005;74(1):46–53.
17. Leonova NA, Dankevich LA. [Exogenous auxin of pathogenic and rhizobia bacteria]. In: Achievements and problems of genetics, breeding and biotechnology. Kyiv: Logos; 2012. Ukrainian.
18. Pinton R, Varanini Z, Nannipieri P, editors. The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2007.
19. Silva T, Davies PJ. Elongation rates and endogenous indoleacetic acid levels in roots of pea mutants differing in internode length. Physiol. Plantarum. 2007;129:804–812.

20. Kilian M, Steiner U, Krebs B, Junge H, Schmiedeknecht G, Hain R. FZB24® *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 1/00. 2000;1:72-93.
21. Grabova AYu, Dragovoz IV, Iliash VM, Muchnyk FV, Avdeeva LV. The effect of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* IMV B-7524 strain exometabolites on the induction of defense reactions in winter wheat plants. Mikrobiol Z. 2016;78(2):80-88.
22. Morgun VV, Kots SJ, Kirichenko EV. [Growth-stimulating rhizobacteria and their practical application. Physiology and biochemistry of cultivated plants]. 2009;41(3):187-207. Russian.
23. Mauch-Mani B, Mauch F. The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. Current Opinion in Plant Biology. 2005;8: 409-414.
24. De Vleeschauwer D, Yang Y, Cruz CV, Hofte M. Abscisic Acid-Induced Resistance against the Brown Spot Pathogen *Cochliobolus miyabeanus* in Rice Involves MAP Kinase-Mediated Repression of Ethylene Signaling. Plant Physiology. 2010;152:2036-2052.
25. Hooley R. Gibberellins: perception, transduction and responses. Plant Molecular Biology. 1994;26:1529-1555.
26. Nefed'eva EE, Mazey NG. [Determination of the A3 gibberellin in plants by HPLC]. Applied Biochemistry and Microbiology. 2009;45(4):502-507. Russian.
27. Dimova SB. [Phytohormones — microbial waste products. Methods of their determination]. Agricultural Microbiology. 2013;18:159-185. Ukrainian.
28. Karadeniz A, Topcuoglu SF, Inan S. Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 2006;22:1061–1064.
29. Gutierrez-Manero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR, Talon M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Physiologia plantarum. 2001;111:206–211.
30. Joo G-J, Kim Y-M, Lee I-J, Song K-S, Rhee I-K. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. Biotechnology Letters. 2004;26:487–491.
31. Titov AF, Talanova VV. [Plants resistance and phytohormones]. Petrozavodsk; 2009. Russian.

Отримано 29.07.2016