

УДК 576.851.13

М. Р. РАМЕЗАНПУР

ОБРАЗОВАНИЕ ИНДОЛИЛУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ МЕСТНЫМИ  
ШТАММАМИ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩИХ ПСЕВДОМОНАД,  
ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РИЗОСФЕРЫ РИСА, КУЛЬТИВИРУЕМОГО В  
СЕВЕРНЫХ ПРОВИНЦИЯХ ИРАНА

Из ризосферы риса, культивируемого в различных районах трех северных провинций Ирана, были изолированы и идентифицированы с помощью стандартных методов 111 штаммы флюоресцирующих псевдомонад. Полученные изоляты были протестированы на образование индолилуксусной кислоты (ИУК). Количество ИУК, образованное испытываемыми штаммами в присутствии триптофана (2 мг/мл) колебалось в широких пределах – 17,69–95,89 мкг/мл. Отобраны штаммы, образующие наибольшее количество ИУК (больше среднего показателя – 56,79 мкг/мл). Максимальный выход ИУК был в среднем равен 62,18 мкг/мл для *Pseudomonas aeruginosa*, 86,63 мкг/мл – для *P. putida* и 68,42 мкг/мл – для *P. fluorescens*.

**Введение.** Ризобактерии, стимулирующие рост растений (РСРР), могут воздействовать на них как прямым образом, так и косвенно. Так, образование ими фитогормонов (ауксинов, гиббереллинов, этилена и др.) и сидерофоров относится к числу признаков, непосредственно стимулирующих рост растений. Косвенное же влияние РСРР объясняется выработкой циановой кислоты и антибиотиков, которые подавляют патогенную микрофлору [1].

Индолилуксусная кислота (ИУК) – один из наиболее физиологически активных ауксинов. Она является характерным продуктом метаболизма L-триптофана многих микроорганизмов, в том числе и РСРР [2, 3]. Микроорганизмы, населяющие ризосферу различных растений, синтезируют и высвобождают ауксины в качестве вторичных метаболитов благодаря обилию субстратов, выделяемых корнями [4, 5]. Морфогенетические эффекты растений являются результатом влияния разных соотношений гормонов, продуцируемых как самим растением, так и ризосферными бактериями [6]. Различные почвенные микроорганизмы, включая бактерии [6], грибы [7] и водоросли [8], способны продуцировать физиологически активные количества ауксинов, которые могут оказывать выраженный эффект на рост растений и их закреп-

ление в почве. Например, *Azotobacter paspali* выделял ИУК в культуральную среду и значительно увеличивал сухой вес листьев и корней ряда растений после обработки их корней культуральной жидкостью [9]. Инокуляция проростков пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* увеличивала число и длину боковых корней [10]. Инокуляция семян канолы бактериями *Pseudomonas putida* GR12-2, продуцирующими небольшие количества ИУК, привела к увеличению длины корней проростков в 2–3 раза [11, 12].

В наших экспериментах мы отбирали местные изоляты видов *Pseudomonas* по их способности образовывать ИУК в присутствии триптофана. Основной целью исследований были определение продукции ИУК местными видами флюоресцирующих псевдомонад, изолированных из ризосферы риса, выращенного в трех северных провинциях Ирана, и отбор наилучших штаммов для инокуляции семян риса, что позволило бы увеличить его урожай.

**Материал и методы.** Выделены и идентифицированы местные штаммы флюоресцирующих псевдомонад из ризосферных почв северного Ирана (провинций Мазандаран, Голестан и Гиллан). 111 изолятов видов *Pseudomonas* охарактеризованы с биохимической точки зрения [13]. Для образования ИУК бактериальные культуры вносились в питательный бульон с триптофаном (2 мг/мл) и инкубировались при  $28 \pm 2$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) в течение 72 часов. Затем выросшие культуры центрифугировались в течение 30 мин при 3000 об/мин, 2 мл супернатанта смешивались с 4 мл реагента Зальковского (150 мл серной кислоты, 7,5 мл 0,5М  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 250 мл дистиллированной воды). Развитие розовой окраски указывало на образование ИУК [4]. Оптическая плотность определялась при 535 нм на спектрофотометре. Уровень образуемой ИУК оценивался по стандартной кривой. Отбирались виды, продуцирующие большее количество ИУК – более 56,79 мкг/мл. Повторность опытов четырехкратная. Для сравнения полученных данных пользовались системой MSTATC.

**Результаты и обсуждение.** Все 111 штаммов флюоресцирующих псевдомонад были изолированы из ризосферы риса и предварительно идентифицированы на основании физиолого-биохимических тестов, описанных в руководстве Берги (табл. 1) [14].

Таблица 1

Количество видов флюоресцирующих псевдомонад из разных местообитаний

Провинции	Количество штаммов		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescent</i>
Мазандаран	17	19	15
Голестан	3	6	14
Гиллан	4	12	21
Всего	24	37	50

Бактериальные изоляты были отобраны по их способности продуцировать ИУК. Образованное количество ИУК варьировало в широких пределах – от 17,69 до 95,89 мкг/мл. Данные по образованию ИУК видами ризосферных псевдомонад, изолированных в провинциях Мазандаран, Голестан и Гиллан, представлены в таблицах 2–4 соответственно.

Таблица 2

Образование ИУК флюоресцирующими псевдомонадами, выделенными в Мазандаране (МА)

<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. putida</i>		<i>P. fluorescens</i>	
№ штамма	Образование ИУК, мкг/мл	№ штамма	Образование ИУК, мкг/мл	№ штамма	Образование ИУК, мкг/мл
МА1	25,68	МА1	43,00	МА1	24,06
МА2	21,52	МА2	55,72	МА2	29,40
МА3	58,11	МА3	45,43	МА3	42,8
МА4	30,71	МА4	44,00	МА4	25,58
МА5	56,91	МА5	34,43	МА5	52,58
МА6	39,69	МА6	39,69	МА6	55,00
МА7	44,00	МА7	55,07	МА7	22,71
МА8	52,61	МА8	95,89	МА8	41,61
МА9	43,52	МА9	24,87	МА9	62,41
МА10	30,61	МА10	61,22	МА10	25,58
МА11	33,24	МА11	86,09	МА11	38,26
МА12	28,65	МА12	54,28	МА12	25,58
МА13	40,41	МА13	34,67	МА13	17,69
МА14	25,11	МА14	32,76	МА14	51,65
МА15	58,59	МА15	27,26	МА15	35,63
МА16	34,50	МА16	68,87		
МА17	47,11	МА17	47,83		
		МА18	39,93		
		МА19	35,70		
Среднее	39,47	Среднее	49,50	Среднее	36,70

Таблица 3

Образование ИУК флюоресцирующими псевдомонадами, выделенными в Голестане (ГО)

<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. putida</i>		<i>P. fluorescens</i>	
№ штамма	Образование ИУК, мкг/мл	№ штамма	Образование ИУК, мкг/мл	№ штамма	Образование ИУК, мкг/мл
ГО1	46,63	ГО1	38,02	ГО1	67,20
ГО2	50,69	ГО2	41,85	ГО2	23,19
ГО3	48,54	ГО3	24,15	ГО3	23,92
		ГО4	25,34	ГО4	47,83
		ГО5	35,63	ГО5	43,76
		ГО6	71,74	ГО6	21,52
				ГО7	50,93
				ГО8	65,76
				ГО9	56,20
				ГО10	64,57
				ГО11	61,22
				ГО12	23,95
				ГО13	21,52
				ГО14	66,96
Среднее	48,62	Среднее	39,60	Среднее	45,61

Таблица 4

Образование ИУК флюоресцирующими псевдомонадами, выделенными в Гиллане (GI)

<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. putida</i>		<i>P. fluorescens</i>	
№ штамма	Образование ИУК, мкг/мл	№ штамма	Образование ИУК, мкг/мл	№ штамма	Образование ИУК, мкг/мл
GI1	26,06	GI1	56,91	GI1	24,39
GI2	37,30	GI2	31,08	GI2	36,35
GI3	32,40	GI3	42,09	GI3	28,21
GI4	61,70	GI4	43,28	GI4	66,72
		GI5	22,00	GI5	40,44
		GI6	45,43	GI6	47,83
		GI7	55,24	GI7	27,50
		GI8	29,41	GI8	48,78
		GI9	42,56	GI9	24,39
		GI10	36,58	GI10	22,48
		GI11	48,54	GI11	53,33
		GI12	29,65	GI12	26,30
				GI13	31,32
				GI14	50,93
				GI15	61,22
				GI16	39,80
				GI17	42,56
				GI18	46,39
				GI19	44,96
				GI20	32,60
				GI21	40,65
Среднее	39,37	Среднее	40,23	Среднее	39,84

Количества ИУК, образованные разными видами флюоресцирующих псевдомонад, варьируют в следующих пределах:

– провинция Мазандаран: для *P. aeruginosa* – от 21,52 до 58,59 мкг/мл; для *P. putida* – от 27,26 до 95,85 мкг/мл; для *P. fluorescens* – от 17,69 до 62,41 мкг/мл;

– провинция Голестан: для *P. aeruginosa* – от 46,63 до 50,69 мкг/мл; для *P. putida* – от 24,15 до 71,74 мкг/мл; для *P. fluorescens* – от 21,52 до 67,20 мкг/мл;

– провинция Гиллан: для *P. aeruginosa* – от 26,06 до 61,70 мкг/мл; для *P. putida* – от 22,00 до 56,91 мкг/мл; для *P. fluorescens* – от 22,48 до 66,72 мкг/мл.

После сравнения полученных результатов были отобраны штаммы, продуцирующие наибольшее количество ИУК. Средняя величина образования ИУК получена после четырех опытов.

Итак, основываясь на полученных результатах, мы можем заключить, что между штаммами имеются значительные различия. Максимальные уровни образования ИУК штаммами *P. aeruginosa*, *P. putida* и *P. fluorescens* равнялись 62,18EFG, 86,63A и 68,42BCD соответственно (табл. 5). Количества

ИУК, образуемые различными флюоресцирующими псевдомонадами из разных провинций, не совпадают. Так, в Мазандаране продуктивность видов в нисходящем порядке следующая: *P. putida* > *P. fluorescens* > *P. aeruginosa*; в Гиллане – *P. fluorescens* > *P. aeruginosa* > *P. putida*. Что касается провинции Голестан, то ни один штамм *P. aeruginosa* не превышал средний уровень, а *P. putida* был лучше, чем *P. fluorescens*. Таким образом, штаммы с наивысшей продукцией ИУК для каждой провинции различны: для Мазандарана – MA11p, для Голестана – GO6p и для Гиллана – GI4f.

Таблица 5

Уровень образования ИУК наиболее продуктивными штаммами флюоресцирующих псевдомонад

№ штамма	Средняя величина образования ИУК*, мкг/мл	№ штамма	Средняя величина образования ИУК*, мкг/мл	№ штамма	Средняя величина образования ИУК*, мкг/мл
MA3a	57,53G	MA16p	69,77BC	GO11f	61,85EFG
MA5a	60,29FG	MA9f	63,15DEFG	GO14f	67,00BCDE
MA15a	57,94G	GO6p	72,28B	GI4a	62,18EFG
MA8p	86,63A	GO1f	68,42BCD	GI1p	57,07H
MA10p	61,90EFG	GO8f	65,31CDEF	GI4f	68,32BCD
MA11p	84,48A	GO10f	64,57CDEF	GI15f	63,01DEFG

a – *P. aeruginosa*, p – *P. putida*, f – *P. fluorescens*

\* Заглавные буквы после значений средних величин показывают, что достоверность определялась согласно тесту Дункана ( $p < 0,05$ ) [15].

Полученные показатели высокой продуктивности ИУК сходны с данными, сообщаемыми другими исследователями [12, 16, 17]. Результаты настоящей работы позволяют утверждать, что продуцирующие ИУК бактерии, выделенные из исследуемых почв, могут быть использованы для инокуляции семян риса с целью увеличения его урожайности.

Кафедра микробиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов

Поступила 27.02.2009

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Arshad M., Frankenberger W.T.Jr.** Microbiol. production of plant growth regulators. In: Soil Microbiol. Ecol. Ed. Metting FB Jr. New York: Marcel Dekker Inc., 1992, p. 307–347.
2. **Lynch J.M.** Origin, nature and biological activity of aliphatic substances and growth hormones found in soil. In: Soil Organic Matter and Biological Activity. Eds. Vaughan D. and Malcom R.E. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht, Boston, Lancaster, 1985, p. 151–174.
3. **Frankenberger W.T.Jr., Brunner W.** Soil Soc. Am. J., 1983, v. 47, p. 237–241.
4. **Kampert M., Strzelczyk E., Pokojska A.** Acta Microbiol. Poll., 1975, v. 7, p. 135–143.
5. **Strzelczyk E., Pokojska-Burdziej A.** Plant and Soil, 1984, v. 81, p. 185–194.
6. **Muller M., Deigele C., Ziegler H.** Z. Pflanzenernahar. Bodenkd, 1989, v. 152, p. 247–254.
7. **Stein A., Fortin J.A., Vallee G.** Can. J. Bot., 1990, v. 68, p. 492–498.
8. **Finnie J.F., Van Staden J.** J. Plant Physiol., 1985, v. 120, p. 215–222.
9. **Barea J.M., Brown M.E.** J. Appl. Bacteriol., 1974, v. 37, p. 583–593.

10. Barbieri P., Zanelli T., Galli E. et al. FEMS Microbiol. Lett., 1986, v. 36, p. 87–90.
11. Glick B.R., Brooks H.E., Pasternak J.J. Can. J. Microbiol., 1986, v. 32, p. 145–148.
12. Caron M., Patten C.L., Ghosh S. et al. Effects of plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* GR-122 on the physiology of canolla roots. Plant Growth. Reg. Soci. Am., 22nd proceeding. Ed. Green D.W., July, 1995, p. 18–20.
13. Cappuccino J.C., Sherman N. Microbiology. A Laboratory Manual. New York: Wesley Pub. Co., 1992.
14. Schaad N.W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3<sup>rd</sup> Ed. APS Press, 2001.
15. Duncan D.B. Biometrics, 1955, v. 11, p. 1–42.
16. Frankenberger W.T.Jr., Poth M.L. Soil Biol. Biochem., 1989, v. 20, p. 299–304.
17. Glick B.R. Can. J. Microbiol., 1995, v. 41, p. 109–114.

Մ. Ռ. ՌԱՄԵԶԱՆՊՈՒՐ

ԻՐԱՆԻ ՀՅՈՒՄԻՍԱՅԻՆ ՇՐՋԱՆՆԵՐՈՒՄ ԱՃԵՑՎՈՂ ԲՐՆՁԻ  
ՌԻԶՈՍՖԵՐԱՅԻ ԼՈՒՍԱՐՁԱԿՈՂ ՊՍԵՎՂՈՍՏՈՆԱԳՆԵՐԻ ՏԵՂԱԿԱՆ  
ՇՏԱՄՆԵՐԻ ԿՈՂՄԻՑ ԻՆԴՈԼԻԼՔԱՑԱԽԱԹԹՎԻ ԱՌԱՋԱՅՈՒՄԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Իրանի հյուսիսային երեք տարբեր շրջաններում աճեցվող բրնձի ռիզոսֆերայից ստանդարտ մեթոդներով մեկուսացվել և նույնականացվել են լուսարձակող պսևդոմոնադների 111 շտամներ: Մեկուսացված շտամները տեսաավորվել են ինդոլիլքացախաթթու (ԻԶԹ) առաջացնելու հատկանիշով: Տրիպտոֆանի (2 մգ/մլ) առկայությամբ փորձարկվող շտամներով սինթեզված ԻԶԹ-ի քանակը տատանվում է լայն տիրույթում՝ 17,69–95,89 մկգ/մլ: Ընտրվել են ԻԶԹ-ի առավելագույն քանակություն առաջացնող շտամները (միջին ցուցանիշը (56,79 մկգ/մլ) գերազանցող): ԻԶԹ-ի առավելագույն էլքը *P. aeruginosa* շտամի համար միջինը 62,18 մկգ/մլ է, *P. putida*-ի համար՝ 86,63 մկգ/մլ և *P. fluorescens*-ի համար՝ 68,42 մկգ/մլ:

M. R. RAMEZANPOUR

INDOLE ACETIC ACID PRODUCTION BY THE INDIGENOUS  
ISOLATES OF FLUORESCENT PSEUDOMONADS ASSOCIATED  
WITH RICE RHIZOSPHERE IN NORTH IRAN

Summary

A total of 111 strains of fluorescent pseudomonades were isolated from rice rhizosphere of different locals in the three provinces of North Iran and identified by standard methods. These isolates were tested for the production of indolylacetic acid (IAA). IAA production by studied strains in the presence of tryptophan (2 mg/ml) was recorded within the bounds of 17,69–95,89 mcg/ml. The level of IAA produced was estimated by a standard curve. Species with the largest quantities of IAA production (with rates more than average – 56,79 mcg/ml) were selected. Maximum rates of IAA production on average were 62,18 mcg/ml for *Pseudomonas aeruginosa*, 86,63 mcg/ml for *P. putida* and 68,42 mcg/ml for *P. fluorescens*.