

УДК 576.6: 581.192

Н. П. Черногор, І. В. Жерносекова, О. А. Тимчук, Т. П. Кілочок, А. І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет

ФІТОРЕГУЛЮВАЛЬНІ ТА АДАПТАЦІЙНІ ВЛАСТИВОСТІ БІОПРЕПАРАТІВ В УМОВАХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

Наведено дані про стимулювальну дію комплексного ферментного препарату Г10Х стрептоміцетного походження. Показано, що обробка насіння розчинами препарату збільшує їх схожість і швидкість проростання, позитивно впливає на розвиток проростків, підвищує стійкість до токсичної дії важких металів і активність пероксидази.

This article is devoted to stimulation action of lytic enzyme preparations. The treatment of the plant seeds by these preparations increased their germination and had positive effect on plant development, increased activity of peroxidase and resistance to heavy metal.

Вступ

Початок ХХІ століття характеризується різким погіршенням екологічного стану у зв'язку із значним техногенним забрудненням довкілля, ростом антропогенних навантажень, а також збільшенням інших природних екзогенних і ендогенних факторів, які негативно впливають на біологічні об'єкти. Погіршення навколишнього середовища викликане підвищенням концентрації важких металів, які становлять групу найбільш небезпечних хімічних забруднювачів. Вони негативно впливають на екологічні та біологічні процеси у біоценозах. Збільшення вмісту важких металів у ґрунті спричиняє підвищення їх концентрації в рослинах, викликає патологічні процеси, значно знижує адаптаційні можливості рослинного організму.

В останні роки розроблено нові мікробіологічні препарати, які стимулюють ріст і розвиток рослин. Велика увага приділяється дослідженням ризосферних мікроорганізмів і продуктам їх метаболізму. Відомо, що мікроорганізми синтезують фізіологічно-активні речовини – регулятори та стимулятори росту рослин (фіторегулятори). До фіторегуляторів [2] відносять сполуки, які впливають на життєдіяльність рослин. Їх регуляторна роль проявляється у тому, що вони запускають різноманітні біохімічні реакції в рослинах, а не викликають токсичної дії та не є джерелами живлення. Здатність синтезувати ауксини, гібереліни, цитокініни виявлено серед продуктів метаболізму різних мікроорганізмів [5].

Стрептоміцети – перспективна група мікроорганізмів для отримання оригінальних безпечних і економічно вигідних біопрепаратів-фіторегуляторів. У даний час накопичено великий фактичний матеріал, який свідчить, що метаболіти стрептоміцетного походження здатні суттєво впливати продуктами свого метаболізму на життєдіяльність рослин і підвищувати їх адаптаційну здатність в умовах «антропогенного пресу».

Співробітники кафедри мікробіології та вірусології Дніпропетровського національного університету вивчають ферментний препарат – лізорецифін на основі оригінального продуцента *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* 2435 [1; 4]. Цей препарат вигідно відрізняється від відомих аналогів, рекомендованих як лікувально-профілактичні засоби, тим, що характеризується широким спектром антимікробної дії, яка обумовлена наявністю в його складі комплексу літичних (п'яти ендопептидаз

© Черногор Н. П., Жерносекова І. В., Тимчук О. А., Кілочок Т. П., Вінніков А. І., 2005

209

і двох глікозидаз) і супутніх ферментів (протеази, амілази), а також термостабільного фактора стимуляції росту (глікопептидної природи).

Ефективність препарату залежить від концентрації та терміну його використання. Розроблено спосіб отримання препаратів Г10Х (екстрацелюлярні білки, осажені ацетоном), Г3Х (культуральна рідина, висушена з наповнювачем) у виробничо-промислових умовах. Наявність дослідних партій вищевказаних препаратів дала змогу провести їх дослідження як фітостимуляторів. Об'єктом дослідження було насіння сільськогосподарських рослин: кукурудзи, ячменю, вівса, квасолі.

Матеріал і методи досліджень

Проводились дослідження впливу препарату Г10Х на швидкість пророщування насіння, їх схожість і активність росту проростків і деякі біохімічні показники. У кожному варіанті досліду насіння передчасно обробляли розчинами препарату різної концентрації. Як тести реакції визначали довжину кореневої системи та висоту проростків у динаміці.

Дослідні та контрольні варіанти насіння кукурудзи «Луч–330 МВ» використовували для вивчення компонентного складу альбуміно-глобулінової фракції зернівки методом SDS-електрофорезу в 10 %-ному поліакріламідному гелі, а коріння та проростки – для вивчення активності пероксидази. Виділення альбуміно-глобулінової фракції з подрібненого насіння проводили 0,05 М трис-НСІ буфером *pH* 7,5 з 10 %-ною сахарозою у співвідношенні 1 : 50. Центрифугували при 8000 обертах на хвилину протягом 20 хвилин. Супернатант використовували для SDS-електрофорезу. Білок визначали за методом Бредфорда. Визначення активності пероксидази визначали за методом А. Н. Бояркіна з бензидином [3]. Вимірювання проводили на КФК–2МПІ при $\lambda = 484$ нм через кожні 10 с. Досліджували вплив розчинів важких металів у концентрації 0,001 М Pb^{2+} та 0,001 М Cd^{2+} на ростові показники дослідних рослин.

Результати та їх обговорення

Попередня обробка насіння квасолі різною концентрацією дослідженого препарату Г10Х (табл. 1) збільшує швидкість його проростання. Так, з 30 насінин через 24 години у контролі проросло лише 3, а в різних варіантах досліду – від 6 до 15, що перебуває у прямій залежності від концентрації препарату. Через 48 годин схожість насіння у дослідних варіантах перевищує контроль на 25 %.

Таблиця 1

Вплив різних концентрацій лізоenzимного препарату штаму 2435 (Г10Х) на схожість насіння квасолі та розвиток проростків

Концентрація препарату, %	Схожість насіння, кількість з 30 штук				Стан проростків через 48 годин			
	24 години		48 годин		довжина проростка		бічні відгалуження	
	абс.	Δ %	абс.	Δ , %	см	Δ , %	кількість	довжина, см
0 (контроль)	3	–	12	–	$3,8 \pm 0,5$	–	–	–
0,01	6	100	15	25	$7,8 \pm 0,4$	105	5 ± 1	$0,5 \pm 0,1$
0,10	9	200	15	25	$7,2 \pm 0,6$	89	4 ± 1	$0,4 \pm 0,1$
0,25	9	200	15	25	$4,0 \pm 0,4$	5	початковий розвиток	
0,50	15	400	15	25	$3,8 \pm 0,3$	0	початковий розвиток	

Попередня обробка насіння квасолі 0,01–0,10 %-ними розчинами стимулює також розвиток проростків – їх довжина перевищує контроль на 89–105 %, 48-годинні проростки мають по 4–5 бічних відгалужень, що не спостерігається у контролі.

У досліджах із насінням зернових культур (кукурудза, ячмінь, овес) додатково вивчали вплив препарату на подальший розвиток проростків. Через 10 діб як тестову реакцію рослини на попередню обробку насіння розчинами дослідженого препарату використовували довжину кореневої системи проростків і висоту листової частини (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив різних концентрацій лізоenzимного препарату штаму 2435 (Г10Х) на схожість насіння зернових культур при розвитку їх проростків

Вид рослин	Концентрація препарату, %	Схожість насіння, кількість з 30 штук						Показники росту через 10 діб			
		24 год		48 год		72 год		\bar{x} висота проростків		\bar{x} довжина коренів	
		абс.	Δ , %	абс.	Δ , %	абс.	Δ , %	абс.	Δ , %	абс.	Δ , %
Кукурудза	0 (К)	6	–	12	–	27	–	10,0 ± 1,7	–	21,3 ± 2,2	–
	0,025	8	33	17	42	29	7	10,5 ± 1,5	5	22,0 ± 2,1	3
	0,050	9	50	18	50	30	11	12,0 ± 1,9	20	22,9 ± 2,1	8
	0,100	8	33	17	42	30	11	11,9 ± 1,6	19	22,7 ± 1,8	7
	0,250	7	16	15	25	28	4	11,6 ± 1,6	16	21,8 ± 1,5	2
	0,500	7	16	15	25	28	4	10,8 ± 1,7	8	21,4 ± 2,0	0
Ячмінь	0 (К)	4	–	16	–	25	–	17,5 ± 1,4	–	16,6 ± 1,3	–
	0,010	7	75	20	25	28	12	18,5 ± 1,2	5,7	17,5 ± 1,4	5,4
	0,025	9	125	22	38	29	16	18,8 ± 1,6	7,4	17,7 ± 1,7	6,6
	0,050	8	100	22	38	30	20	19,1 ± 2,0	9,1	17,9 ± 1,7	8,0
	0,100	8	100	21	31	28	12	19,0 ± 1,8	8,8	17,8 ± 1,1	7,2
	0 (К)	7	–	20	–	27	–	11,8 ± 1,2	–	11,4 ± 0,9	–
Овес	0,010	15	114	28	40	29	7	12,1 ± 1,0	2,4	11,8 ± 1,3	3,5
	0,025	15	114	27	35	29	7	13,0 ± 1,4	10,1	12,3 ± 1,2	7,9
	0,050	14	100	28	40	30	11	13,2 ± 1,9	11,9	12,5 ± 1,1	9,7
	0,100	14	100	25	25	27	4	13,2 ± 1,5	11,9	12,4 ± 1,1	9,6

Препарат Г10Х у досліджених концентраціях (0,025–0,50 та 0,01–0,10 %) не справляє негативного впливу на проростання насіння і розвиток проростків зернових культур (див. табл. 2). Попередня обробка насіння кукурудзи вказаними розчинами позитивно впливає на швидкість проростання. Найефективнішим препарат виявляється у концентрації 0,05–0,10 %. У цих варіантах досліджу кількість пророслого насіння кукурудзи через 48 годин перевищує контроль на 42–50 %, через 72 години – на 11 %, схожість насіння досягає 100 %. У цих же концентраціях препарату спостерігається й активація ростових процесів. Так, у 10-добових проростків висота перевищує контроль на 19–20 %, а довжина коренів – на 7–8 %.

Попередня обробка насіння ячменю та вівса розчинами дослідженого препарату також прискорює його проростання та збільшує схожість. Із отриманих даних видно, що найкращою є концентрація препарату 0,025–0,05 %. При замочуванні насіння в цих розчинах через 24 години збільшується кількість пророслого насіння ячменю на 100–125 %, вівса – на 100–114 %, через 48 годин схожість вказаного насіння перевищує контроль на 35–40 %, у 10-добових проростків ячменю висота перевищує контроль на 7,4–9,1 %, довжина коріння – на 6,6–8,0 %, у вівса відповідно – на 10,1–11,9 та 7,9–9,7 %.

Відомо, що під впливом негативних факторів у рослинному організмі відбуваються зміни функціональної активності та переключення енергетичних ресурсів для знешкодження негативних процесів. Внаслідок пошкодження обміну речовин відбувається стимуляція накопичення супероксид аніона та перекису водню.

Змінюється активність деяких ферментів (пероксидази). У зв'язку з цим нами досліджене накопичення пероксидази та характер змін її під впливом ферментного препарату Г10Х та важких металів.

Випробували різні концентрації ферментного препарату Г10Х – 0,04, 0,20, 1,00 мг/мл. Максимальне підвищення активності пероксидази у коренях кукурудзи «Луч 330 МВ» спостерігалось при концентрації ферментного препарату 0,2 мг/мл на п'яту добу, що перевищує активність ферменту в контролі у три рази. Концентрація препарату 0,04 мг/мл викликає підвищення активності пероксидази в 2,8–2,5 раза порівняно з контролем на 5–7-му добу відповідно. При максимальній концентрації ферменту (1 мг/мл) підвищувалась активність пероксидази лише в 1,7–2,0 рази.

Таким чином, активність пероксидази залежить від концентрації ферментного препарату, яким обробляли насіння. Слід зазначити, що ефективність стимулювальної дії ферментного препарату залежить від його складу. Так, нативний препарат, який вміщує літичні ферменти та стимулятор росту, незначно впливає на підвищення активності пероксидази (в 1,3 раза), у той час як термічно оброблений або автоклавований препарат Г10Х, що вміщує тільки термостабільний фактор росту, здатний максимально підвищувати активність пероксидази у 2,3 раза.

Вивчення електрофоретичного спектра легкорозчинних білків насіння кукурудзи під час їх проростання показало, що під впливом ферментного препарату Г10Х змінюються якісні та кількісні характеристики білкового комплексу зернівки кукурудзи. Аналіз альбуміно-глобулінових фракцій насіння кукурудзи показав, що як автоклавований, так і нативний препарат Г10Х впливають на білковий склад зернівки, що проявляється у збільшенні вмісту білка в зонах виявлення визначених компонентів.

Відомо, що Pb^{2+} та Cd^{2+} відносяться до токсичних забруднювачів навколишнього середовища. Токсична дія цих важких металів виявляється у гальмувальній швидкості росту рослин, хлорозі та некрозі тканин. Враховуючи стимулювальну дію ферментного препарату, виявлену у попередніх дослідках на десятидобових проростках кукурудзи «Луч 330 МВ», було цікаво дослідити вплив цього препарату на розвиток проростків кукурудзи в несприятливих умовах росту, а саме в присутності іонів важких металів Pb^{2+} та Cd^{2+} . Для з'ясування цього питання проводили попередню обробку насіння водними розчинами нативного або автоклавованого ферментного препарату Г10Х та подальше його вирощування у водних розчинах 0,001 М Pb^{2+} або 0,001 М Cd^{2+} . Контрольні варіанти (необроблене насіння) вирощували у дистильованій воді.

Отримані результати свідчать про те, що вже на першу–третю добу вирощування рослин у контрольному варіанті спостерігається нормальний ріст проростків, а до складу альбуміно-глобулінової фракції зернівки входить 13 білкових фракцій з різною молекулярною масою (17,8–81,3 кДа). При подальшому вирощуванні кількість білкових зон зменшується до 9, відбувається зміна молекулярної маси виявлених білкових компонентів. Проростки, які були вирощені в присутності 0,001 М Pb^{2+} та 0,001 М Cd^{2+} , характеризувались гальмуванням росту вегетативної маси кореневої системи та інших ростових показників. Вивчення електрофоретичних спектрів таких зразків показало, що до їх складу входить також 13 білкових зон із молекулярною масою, характерною для контрольних варіантів.

Подальше вирощування проростків (до 10 діб) у несприятливих умовах не спричиняє зміни кількості білкових зон і їх молекулярних мас, що буде з'ясовано гальмуванням процесів розпаду білків.

У той же час, вже на п'яту добу в дослідному варіанті з передчасною обробкою насіння автоклавованим ферментним препаратом Г10Х при вирощуванні в

присутності іонів Pb^{2+} кількість білкових зон на електрофореграмі зменшується до 9, а на дев'яту добу – до 6 (зникають зони з M_r 95,5, 74,1, 67,6, 39,8 кДа та ін., що свідчить про гідроліз альбуміно-глобулінової фракції та можливість усунення несприятливої дії Pb^{2+}). Зміни в компонентному складі водорозчинних білків насіння кукурудзи під впливом ферментного препарату та важких металів пов'язані з тим, що ці фракції представлені функціонально активними білками, які змінюють свою активність при стресових ситуаціях.

На наступному етапі досліджень вивчали вплив важких металів на активність пероксидази в коренях проростків кукурудзи. Отримані дані свідчать, що через п'ять днів вирощування проростків у несприятливих умовах важких металів активність пероксидази значно зменшується порівняно з контрольними зразками.

Передчасна обробка автоклавованим препаратом Г10Х дозволила підвищити активність пероксидази в дослідних варіантах зразків з іонами Cd^{2+} в 1,4 раза, а з іонами Pb^{2+} – в 2,0 рази. Таким чином, пророщування насіння у розчинах автоклавованого ферментного препарату Г10Х сприяє стимуляції ростових показників, підвищує активність пероксидази, підвищує стійкість до токсичної дії Pb^{2+} Cd^{2+} .

Висновок

Виявлена нами раніше рістстимулювальна активність автоклавованого препарату Г10Х на мікробних і тваринних об'єктах виявляється і по відношенню до дослідних рослин. Наведені дані являють практичний інтерес у плані можливого використання препарату лізорецифін у рослинництві як стимулятора росту та адаптогена, отриманого на основі високоефективного, оригінального штаму стрептоміцету, який не забруднює довкілля, проявляє високу селективну дію та післядію, економічний і зручний для виробництва.

Бібліографічні посилання

1. **Жерносекова І. В.** Изменчивость продуцента литических ферментов *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* и его селекция. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 2002. – 20 с.
2. **Муромцев Г. С.** Регуляторы роста / Г. С. Муромцев, О. Н. Кулаева. – М.: Наука, 1979. – 215 с.
3. **Пешков Б. П.** Практикум по биохимии растений. – М.: Колос, 1976. – С. 213–215.
4. **Черногор Н. П.** Исследования ростстимулирующих свойств лизоэнзимного препарата *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – К., 1998. – 16 с.
5. **Miller С.** Biochemistry and physiology of plant growth substance – От.: Runge press, 1998. – Р. 33–35.

Надійшла до редколегії 30.10.05.