

Изобретение относится к микробиологической промышленности и может быть использовано для микробиологического синтеза фитогормонов.

Известны продуценты фитогормонов, в частности, цитокининов, которые продуцируются культурами *Pseudomonas savastanoi* (Surico L. Cytokininlike activity in extractes from culture filtrates of *Pseudomonas savastanoi* "Experienta", 1975, 31, 8, P.829 - 930), *Calotrix*, *Nostoc*, *Synechocystis*, *Anabaena* (Романова Н.И. и др. Природные и мутантные штаммы цианобактерий - стимуляторы роста растений, Тезисы конференции "Интродукция микроорганизмов в окружающую среду", 1994, С.87 - 87).

Известен также штамм *Pseudomonas stutzeri* 136 (Мишке И.В., Тевелева М.К. Институт микробиологии им. Августа Кирхнштейна, А.С. СССР №1098279, С 12 N 1/00), синтезирующий фитогормоны только цитокининового типа.

При выращивании штамма *Pseudomonas stutzeri* 136 на агаризованной минеральной среде выход целевого продукта составляет 4,5мкг/г СВ.

Причиной, препятствующей дальнейшему использованию штамма *Pseudomonas stutzeri* 136 для получения фитогормонов, является наряду с низкой биосинтетической активностью, образование им фитогормонов только цитокининового типа.

Задачей изобретения является расширение арсенала продуцентов фитогормонов, прежде всего, способных продуцировать фитогормоны ауксинового типа.

Технический результат от реализации изобретения - увеличение выхода целевого продукта за счет повышенной биосинтетической активности штамма-продуцента и продуцирования фитогормонов ауксинового типа.

Достигается технический результат применением штамма *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 в качестве продуцента фитогормонов ауксинового типа.

Штамм *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 имеет специфические физиологические свойства, обеспечивающие синтез фитогормонов при высокой удельной скорости роста на средах, содержащих сточные воды спиртовых и дрожжевых заводов.

Штамм *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 отобран в производственных условиях Лужанского экспериментального завода при получении микробной биомассы на отходах спиртовой промышленности - послеспиртовой меласной барде.

Отобраный штамм наряду с другими микроорганизмами, применяемыми в спиртовой технологии, а также для очистки и доочистки сточных вод спиртового производства (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Torulopsis pinus*, *Trichosporon cutaneum*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Azomonas species*), а также цианобактерия *Spirulina platensis* исследовали в институте физиологии и генетики растений АН Украины на способность синтезировать регуляторы роста растений (цитокинины и ауксины).

Определение фитогормонов осуществляли с помощью тонкослойной хроматографии и спектроденситометрии. Биотесты проводили на чувствительных культурах (кресс-салат и др.). Результаты исследований приведены в табл. 1.

Таблица 1

| Продуценты | Фитогормоны, мкг/г СВ | | |
|--|-----------------------|---------------------|---------------|
| | Ауксинового типа | Цитокининового типа | |
| | | Зеатин | Зеатинрибозид |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | - | 1,6 | 2,0 |
| <i>Candida utilis</i> Л-35 | - | 1,1 | 0,9 |
| <i>Azomonas species</i> ВКПБ В-4685 | - | - | 1,1 |
| <i>Torulopsis pinus</i> Л-30 | 0,1 | 0,6 | 0,8 |
| <i>Trichosporon cutaneum</i> Л-52 | 0,3 | 1,9 | 1,7 |
| <i>Spirulina platensis</i> | 3,2 | 1,9 | 2,7 |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> ВКПМ В-4145 | 2,7 | 2,9 | 1,3 |
| <i>Pseudomonas alcaligenes</i> ВКПМ В-4684 | 3,5 | 6,1 | 5,5 |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> ВКПМ В-4792 | 13,8 | 31,1 | 51,2 |

Из данных таблицы видно, что наибольшей синтезирующей способностью в отношении как цитокининов, так и ауксинов обладает штамм *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792

Именно это свойство указанного штамма позволило использовать его как продуцент фитогормонов ауксинового типа.

Культурально-морфологическая характеристика

При выращивании в течении 24 часов на жидкой питательной среде (послеспиртовая барда 7% СВ, меласса - 10г/дм³, мочевины - 1,3г/дм³, ортофосфорная кислота - 0,85г/дм³, дрожжевой автолизат - 10г/дм³, рН среды - 7,0), при температуре 34 - 36°С, культура образует подвижные Грамположительные палочки средних размеров, иногда вытянутые в длинные клетки - нити, длина которых превышает ширину более, чем в 25 - 30 раз.

После 48 часов роста при температуре 34 - 36°С на твердой питательной среде - мясопептонном агаре (МПА): мясной бульон, пептон 10г/дм³, агар-агар-20г/дм³ - культура дает штрих желтовато кремового цвета, плоский, со слегка извилистым краем, мелко-бугристой блестящей поверхностью.

Колонии на МПА слегка сферические, с ровным краем, гладкой пористой поверхностью, мягкой консистенции.

Физиолого-биохимическая характеристика

В качестве единственного источника углерода культура ассимилирует глюкоза, трегалозу, L-валин. Не

ассимилирует 2-кетоглюконат, мезоинозит, β-анилин, DL-аргинин.

Рост на среде Эшби отсутствует. Дает хороший рост на среде с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, использует бетаин. Облигатный аэроб.

Культура не разжижает желатин, не вызывает изменения молока, гидролизует крахмал, способна расти при 41°C.

Технологические и продуктивные свойства штамма иллюстрируются следующим примером.

Пример. Штамм *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 хранят на твердой питательной среде следующего состава: послеспиртовая барда - 7% СВ, меласса - 10г/дм³, мочевины - 1,3г/дм³, ортофосфорная кислота - 0,85г/дм³, дрожжевой автолизат - 10г/дм³, агар-агар - 20г/дм³, pH среды - 7,0, а также на мясопептонном агаре и мясопептонном бульоне (МПА, МПБ).

Для размножения культуры используют жидкую питательную среду следующего состава: послеспиртовая барда - 7% СВ, меласса - 10г/дм³, мочевины - 1,3г/дм³, ортофосфорная кислота - 0,85г/дм³, дрожжевой автолизат - 10г/дм³, pH среды - 7,0.

Разведение посевного материала из музейных культур, хранящихся на твердых питательных средах, осуществляют в дальнейшем на жидких средах в колбах на качалке и аппаратах чистой культуры (АЧК).

В качестве питательной среды используют послеспиртовую барду с 7% СВ, обогащенную источниками азота и фосфора (в соответствии с технологическим регламентом). Температура выращивания в АЧК - 37°C.

Процесс выращивания посевного материала прекращают при достижении pH среды 7,5 и накоплении биомассы 40г/дм³ по АСВ. Далее разведение ведут в промышленных ферментерах при тех же параметрах. Полученную массу направляют на выделение фитогормонов. Фитогормоны экстрагируют из культуральной жидкости водно-спиртовым раствором и затем подвергают микрофльтрации. Очищенную фракцию упаривают, высушивают и сухой продукт проверяют на биологическую активность.

Данные по количественному содержанию фитогормонов у штаммов *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ 136 (прототип) и *P. stutzeri* ВКПМ В-4792 представлены в таблице 2

Таблица 2

| Продуценты | Фитогормоны, мкг/г СВ | | |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------|---------------|
| | Ауксинового типа | Цитокининового типа | |
| | ИУК | Зеатин | Зеатинрибозид |
| <i>Pseudomonas stutzeri</i> 136 | - | 1,01 | 3,5 |
| <i>P. stutzeri</i> ВКПМ В-4792 | 13,8 | 31,11 | 51,2 |

Из данных таблицы видно, что применение штамма *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 для получения фитогормонов ауксинового типа с одновременным в 15 - 30 раз повышенным содержанием фитогормонов цитокининового типа является оправданным и высокоэффективным по содержанию продуцируемого им целевого продукта.

Суммарное содержание фитогормонов в штамме *Pseudomonas stutzeri* 136 составляет - 4,5мкг/см³ СВ, а в штамме *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792 - 96,1мкг/см³. Таким образом, указанный штамм бактерий характеризуется повышенным содержанием фитогормонов (в 25 раз по сравнению с прототипом), что дает возможность использовать его в качестве продуцента фитогормонов.

Концентрат фитогормонов, полученный при выращивании штамма *Pseudomonas stutzeri* ВКПМ В-4792, не токсичен и не патогенен для растительных и животных организмов.