



International Journal of Contemporary Scientific and Technical Research

Journal home page:
<https://journal.jbnuu.uz/>



ISOLATION OF AN ELICITOR EFFICIENTLY INFLUENCES THE MAIN BIOCHEMICAL INDICES OF CYNARA SCOLYMUS L.

Sayyora Murodova¹

Muqaddas Sobirova²

Jizzakh branch of the National University of Uzbekistan

KEYWORDS

Elicitor, Cynara scolymus L., fermenter, cultivation, extractor, inoculator, tank, filtrate, technology

ABSTRACT

In recent years, a number of reforms have been carried out in the world for the protection of medicinal plants, the prudent use of natural resources, the creation and processing of plantations where medicinal plants are grown. However, the analyzes show the need to create an additional value chain for the protection of medicinal plants, the creation of their plantations, processing, with special attention paid to the use of bioproducts in these processes.

2181-3884/©2023 in Jizzakh branch of the National University of Uzbekistan.
DOI: 10.5281/zenodo.7871036

This is an open access article under the Attribution 4.0 International(CC BY 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ru>)

¹ Doctor of Biological Sciences, Professor, Jizzakh branch of the National University of Uzbekistan, Jizzakh, Uzbekistan, murodova74@mail.ru

² Candidate of Biological Sciences, Ph.D., Jizzakh branch of the National University of Uzbekistan, Jizzakh, Uzbekistan, sobirovamukaddas83@mail.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭЛИСИТОРА ЭФФЕКТИВНО ВЛИЯЮЩЕГО НА ОСНОВНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ CYNARA SCOLYMUS L.

KALIT SO'ZLAR/

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

Элиситор, Cynara scolymus L., ферментер, культивирование, экстрактор, инокулятор, резервуар, фильтрат, технология

ANNOTATSIYA/АННОТАЦИЯ

В последние годы в мире был проведен ряд реформ для защиты лекарственных растений, разумного использования природных ресурсов, создания и обработки плантаций, на которых выращиваются лекарственные растения. Однако анализы показывают необходимость создания дополнительной цепочки добавленной стоимости охраны лекарственных растений, создание их плантаций, переработки, причем особое внимание уделяется использованию биопродуктов в этих процессах.

ВВЕДЕНИЕ.

Около 50% фармацевтических препаратов, производимых в мире, производится из лекарственного растительного сырья. При выращивании экологически чистых лекарственных растений важно увеличить синтез вторичных метаболитов за счет использования местных биологически активных веществ. В этом направлении ведется большая работа в разных странах мира. Например, использование биопрепаратов в Европе составляет 80%, в США - 50%, а в России — 2%. Среди вторичных метаболитов растений флавоноиды являются центральными полифенольными соединениями, участвующими во многих основных физиологических процессах в онтогенезе растений, защищая растения от множества неблагоприятных факторов окружающей среды: ультрафиолетового света, повышения температуры, ксенобиотиков, бактериальных, вирусных и грибковых инфекций. Широкий спектр биологической активности флавоноидов в составе растений имеет большое значение при производстве препаратов в фармацевтике [1.6].

Лекарственные растения подвергаются ряду биотических и абиотических стрессов окружающей среды, которые отрицательно сказываются на их росте и развитии. Среди различных экологических стрессов засоление, наводнения, тяжелые металлы, засуха, холодный климат, уплотнение почвы, механическое сопротивление и недостаток питательных веществ являются одними из основных факторов абиотического стресса. В условиях стресса некоторые физиологические нарушения в растениях, такие как повышенная продукция этилена, а также регуляция пищевого и гормонального баланса, могут влиять на ростовые и лечебные свойства растений. Использование традиционных подходов к смягчению абиотических стрессов, связанных с лекарственными растениями, не имело большого успеха. Роль PGPR в лекарственных растениях и их влияние на рост и синтез терапевтических

метаболитов в условиях стресса до сих пор неясны [5].

На сегодняшний день существует несколько перспективных экологически чистых и безвредных средств, используемых в защите растений. Среди таких биопрепаратов выделяют индукторы устойчивости к болезням, то есть абиотические и биотические вещества - элиситоры, которые распознаются растением и в ответ на них растение активирует защитные механизмы, в результате чего действие абиотических и биотических стрессов относительно снижены [9]. После того как растение распознает элиситоры, оно активирует систему генов, отвечающих на защитный механизм, и соответственно повышается устойчивость растения. Эти вещества не оказывают вредного воздействия на окружающую среду и организм человека [7].

Внесение в почву бактериальных смесей показывает, что сбалансированное питание растений, улучшение усвоения азота и фосфора, растворимости фосфатов является основным механизмом взаимодействия бактерий и азотфиксации растениями. Наиболее важными бактериями, стимулирующими рост, являются *Azospirillum*, *Azotobacter* и *Pseudomonas*, которые влияют на регуляторы роста растений, особенно на ауксин, гиббереллин и цитокины, в дополнение к биологической фиксации азота и солюбилизации почвенных фосфатов. В литературе упоминается, что *азотобактерии* продуцируют противогрибковые соединения, которые борются с болезнями растений, повышают жизнеспособность и всхожесть проростков и, как следствие, улучшают общий рост растений [4].

Основная роль этих бактерий заключается в следующем: обеспечение растений питательными веществами, стимуляция роста растений, остановка или иммобилизация активности фитопатогенов, улучшение состава почвы, биоаккумуляция неорганических соединений или покрытие микробными организмами. Ризобактерии способствуют росту растений посредством двух механизмов:

1. Прямой механизм (продукция фитогормонов, азотфиксация, растворимость и связывание фосфора)

2. Косвенный механизм (продукция и конкуренция веществ, действующих против антибиотиков и липидных ферментов). *Bacillus subtilis* sp., *Pseudomonas* sp. и *Azospirillum* sp., хорошо изученные как ризосферные колонизирующие микроорганизмы растений [1]. Эти бактерии действуют на корни растений как биологические удобрения и/или антагонисты (биопестициды) и заселяют корень [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалами исследования служили биопрепарат Замин-М на основе местных штаммов бактерий *Bacillus subtilis* СКБ-309, *Bacillus megaterium* СКБ-310 и *Pseudomonas stutzeri* СКБ-308 и его автолизат – «Элиситор», растения артишока колючего (*Cynara scolymus* L.).

Хранение посевного материала

Коллекционные материалы хранились в пробирках, со средой Сабуро (г/л): глюкоза – 20,0, пептон – 10,0, агар – 18,0, вода водопроводная – 1000,0, pH 6,5-7,0.

Аппаратура

Для получения элиситора использован ферментер с барбатерным аэратором (рис. 1). Питательная среда и бактериальная культура подавались в емкость через под-трубки и затем по трубам. Воздух выпускается через капельный отделитель жидкости, установленный на крышке ферментера. Смесь переносили из большого и малого ферментеров в экстрактор. Экстрактор состоит из загрузочной колонны, горизонтального шнека и вертикальной экстракционной колонки. На выходах шнековых валов из крышек экстракторных колонок установлены уплотнения, препятствующие утечке биоматериала. Экстрагент переносится в верхнюю часть экстракционной колонны и движется по ней вниз. Экстрагент пропускают через горизонтальный шnek и загрузочную колонну вместе с извлекаемыми веществами через различные участки экстракта.

Выращивание ризобактерий на питательной среде

Ризобактерии выращивали на модифицированной питательной среде следующего состава (г/л): пептон (H. Media) –10; MgSO₄·7H₂O – 0,3 г/л; глюкоза – 20; K₂HPO₄ – 0,4; NaCl – 3,0; CaCO₃ – 3,0; pH – 6,8; 1000 мл дистиллированной воды. Среду стерилизовали в автоклаве Systec (D-35440 Linden, Германия) при 120 °С в течение 20 мин. В качестве посадочного материала использовали культуры микроорганизмов. Пересев проводили в ламинарном боксе (BSC 120A, EU). Посевной материал выращивали в термостате (ТС 1/80-ЦПУ, Россия) при температуре 28 °С в течение 72 ч. Изготовление посадочного материала для производства осуществляли в лаборатории агробиотехнологии Ташкентского государственного аграрного университета. Культуры инкубировали при 28 °С в течение 48 ч в пептонной среде (10 %), затем добавляли 100 мл ферментационной среды (пептон, глюкоза, кукурузная мука, дрожжевой экстракт, NaCl, CaCO₃, pH – 6,8) в течение 1 сут проводили в колбах Эрленмейера объемом 500 мл.

Способ получения экстракта элиситора и выделения

Для получения элиситорного экстракта ассоциацию ризобактерий, выращенную в течение 3 сут в термостате, автоклавировали в автоклаве для микроорганизмов (D-35440 Linden, Германия) в течение 20 мин при 1 атм 120 °С, автолизат получали фильтрованием.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Уникальные свойства, термолабильность и стерильность микробиологического препарата накладывают дополнительные ограничения на конструктивное производство. По этой причине реагенты, которые обычно используются для химических производств, во многом не подходят для

биотехнологических процессов.

Выделение «Элиситор»а эффективно влияющего на основные биохимические показатели *Cynara scolymus* L.

Цикл ферментации начинали с внесения микроорганизмов в готовую к употреблению среду, включающую в себя все компоненты. В наших экспериментах микроорганизмы добавляли в стерилизованную среду при температуре 28 ± 2 °С. Инактивация источников углерода перед инокуляцией или на разных стадиях ферментации может быть достигнута за счет поддержания определенной оптимальной концентрации инокулюма, которую можно изменять соответственно конкретному микроорганизму. Создание заданного значения pH или полная стерилизация всех питательных веществ и самого бioreактора является важным этапом, и в ходе исследования было использовано значение pH на уровне 6,8–7,0.

Фаза разделения «Элиситор»а первоначально начинается с фазы экстракции инокуляционного материала.

Выращивание посадочного материала происходит в следующие этапы:

1. Получение необходимых культур микроорганизмов из микробиологической лаборатории;
2. Выращивание посадочного материала в малообъёмной посадочной ёмкости (емкость 5 л);
3. Выращивание ризобактерий в инокуляторах большого объёма (емкость 50 л);
4. Сбор культур ризобактерий в небольших ферmentерах (объемом 5 л).
5. Перемещение культуральной жидкости в контейнер для хранения.
6. Экстракция
7. Перемещение биомассы в контейнер для хранения.
8. Измерение в дозаторе
9. Упаковка (рис. 1)
10. Нейтрализация или слив оставшейся жидкости в виде сока [3.6.8].

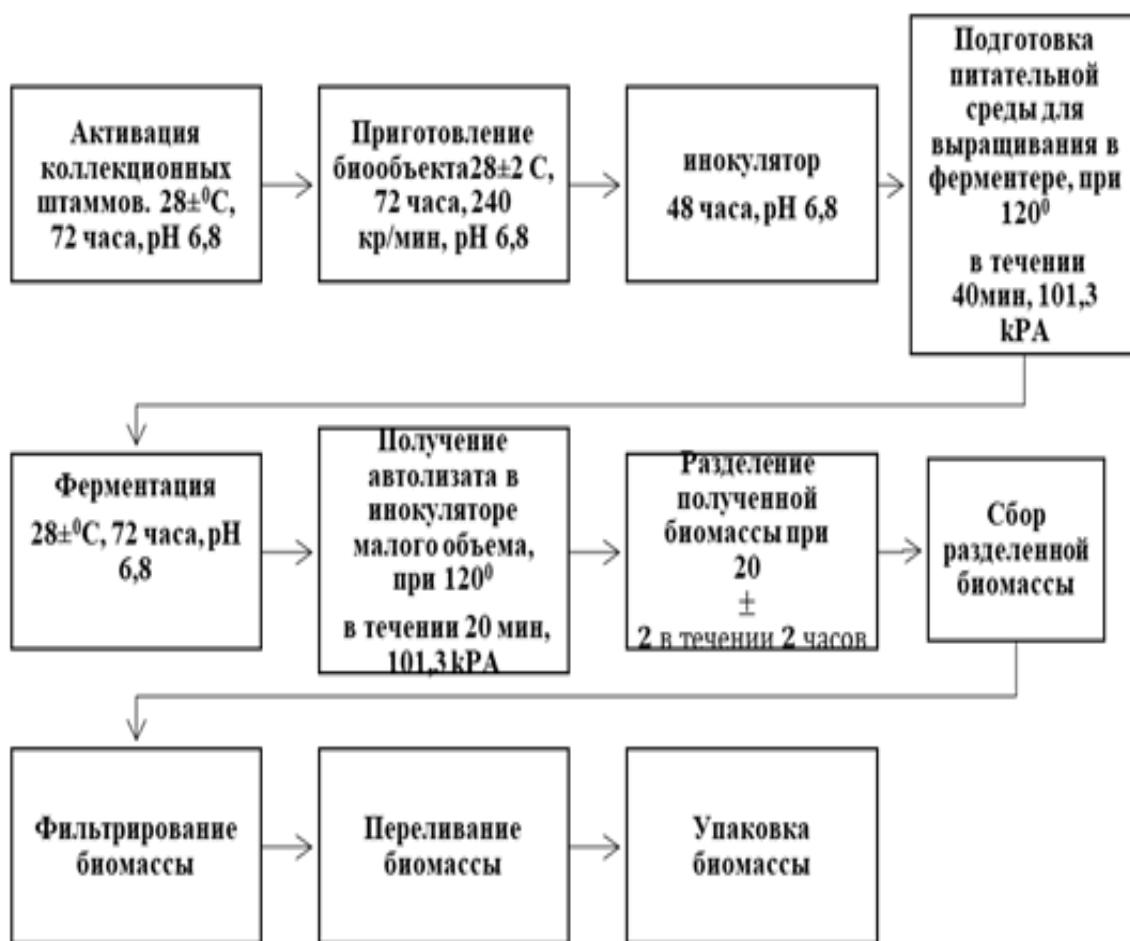


Рисунок 1. Технологическая схема получения биологически активного «Элиситора»

Подготовка посадочного материала в производстве осуществляется в лаборатории. На первом этапе посадочный материал выращивают в микробиологической лаборатории. Первоначально культуру размножали на тестовой, стерильной агаризованной, умеренной питательной среде (pH 6,8–7,0, температура $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, в течение 72 ч) на режимной основе.

Высеянные культуры промывали стерильной чистой водой над приготовленной агаризованной средой (1) в пробирке и перемещали в колбы Эrlenmeyera вместимостью 250-100 мл на жидкую питательную среду и выращивали при температуре $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в течение 72 часов. Колбы помещали в шейкеры в помещении с умеренной температурой (28°C). Скорость роста культур варьировала в зависимости от скорости перемешивания шейкера. Была установлена умеренная скорость перемешивания - 120-240 об/мин. Продолжительность культивирования бактерий на качалках составила 72 часа в соответствии с их физиологическими свойствами.

На этом этапе наблюдали за морфологическими свойствами микроорганизмов. Наилучший результат наблюдался в логарифмической фазе роста культур. На втором этапе приготовленную питательную среду охлаждают до оптимальной для

роста микроорганизмов температуры $28\pm2^{\circ}\text{C}$, 5-8% посевного материала из пробирок переносят в инокулятор с pH 6,8-7,0, температурой $28\pm2^{\circ}\text{C}$, и культивируют в течение 72 часов. В состав посевного оборудования входит смеситель, обеспечивающий аэрацию, а также измерители температуры, pH, уровня пенообразования и других параметров. Объем питательной среды в оборудовании не превышает 60% от общей вместимости оборудования. Количество посевного материала, добавляемого в посевную технику, является одной из основных характеристик. Внесение небольшого количества инокулянта требует большей продолжительности посевного периода, поэтому целесообразно, чтобы количество инокулята составляло 10-12% от общего объема питательной среды.

Соблюдение умеренного режима роста при подготовке посевного материала в оборудовании является ключевым фактором. Для такого мониторинга требуется взятие проб и проведение микробиологического и биохимического анализа. Культивирование продолжали до тех пор, пока количество ризобактерий в питательной среде не составило 1,5%/л (в пересчете на сухую массу). Обычно этот процесс занимает 12 часов.

Третий этап выращивания посевного материала продолжили в инокуляторе объемом 50 л. Для этого, всю культуральную жидкость переносят из малообъемного инокулятора в предварительно стерилизованную среду в большом объеме инокулята. При этом в зависимости от особенностей каждого микроорганизма их количество может быть разным. Если этот процесс осуществляется в фазе экспоненциального роста культуры, то лучше высевать из расчета 10% от объема питательной среды в посадочную технику. Культивирование проводили в течение 12 часов. 4 фаза процесса была продолжена на оборудовании объемом 5 л. Перед этим оборудование было заполнено достаточным количеством питательной среды. В питательной среде рост культуры стимулируют перемешиванием в суспензии, умеренными значениями pH, температуры и непрерывной аэрацией. Накопление биомассы ризобактерий продолжается в течение 12 часов. Суспензию из ферментера переносят в экстрактор и выдерживают при 120°C в течение 20 минут для получения экстракта. Полученный экстракт пропускали через емкость для хранения биомассы и через фильтр с получением фильтрата. Фильтрат подается в дозатор и расфасовывается по 1 л. Остаток, оставшийся в фильтре, можно утилизировать или собрать в специальный контейнер и слить в виде сока. В наших исследованиях на основе общепринятых методов биотехнологических процессов был разработан эскизный прототип технологических процессов, пригодных для микробиологического синтеза элиситора на основе ассоциации ризобактерий.

Для определения эффективности данного биопрепарата были проведены эксперименты в лаборатории и в полевых условиях, а также был проанализирован его химический состав.

Семена растений, инокулированные комплексным биопрепаратором «Замин-М»

и «Элиситор»ом, полученным на основе местных штаммов ризобактерий, были высажены в четырех вариантах в специальные кассеты. Жизнеспособность растений в каждом варианте определяли на 7 и 14 сутки, и результаты записывали. Результаты прорастания семян растений представлены в следующей таблице (Таблица I).

В лабораторных экспериментах наибольшая всхожесть семян колючего артишока была обнаружена у растений, обработанных «Элиситор»ом на основе биопрепарата (95,0%). Этот результат был на 6,0%, выше контроля и на 3,7% выше стандарта. У растений, инокулированных биопрепаратором «Замин-М», всхожесть составила 93,8%, что на 4,8%, выше контроля и на 2,5% выше стандарта.

Таблица I
Влияние биопрепаратов на прорастание семян *Cuparia scolymus L.* в лабораторных условиях

№	Вариант	Всхожесть, %		
		n	7-день	14-день
1	Контроль	5	85,4	89,0
2	Органика-С (стандарт)	5	88,2	91,6
3	Замин-М	7	91,8	93,85
4	Элиситор	7	92,0	95,0

При изучении влияния на растения «Элиситора» на основе ассоциаций ризобактерий по методу, рекомендованному научными сотрудниками Института микробиологии АНРУз использовали полужидкую (1,6%) агаровую среду без других питательных веществ. Удобрение «Органика-С» использовалось в качестве стандарта. Стерильные семена артишока инокулировали супензией 1:100 биопрепарата «Замин-М», полученного на основе ассоциации ризобактерий, и супензией «Элиситора» на основе биопрепарата 1:1000 и высевали по 1 штуке на агар. Неинокулированные семена использовали в качестве контрольного варианта и высевали без каких-либо питательных веществ на полужидкий агар (1,6%). У растений, обработанных элиситором, уже через 3 дня начиналось образование корней. В остальных вариантах процесса корнеобразования не наблюдалось.

Согласно результатам, полученным для колючего артишока, выращенного в пробирках в лаборатории в течение 15 дней, только семена, инокулированные элиситором на полужидком агаре (1,6%), продолжали расти, а другие варианты отставали в росте и развитии (Рисунок 2).



A

B

Рисунок 2. Выращивание колючего артишока на 1,6% агаровой среде с использованием «Элиситор»а. А - контроль; В - растение, выращенное на агаре, обработанное рабочим раствором «Элиситор»а в соотношении 1:1000.

Полевые эксперименты в Джизакском гослесхозе на основе 5 различных вариантов: 1-контроль, 2-раствор «Элиситор»а в соотношении 1:1000, 3- раствор «Элиситор»а в соотношении 1:100, 4-раствор биопрепарата «Замин-М» в соотношении 1:1000, 5-семена, инокулированные раствором биопрепарата «Замин-М» в соотношении 1:100. Необработанные семена использовали в качестве контроля. Результаты исследования всхожести семян во время исследования представлены в таблице II.

**Таблица II
Результаты выращивания артишока колючего в полевых условиях с помощью «Элиситор»а.**

№	Варианты	7 день %	15 день %
1	Контроль	87,5	89,8
2	Элиситор 1:1000	92,3	93,2
3	Элиситор 1:100	90,1	94,6
4	Замин-М 1:1000	89,9	90,1
5	Замин-М 1:100	91,4	92,8

Из таблицы II видно, что обработка биологически активными препаратами оказала положительное влияние на прорастание семян растений. Самый высокий результат был получен у «Элиситор»а при соотношении 1:1000 и 1:100 и превышал контрольные показатели от 3,4% до 4,8%. Аналогичные результаты получены после обработки семян биопрепаратором Замин-М в соотношении 1:1000 и 1:100 - соответственно на 0,3%; на 3,0% выше контроля. Полученные данные свидетельствуют о том, что инокуляция семян минимальной концентрацией

«Элиситор»а позволяет достичь более высокой эффективности, чем другие варианты.

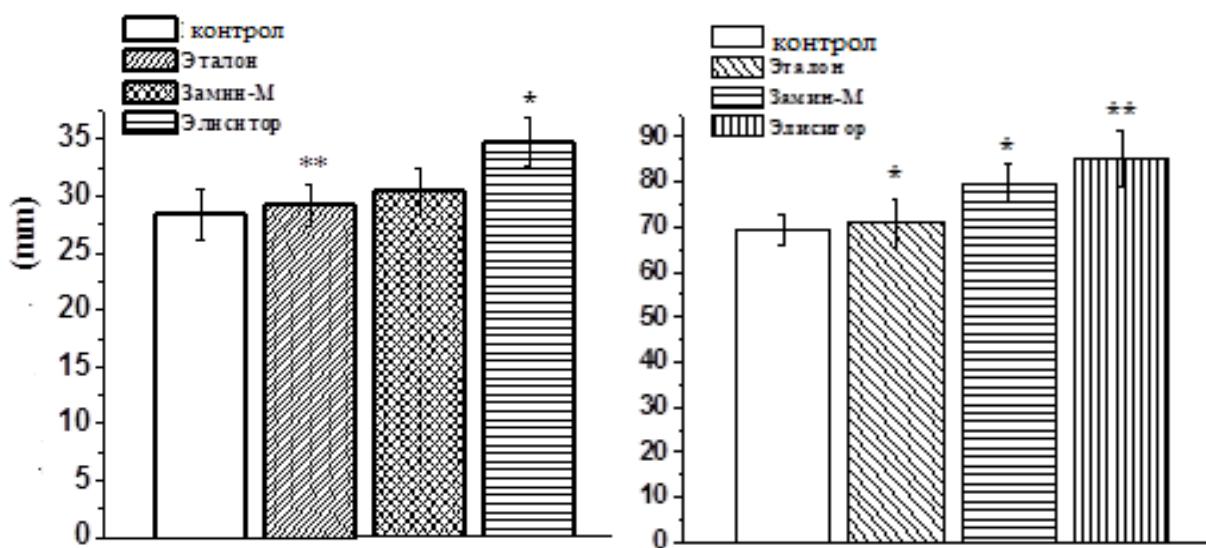


Рисунок 3. Биометрические результаты саженцев колючего артишока, выращенных в лаборатории (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $n=7$).

Как видно из рисунка 3, обработка растения биопрепаратами положительно влияет не только на прорастание, но и на биометрические показатели. Наиболее высокие результаты зафиксированы в длине надземной ($34,71 \pm 1,12$ мм) и подземной ($85,28 \pm 1,35$ мм) частей растений, обработанных «Элиситором». Следующее место заняли результаты обработки растений биопрепаратором «Замин-М»: длина надземной части $-30,42 \pm 1,03$ мм, а подземной - $79,71 \pm 1,21$ мм. У «Органики-С», взятой за эталон, эти значения относительно ниже (надземная часть - $29,2 \pm 1,05$ мм, подземная часть - $70,8 \pm 1,51$ мм).

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о положительном влиянии биопрепарата «Замин-М» и субпродукта «Элиситор» на рост надземной и подземной частей артишока колючего и последующий рост сеянцев.

ВЫВОДЫ

Элиситор получен на основе нескольких этапных манипуляций, таких как получение необходимых культур микроорганизмов из лабораторной коллекции; культивирование посадочного маточного материала в инокуляторе; выращивание ризобактерий в большом ферментере; накопление культур ризобактерий в малом приборе для получения автолизата; охлаждение; экстракция; помещение биомассы в резервуар для хранения; перенос в мерный дозатор; упаковка; нейтрализация остаточной жидкости и слив жидкости в качестве субстрата для биоудобрения. Разработана экономическая эффективность выращивания артишока колючего в различных вариантах на основе ассоциации ризобактерий. Согласно полученным данным, урожайность у растений, обработанных минеральными удобрениями, по сравнению с контролем составила 6 %, в варианте, обработанном «Замином-М» - 13

%, минеральными удобрениями + «Замин-М» - 21 %, а в варианте, обработанном «Элиситором» - 24%. Наибольший урожай по сравнению с контролем наблюдались в вариантах, обработанных биопродуктом «Элиситор».

СНОСКИ

- 1.Chavarria D. N. Response of soil microbial communities to agroecological versus conventional systems of extensive agriculture. //Agriculture, Ecosystems and Environment, -2018.-264, -P.1-8.
2. Das A.J., Kumar M., Kumar R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): an alternative of chemical fertilizer for sustainable, environment friendly agriculture. //Res J Agric Forest Sci. - 2013.-1: -P.21–23
3. Glick B.R. The enhancement of plant growth by free living bacteria. //Can J Microbiol. - 1995.-41: -pp.109–117
4. Hongda Ch., Jochen W., Fereidoon Sh. Emerging technology has shown great potential for delivering bioactive compounds in functional foods to improve human health. // Nanotechnology in Nutraceuticals and Functional Foods. Food Technology. -2006.-03.-06(3): -P.30-36
5. Sher M.Sh., Muhammad S.A., Muhammad A., Muhammad A., Muhammad U.G., Muhammad R., Tahira Y., Muhammad A.Z. Alleviation of Abiotic Stress in Medicinal Plants by PGPR.//Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants. Part II. Alleviation Plant Stress. -2015. – pp. 135-166.
6. Sobirova M. Determination of stimulant properties of local rhizobacteria-based bioproducts against *Cynara scolymus* L.//The American Journal of Agriculture and Biomedical Engineering//. 2022. – 4 (02), p. 26-30.
7. Sobirova M., Murodova S. Effects of bioparaparites on *cynara scolymus* L., micro and macroelements, and quantity of flavonoids // In E3S Web of Conferences//. 2021. Vol. 258.
8. Собирова М., Муродова С. Технология получения элиситора, эффективно влияющего на биологические свойства *Cynara Scolymus* L-M.: Научное обозрение. биологические науки, 2022. №1. с. 68-72 (Sobirova M., Murodova S. Technology for obtaining an elicitor that effectively affects the biological properties of *Cynara Scolymus* L-M.: Scientific Review. biological sciences, 2022. No. 1. c. 68-72.)
9. Филипцова Г.Г. Роль эндогенных пептидных элиситоров в устойчивости растений к биотическим стрессам. //Журнал Белорусского государственного университета. Биология, 2019. №2: с 3-12.(Filiptsova G.G. The role of endogenous peptide elicitors in plant resistance to biotic stresses. //Journal of the Belarusian State University. Biology, 2019. No. 2: pp. 3-12.)