

Н.С. Щеглова\*, О.Я. Карпенко, Т.Я. Покинсьброда\*, В.І. Лубенець, О.В. Швед  
 Національний університет “Львівська політехніка”,  
 кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології,  
 \*Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії  
 ім. Л. М. Литвиненка НАН України

## ГЛІКОЛІПІДНІ ПАР – ЕКОЛОГІЧНО БЕЗПЕЧНІ СТИМУЛЯТОРИ РОСТУ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ РОСЛИН

© Щеглова Н.С., Карпенко О.Я., Покинсьброда Т.Я., Лубенець В.І., Швед О.В., 2007

**Встановлено стимулюючий вплив біогенних поверхнево-активних речовин (ПАР) на енергію проростання (ЕП) і схожість насіння деяких видів сільськогосподарських рослин.**

**A stimulative influence of biogenic surface-active substances (biosurfactants) on germination energy and germination of seeds of some sorts of agricultural plants was determined.**

**Постановка проблеми.** Сучасні технології рослинництва вимагають створення екологічно безпечних регуляторів процесів азотфіксації, фосформобілізації, ефективного використання добрив і засобів захисту рослин. Специфічні властивості біогенних поверхнево-активних речовин (біоПАР), які, на відміну від синтетичних, є біодеградабельними та екологічно безпечними, визначають перспективи їх використання для створення нових і модифікації існуючих препаратів для сільського господарства. Мікробні ПАР завдяки унікальним фізико-хімічним властивостям привертають увагу дослідників під час вирішення проблем сучасної промисловості і сільського господарства. Практичне застосування мікробних ПАР зумовлене їх здатністю істотно знижувати поверхневий і міжфазний натяг водних розчинів, емульгувати гідрофобні речовини, регулювати змочування поверхонь і реологію розчинів. У зв'язку із цим біоПАР можуть бути перспективними як самостійні реагенти, а також для створення комплексних препаратів для рослинництва.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Пошук нових стимуляторів росту сільськогосподарських рослин, які мають високу ефективність, але разом з тим не шкідливі для довкілля і людини, є предметом фундаментальних і прикладних досліджень у різних країнах світу. Біологічно-активні речовини, які утворюються під час інкубування *Bacillus subtilis* на середовищі з гліцерофосфатом не тільки активно діяли на швидкість проростання та схожість насіння різних рослин, але і позитивно впливали на формування проростків [1]. Рістрегулюючу активність виявляють етери тіосульфокислот (у низьких концентраціях) – синтетичні аналоги біологічно активних сполук часнику і цибулі [2, 3]. Серед потенційних стимуляторів росту рослин гідне місце можуть зайняти біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР), біополімери-полісахариди та їх комплекси. БіоПАР у наш час вважаються одними з найперспективніших біотехнологічних продуктів. Відомо, що ПАР впливають на проникність клітинних мембран (бактерій, дріжджів, тварин, рослин тощо) і регулюють мембранний транспорт. БіоПАР мають високу ефективність, підвищують активність ферментів (амілази, протеази, ліпази), є стимуляторами росту [4, 5]. Про актуальність ПАР у процесах азотфіксації свідчить їх присутність у бульбочкових бактеріях та участь у метаболізмі актиноміцетів-азотфіксаторів [6]. Екстрацелюлярні полісахариди і ліпополісахариди, синтезовані симбіотичними азотфіксуючими бактеріями роду *Rhizobium*, впливають на конкурентоспроможність цих бактерій та формування корневих бульбочок на бобовій рослині [7, 8]. Деякі дослідники вказують на кореляцію між конкурентоспроможністю штаму-інокулюму і швидкістю утворення ним корневих бульбочок [8, 9]. Поверхнево-активні речовини широко застосовують у препаратах для живлення та захисту рослин багатьма провідними агрофірмами світу (наприклад, A.I.K. Group. Ink. – Ізраїль). Відомо, що біоПАР покращують структуру ґрунтів, регулюють їх вологість і сприяють рівномірному розподілу добрив і пестицидів у ґрунтах [7]. ПАР як синтетичні, так і біогенні, інтенсифікують мікробіологічну очистку ґрунтів і

води завдяки солубілізації різноманітних гідрофобних забруднювачів [10, 11]. Але синтетичні ПАР слабо деградують у природних умовах, забруднюють довкілля, створюючи загрозу для флори, фауни і людини. Тільки біоПАР при їх високій ефективності є екологічно безпечними і тому перспективними для впровадження у сучасних технологіях сільського господарства.

**Експериментальна частина.** Об'єктом дослідження були штами *Pseudomonas species PS-17* і *PS-47*, виділені із зразків чорноземного ґрунту Львівської області України в лабораторії біотехнології ВФХГК ІнФОВ НАН України. Культивування бактерій проводили в періодичних умовах на круговій качалці (220 об/хв) при  $t = 28^{\circ}\text{C}$  протягом 6 діб у колбах Ерленмейера об'ємом 750 мл, з 150 мл поживного середовища [12].

Культуральну рідину центрифугували 20 хв. при 8 тис. об./хв.

Екстракцію рамноліпідів (RL) проводили сумішшю Фолча (хлороформ:ізопропанол – 2:1) із супернатанту, підкисленого до рН 3,0 з використанням 0,1 н розчину соляної кислоти.

Здатність *Pseudomonas species* мобілізувати важкодоступний органічний фосфор вивчали за допомогою культивування мікроорганізмів на рідкому живильному середовищі [1,13] з гліцерофосфатом кальцію як джерелом фосфору (у нашій модифікації) такого складу(г/л):

NaNO <sub>3</sub>	4,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3
NaCl	0,3
KCl	0,3
Гліцерин	20,0
Гліцерофосфат кальцію	2,46
Цитрат натрію	2,0
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,001
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,001
CaCO <sub>3</sub>	сліди

Іншим об'єктом досліджень було вибрано насіння сільськогосподарських рослин, що культивуються в західному регіоні України: вика озима і яра (сорт Вусата), люпин жовтий, ріпак озимий (сорт Ант), ячмінь ярий (сорт Княжий). Насіння поверхнево стерилізували сумішшю етилового спирту і пероксиду водню (1:1) протягом 5 хв., після чого промивали стерильною дистильованою водою і трохи просушували, потім розкладали в склянки по 100 шт у кожену і додавали по 2 % (відносно маси насіння) розчинів рамноліпідів таких концентрацій: 0,01; 0,5; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 г/л. Оброблене насіння перемішували, витримували 1 год., після чого розкладали у підготовлені лотки із зволоженою ватною підкладкою і гофрованим фільтрувальним папером. Контрольне насіння обробляли аналогічно дистильованою водою. Насіння пророщували в темному місці при кімнатній температурі. Кожної доби підраховували кількість насіння, яке проросло.

Для визначення впливу рамноліпідів на процеси набрякання насіння (швидкість, об'єм) у розчинах різної концентрації використовували методику [14]. У вимірювальні пробірки NS-14 із внутрішнім діаметром 12 мм вносили досліджуване насіння до поділки 50 мм. У кожену пробірку доливали по 10 мл розчину рамноліпідів відповідної концентрації, збовтували та залишали при температурі 20 С. Показники набрякання в мм фіксували кожні 2 год протягом доби.

Для визначення впливу передпосівної обробки насіння на процес набрякання відміряну кількість насіння переносили у склянки та обробляли попередньо розчинами рамноліпідів різної концентрації за вищезгаданою методикою.

**Результати досліджень.** Вивчено вплив біогенних поверхнево-активних речовин (біоПАР) на енергію проростання й схожість насіння деяких видів сільськогосподарських рослин після передпосівної обробки останніх розчинами рамноліпідів. Поверхнево-активні рамноліпіди були виділені з культуральної рідини штаму *Pseudomonas species* під час вирощування на звичайному середовищі і на середовищі з важкодоступним органічним фосфором. Здійснювали передпосівну обробку насіння водними розчинами RL таких концентрацій: 0,01; 0,5; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 г/л. Так, у разі концентрації рамноліпідів 0,05–0,1 г/л кількість проростків вики озимої за першу добу

збільшилася на 7–11%, а вики ярої – на 15–20%. Ті ж концентрації рамноліпідів після обробки насіння ріпаку озимого показали збільшення енергії проростання на 6–17% на першу добу, люпину жовтого – на 7–12%. Залежно від сорту рослини, на другу добу зафіксовано або збільшення енергії проростання на 10–20% або вирівнювання кількості пророщеного насіння щодо контролю (рис. 1)

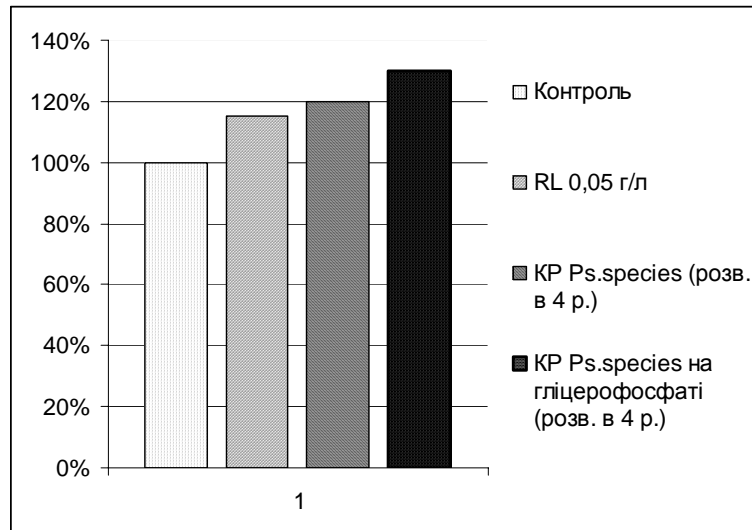


Рис. 1. Вплив RL (0,05 г/л) та культуральної рідини *Ps.species* на стандартному середовищі та на середовищі з гліцерофосфатом кальцію в розведенні 1/3 на енергію проростання ріпаку озимого (сорту Ант)

На третю добу кількість проростків у всіх досліджених варіантах та контролі вирівнюються. Концентрації рамноліпідів 0,05–0,1 г/л були визначені як оптимальні для передпосівної обробки насіння. Вони не тільки активно стимулювали енергію проростання, але й впливали на формування проростків, які візуально були більші, ніж контрольні і по довжині проростка, і по довжині основного кореня. Схожість насіння у всіх варіантах не відрізнялася від контролю. Концентрації ліпідів, нижчі та вищі за оптимальні, менш ефективно впливають на проростання насіння, а у разі концентрацій, вищих за оптимальні (особливо більші за 2,0 г/л рамноліпідів), зростає кількість неправильно сформованих проростків.

Аналогічні результати були отримані під час вивчення впливу рамноліпідів у разі обробки насіння замочуванням у їх розчинах. У разі короточасного замочування (15–20 хв.) у розчинах RL (0,05–0,1 г/л) енергія проростання зростала на 7–15%, подальше збільшення часу обробки (від 1 год і більше) менше впливало на енергію проростання насіння. Під час замочування понад 12 год. спостерігалось інгібування розвитку проростків.

Вивчали також вплив культуральної рідини (супернатанту) *Pseudomonas species* і його розведення на енергію проростання насіння люпину жовтого та ріпаку озимого (сорт Ант). Передпосівна обробка супернатантом інгібує розвиток проростків і знижує енергію проростання, а при розведенні культуральної рідини в 3–4 рази проявляється стимулюючий ефект і енергія проростання зростає на 15–20%, проростки міцніші та більші, ніж контрольні. Впливу на схожість не виявлено.

Встановлено, що досліджені штами здатні рости на середовищі з важкодоступним органічним фосфором, тобто виявляють фосфатазну активність. Показано позитивний вплив передпосівної обробки насіння ріпаку культуральною рідиною *Pseudomonas species*, отриманою на середовищі з гліцерофосфатом кальцію на його проростання. Зафіксовано зростання енергії проростання на 25–30% при розведеннях культуральної рідини в 3–5 разів. Відзначається також збільшення довжини проростка та основного кореня (рис. 2)



Рис. 2. Вплив КР *Pseudomonas* sp. (середовище з гліцерофосфатом кальцію) на ріст ріпаку озимого сорту Ант

Вплив рамноліпідів на енергію проростання злакових рослин вивчали на прикладі передпосівної обробки насіння ячменю ярого (сорт Княжий). Досліджувані концентрації рамноліпідів незначно впливали на швидкість проростання, відмінності від контролю були статистично недостовірними. Відсутність впливу, ймовірно, пов'язана із особливістю будови оболонки насіння злакових рослин.

У такий спосіб показано стимулюючий ефект рамноліпідів на енергію проростання насіння деяких сільськогосподарських рослин при передпосівній обробці насіння їх розчинами.

Для вивчення механізму впливу рамноліпідних ПАР на енергію проростання насіння досліджували набрякання ріпаку озимого (сорт Ант) при його замочуванні у розчинах RL з концентраціями 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 г/л, а також після передпосівної обробки насіння розчинами тих самих концентрацій RL і подальшим замочуванням у дистильованій воді. Результати зображені на графіках (рис. 3, 4)

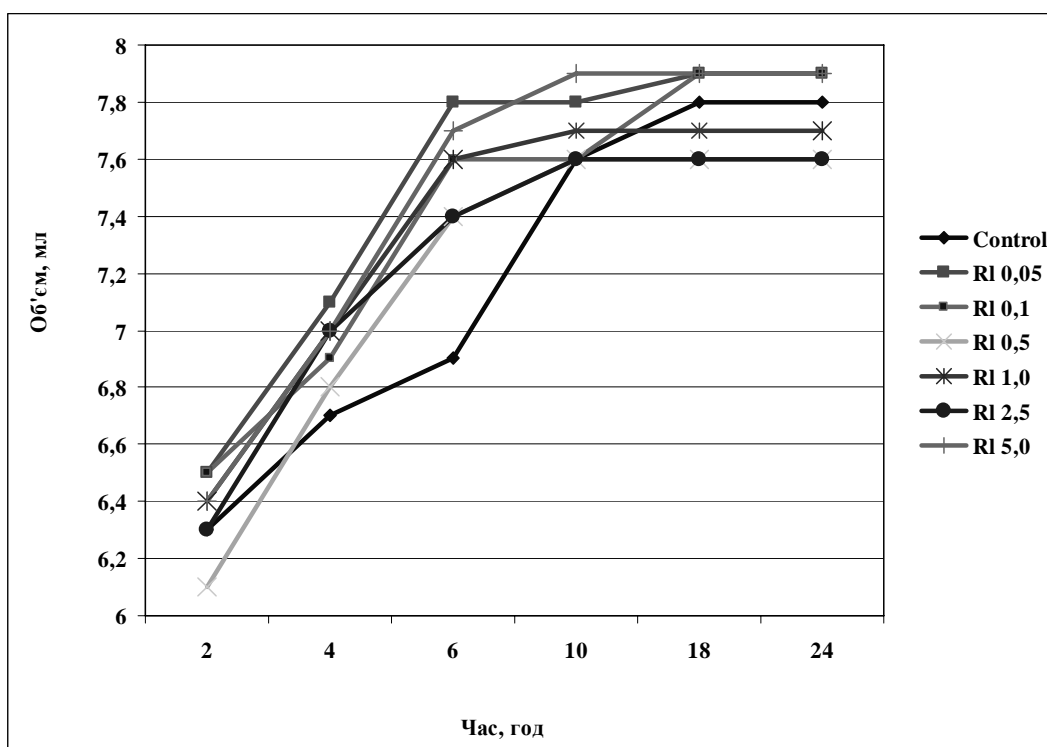


Рис. 3. Вплив рамноліпідів (замочування в розчинах різних концентрацій) на набрякання насіння ріпаку озимого

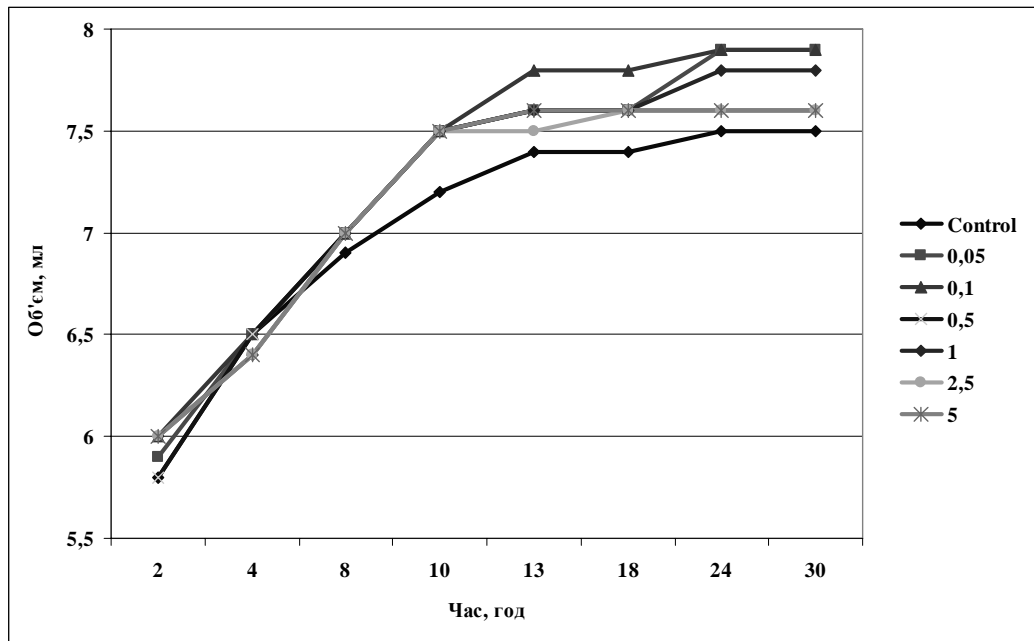


Рис. 3. Вплив рамноліпідів (передпосівна обробка розчинами різних концентрацій) на набрякання насіння ріпаку озимого

Як свідчать отримані результати, обробка насіння вказаними розчинами підвищує швидкість і об'єм набрякання. У зв'язку з цим можна припустити, що передпосівна обробка насіння ріпаку озимого розчинами ліпідів змінює проникність оболонки насіння, внаслідок чого протягом 24 год. прискорюється процес набрякання в усіх досліджуваних варіантах порівняно з контролем. Наприкінці першої доби швидкість набрякання сповільнюється і поступово вирівнюється (рис. 4). Аналогічний ефект спостерігається і при замочуванні насіння у розчинах ліпідів. Імовірно, що один з механізмів збільшення швидкості проростання насіння після передпосівної обробки розчинами RL або культуральною рідиною пов'язаний з впливом рамноліпідів на проникність оболонки насіння і прискоренням процесу його набрякання.

**Висновки.** 1. Встановлено стимулюючий вплив рамноліпідних біоПАР на енергію проростання сільськогосподарських рослин (вика озима і яра, люпин жовтий, ріпак озимий). Під час передпосівної обробки насіння культуральною рідиною бактеріальних штамів *Pseudomonas species* (стандартне середовище) енергія проростання зростала на 15–20%, а на середовищі з важкодоступним органічним фосфором – на 25–30% залежно від сорту рослини. Схожість насіння практично не змінюється.

2. Визначені оптимальні концентрації рамноліпідів для підвищення енергії проростання насіння, які становлять 0,05–0,1 г/л. Застосування розчинів зазначених концентрацій для передпосівної обробки насіння вики озимої і ярої, люпину жовтого, ріпаку озимого збільшує енергію проростання на 10–15%.

3. Виявлена інтенсифікація процесу набрякання насіння (швидкість, об'єм) під впливом передпосівної обробки розчинами рамноліпідів різної концентрації.

Дослідження виконані в межах проекту УНТЦ 3200.

1. Рой А.А., Кистень А.Г., Курдиш І.К. Биологические свойства фосфатмобилизующего штамма *Bacillus subtilis* // Прикладная биохимия и микробиология – 2004. – т.40. – №5. – 550–556.
2. Баранович Д.Б., Комаровська О.З., Лубенець В.І., Новиков В.П. Синтез і біологічна активність S-алкілбензолтіосульфокислот. // Фізіологічно активні речовини. – Харків: НФАУ. – 2001. – №2(30). – С. 33–36.
3. Лубенець В.І. Хімія похідних тіосульфокислот // Автореф. дис. ... д-ра хім. наук. – Львів

2006. – С. 29–30. 4. Galabova D., Tuleva B., Spasova D. Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100 // *Enzyme and Microbial Technology*. – 1996. – Vol. 18. – P. 18–22. 5. Vasileva-Tankova E., Galabova D., Karpenko E. Shulga A.N. Biosurfactants-rhamnolipid effects on yeast cells // *Letters in Applied Microbiology*, 2001, V/33, P/280-284. 6. Benckekroun K., Bonaly R. Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in the presence of surfactants // *Applied and Microbial Biotechnology*. – 1992. – Vol. 36. – P. 673–678. 7. Берендеева Л.Л. Выявление токсичных концентраций СПАВ в поливных водах и биохимическая деятельность почвенных микроорганизмов азотного цикла на фоне этих концентраций // *Миграция загрязняющих веществ в почвах и сопредельных средах (Тр. IV Всес. Совещ. Обнинск, 1983)*. Л.: Гидрометеоздат. – 1985. – С. 192–194. 8. Milner J.L., Araujo R.S., Handelsman J. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide-deficient mutant of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 // *Mol. Microbial.* – 1992. – Vol. 6. – P. 3137–3147. 9. Streeter J.G. Failure of inoculant *Rhizobia* to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation // *Can. J. Microbial.* – 1994. – Vol. 40. – P. 513–522. 10. McDermott T.R., Graham P.H. Competitive ability and efficiency in nodule formation of strains of *Bradyrhizobium japonicum* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – Vol. 56. – P. 3035–3039. Roch F., Alexander M. Biodegradation of hydrophobic compounds in the presence of surfactants // *Environ. Toxicol. Chem.* – 1995. – Vol. 14. – P. 1151–1158. 11. Shulga A., Karpenko E., Vildanova-Martsishin R., Turovsky A., Soltys M. Biosurfactant-enhanced remediation of oil-contaminated environments // *Adsorp. Sci. Technol.* – 2000. – Vol. 18, № 2. – P. 171–176. 12. Karpenko E.V., Shulga A.N., Shcheglova N.S., Elyseev S.A., Vildanova-Martsishin R.I., Turovsky A.A. Surface-active compounds by *Pseudomonas sp. PS-27* // *Microbiol.J.* – 1996. – Vol.58, № 5. – P. 18–24. 13. *Methods of soils microbiology and biochemistry / Zvyagintsev D.G.* // Moscow, 1991, 223. 14. John W. Larsen and Susan Shawver. Solvent Swelling Studies of Two Low-Rank Coals // *Energy & Fuels*. – 1990. – Vol. 4, No. 1. – P. 74–77.

УДК 579.841.222

М.В. Пристай\*, О.В. Карпенко\*, Р.О. Петріна, Т.М. Ногіна\*\*

Національний університет “Львівська політехніка”,

кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології,

\*Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії

ім. Л. М. Литвиненка НАН України

\*\* Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

## ПОШУК НОВИХ ЕФЕКТИВНИХ ПРОДУЦЕНТІВ БІОСУРФАКТАНТІВ І КАРОТИНОЇДІВ СЕРЕД ПРЕДСТАВНИКІВ РОДІВ *RHODOCOCCUS* І *GORDONIA*

© Пристай М.В., Карпенко О.В., Петріна Р.О., Ногіна Т.М., 2007

**Здійснено скринінг штамів актинобактерій родів *Gordonia* і *Rhodococcus* на здатність продукувати поверхнево-активні речовини і каротиноїди під час росту на гідрофільних і гідрофобних субстратах.**

**Screening of actinobacteria strains of the genera *Gordonia* and *Rhodococcus* for ability to produce biosurfactants and carotenoids on hydrophilic and hydrophobic substrates was carried out.**

**Постановка проблеми.** Біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР, біосурфактанти) є одними з найперспективніших продуктів мікробного синтезу. Вони нетоксичні, легко деградуєбельні, екологічно безпечні. Синтез цих речовин можна здійснити на основі дешевих субстратів,