

Н.І. Корецька, В.І. Баранов\*, М.В. Пристай, О.В. Карпенко  
Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України  
\*Львівський національний університет імені Івана Франка

## ВПЛИВ МЕТАБОЛІТІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *RHODOCOCCLUS* НА РОСТОВІ ПОКАЗНИКИ ПРОРОСТКІВ ПШЕНИЦІ

© Корецька Н.І., Баранов В.І.\*, Пристай М.В., Карпенко О.В., 2013

Встановлено стимулювальну дію метаболітів штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1 (клітино-зв'язаних ліпідів, позаклітинних полімерів) на схожість і морфометричні показники проростків пшениці. Показано, що найбільший вплив ці метаболіти мали на кореневу масу проростків, розростання на 30–70 % порівняно з контролем.

Ключові слова: *Rhodococcus*, ліпіди, екзополімери, пшениця озима, схожість, стимуляція росту.

The stimulating effect of metabolites of the *Rhodococcus erythropolis* strain Au-1 (cell-bound lipids, extracellular polymers) on the germination and morphometric characteristics of wheat seedlings was determined. It is shown that the studied metabolites had the greatest impact on the root weight of seedlings, which increased on 30–70 % as compared with control.

Key words: *Rhodococcus*, lipids, exopolymers, winter wheat, germination, growth stimulation.

**Вступ.** Перспективним напрямом біотехнології є мікробний синтез поверхнево-активних речовин (біоПАР), які завдяки своїм фізико-хімічним та біологічним властивостям знаходять широке застосування у промисловості, сільському господарстві, захисті довкілля тощо.

Серед активних продуцентів біоПАР заслуговують на увагу актинобактерії родів *Rhodococcus* та *Gordonia*, що здатні синтезувати асоційовані з клітиною ліпіди, основними компонентами яких є трегалозоліпідні ПАР з високою поверхневою активністю та позаклітинні полімери з емульгувальними властивостями [1–3]. Практичне значення має потенційна фітостимулювальна активність гліколіпідів та екзополімерів мікробного походження [4, 5]. Зокрема екзополімери підвищують стійкість рослин до фітопатогенів та стресових умов [6, 7]. Наведені дані вказують на актуальність розроблення ефективних препаратів на основі метаболітів бактерій роду *Rhodococcus* та пошуку нових сфер їх застосування.

**Мета роботи.** Метою роботи було дослідження впливу клітино-зв'язаних ліпідів і позаклітинних полімерів штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1 на схожість та морфометричні показники важливої злакової культури – пшениці.

**Матеріали та методи.** Об'єктами досліджень були клітино-зв'язані ліпіди, екзополімери та супернатант культуральної рідини (СКР) штаму *R. erythropolis* Au-1, культивованого на поживних середовищах з різними джерелами вуглецю. Мікроорганізми вирощували у колбах Ерленмейера (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за температури 28–30 °C впродовж 5 діб на середовищі Гудвіна [8]. Як джерела вуглецю використовували сахарозу, гліцерин та гексадекан (2 % мас.). Клітини відділяли шляхом центрифугування при 6000g протягом 15 хв. Поверхневий натяг СКР визначали за методом Дю-Нуї [9] на тензіометрі KRÜSS K6 ("KRÜSS" GmbH, Germany). Для визначення емульгувальної активності 10 мл супернатанту перемішували з

10 мл вазелінової оливи впродовж 2 хв., суміш переносили у вимірвальну пробірку NS-14, індекс емульгування ( $E_{24}$ ) визначали через 24 год. як відношення висоти емульсійного шару до загальної висоти рідини у пробірці [10].

Ліпіди екстрагували з клітинної маси сумішшю Фолча (хлороформ-метанол 2:1) [11], екстракт випарювали у вакуумі до постійної маси.

Екзополімери осаджували із СКР двома об'ємами 96 %-го етанолу, витримували за температури 4 °С [12]. Осад відділяли центрифугуванням (5000 об/хв, 30 хв.), промивали, фільтрували та висушували до постійної маси (60°C).

У дослідах із визначення впливу отриманих метаболітів на рослини використовували насіння пшениці м'якої озимої сорту Золотоколоса (*Triticum aestivum*). Відібране насіння замочували на 1 год. у розчинах досліджуваних речовин (ліпіди та екзополімери – за концентрації 0,05 г/л, СКР – за розбавень 1:10, 1:20, 1:50), контроль – дистильована вода. У чашки Петрі на зволожений фільтрувальний папір розкладали по 20 оброблених насінин та поміщали у термостат (20 °С). Повторність трикратна. На 7-му добу визначали лабораторну схожість насіння [13] та морфометричні показники проростків пшениці.

**Результати та їх обговорення.** Встановлено, що штам *R. erythropolis* Au-1 здатний рости на поживних середовищах як з водорозчинними (сахароза, гліцерин), так і водонерозчинними (гексадекан) джерелами вуглецю, при цьому відзначено специфіку синтезу метаболітів залежно від природи субстрату. Високі значення біомаси (АСБ) спостерігалися при використанні середовища з гексадеканом – до 12 г/л; кількість АСБ при вирощуванні культури на середовищах з гліцерином та сахарозою була значно нижчою – до 3,9 г/л та 3,5 г/л відповідно. Залежно від природи вуглецевого субстрату змінювались також поверхневий натяг, емульгувальна активність СКР, а також вміст екзополімерів (табл. 1).

Таблиця 1

**Фізико-хімічні характеристики супернатантів КР штаму *R. erythropolis* Au-1, отриманих на середовищах з різними джерелами вуглецю**

Джерело вуглецю	Поверхневий натяг, н/м	$E_{24}$ , %	ЕП, г/л
Сахароза	53,0±0,1	45,0±0,6	7,47±0,4
Гексадекан	38.5±0,1	5,0±0,1	2,09±0,1
Гліцерин	54,0±0,1	50,0±1,0	7,21±0,4

Примітки:  $E_{24}$  – індекс емульгування; ЕП – концентрація екзополімерів.

При використанні гексадекану як джерела вуглецю супернатанг КР характеризувався вищою поверхневою активністю, проте емульгувальна здатність була меншою (індекс емульгування  $E_{24} = 5$  %). При культивуванні штаму на поживних середовищах із сахарозою і гліцерином емульгувальна активність була значно вищою –  $E_{24}$  становив відповідно 45 % і 50 %.

Було досліджено вплив розчинів СКР, клітино-зв'язаних ліпідів (ТЛ) та екзополімерів (ЕП) штаму *R. erythropolis* Au-1 на схожість та морфометричні показники проростків важливої злакової рослини – пшениці. Показано, що при обробленні насіння розчинами ЕП і ТЛ його лабораторна схожість зростала з 83,75% (контроль) до відповідно 90 % та 95 %. Використання розчинів СКР, отриманих на середовищах з різними вуглецевими субстратами, також сприяло підвищенню схожості насіння до 100 % (рис. 1).

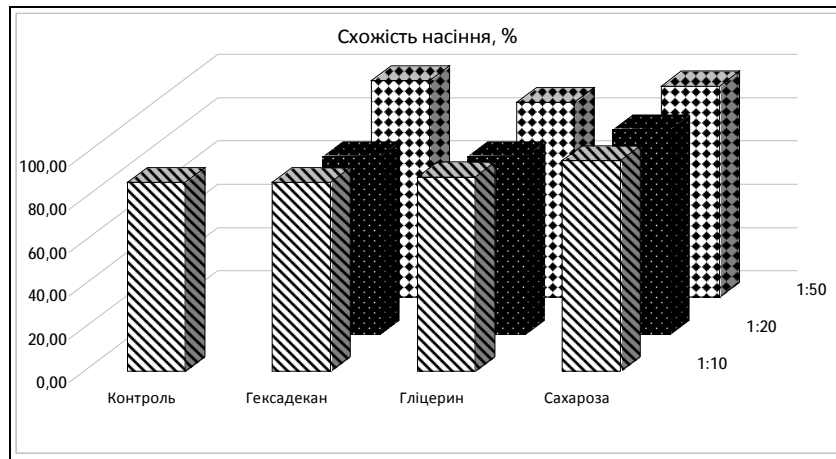


Рис. 1. Вплив СКР штаму *R. erythropolis* Au-1, отриманих на середовищах з гексадеканом, гліцерином та сахарозою, на лабораторну схожість насіння пшениці озимої сорту Золотоколоса

Оброблення насіння пшениці розчинами ліпідів та СКР більшою мірою сприяло зростанню кореневої маси проростків – 36–70 % порівняно з контролем, вплив ЕП був значно меншим – у середньому на 15 %. Маса пагонів при обробленні насіння досліджуваними розчинами зростала на 10–38 % відносно контролю (рис. 2).

Довжина проростків також зростала під впливом метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1, але меншою мірою: довжина кореня – на 5–23 %, пагона – на 9–25 % порівняно з контролем (рис. 3).

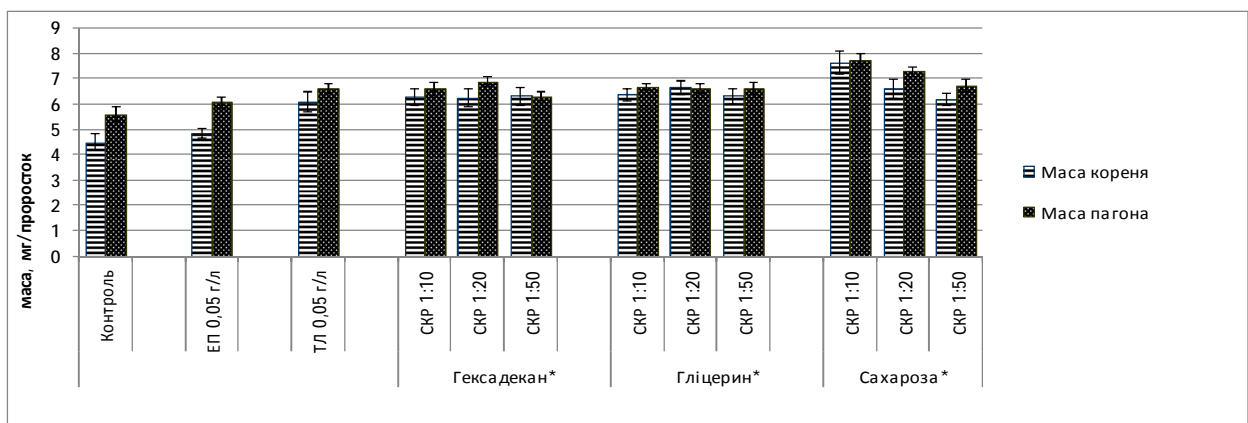


Рис. 2. Вплив метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 на масу кореня та пагона проростків пшениці  
\* – джерело вуглецю у поживному середовищі; ЕП – розчин екзополімерів; ТЛ – розчин ліпідів

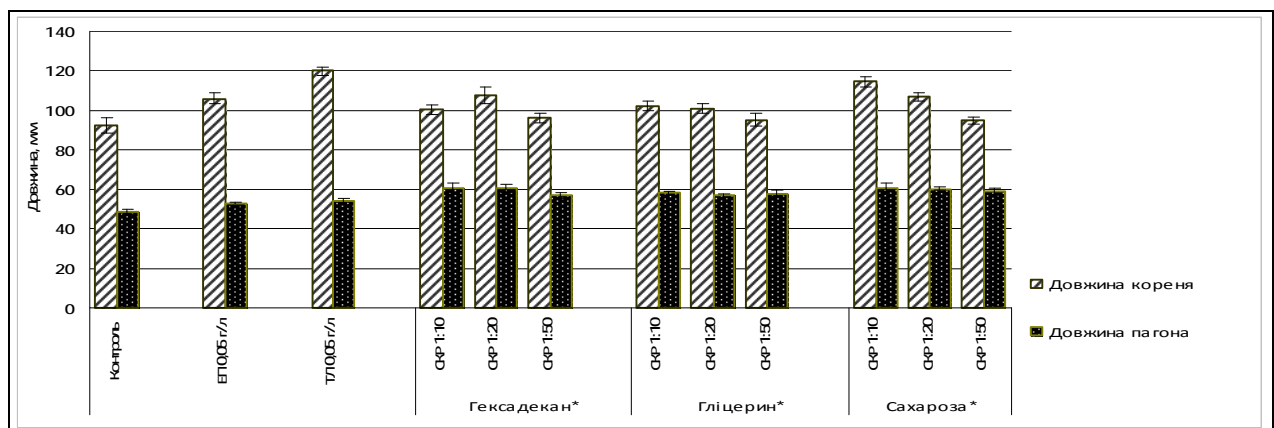


Рис. 3. Вплив метаболітів штаму *R. erythropolis* Au-1 на довжину кореня та пагона проростків  
\* – джерело вуглецю у поживному середовищі; ЕП – розчин екзополімерів; ТЛ – розчин ліпідів

Встановлено, що стимулювальна дія супернатантів КР залежала від джерела вуглецю, використаного при культивуванні штаму *R. erythropolis* Au-1. Найбільш ефективними були СКР, отримані на поживному середовищі зі сахарозою, які під час оброблення насіння пшениці сприяли зростанню маси пагона у середньому на 38 %, кореня – на 70 % відносно контролю (рис. 4).

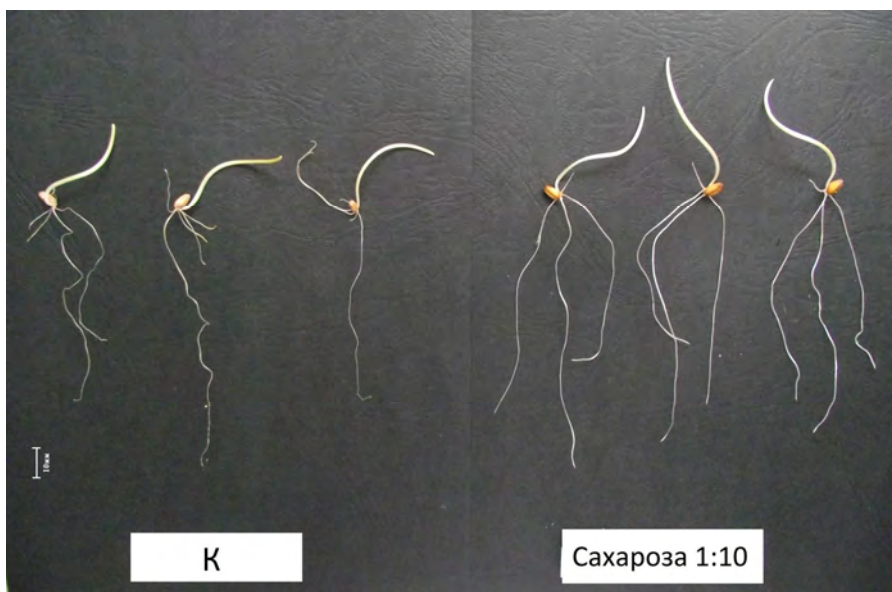


Рис. 4. Вплив СКР штаму *R. erythropolis* Au-1, отриманого на середовищі з сахарозою, на морфометричні показники проростків пшениці

Показано, що під час оброблення насіння розчином СКР, отриманим на поживному середовищі з сахарозою, проростки пшениці були візуально крупнішими, ніж у контролі, зокрема, коріння було більше розгалуженим (рис.4). Такий ефект досліджених речовин має практичне значення, оскільки розвинена коренева система проростків у подальшому сприяє кращому поглинанню елементів живлення із ґрунту, що дасть змогу підвищити продуктивність рослин.

**Висновки:** 1. Встановлено, що метаболіти штаму *R. erythropolis* Au-1 (СКР, ЕП, клітинозв'язані ліпіди) за передпосівного оброблення насіння пшениці сприяли збільшенню схожості від 83,5 % (контроль) до 100 %.

2. Найбільший вплив досліджених метаболітів спостерігався на кореневу масу проростків – при обробленні насіння розчинами СКР вона зростала на 40–70 % порівняно з контролем, при обробленні розчинами ліпідів та екзополімерів – у середньому на відповідно 36 % та 8 %. Маса пагона зростала на 10–25 % відносно контролю.

3. Отримані результати свідчать, що метаболіти штаму *R. erythropolis* Au-1 можна рекомендувати для розроблення ефективних рістрегулювальних препаратів для рослинництва.

1. Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Smyth T.J.P., Banat I.M. Production and Applications of Trehalose Lipid Biosurfactants // *European Journal of Lipid Science and Technology*. – 2010. – Vol.6. – P. 617–627. 2. Карпенко О.В., Пристай М.В., Гафійчук Г.В., Дацко Б.Й. Оптимізація біосинтезу сурфактантів і екзополімерів штамом *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 із використанням математичних методів // *Біотехнологія*. – 2011. – Т.4, №5. – С. 39–44. 3. Banat I.M, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R. Microbial biosurfactants: production, applications and future potential // *Applied Microbiology and Biotechnology* – 2010. – Vol.87. – P. 427 – 444. 4. Щеглова Н.С., Карпенко Е.В., Вильданова Р.И., Лисова Н.Е., Баранов В.И. Влияние биогенных поверхностно-активных веществ на рост бобовых растений // *Матеріали междунар. конф. “Радостим”*, – Краснодар. – 2010 – С. 47–48. 5. Чугункова Т. В., Коваленко О. Г. Вплив

дріжджового манану на проростання насіння м'якої озимої пшениці // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2009. – Т. 7, № 1. – С. 108–113. 6. Воцелко С. К., Литвинчук О.О., Данкевич Н.А., Патица В.П. ЕПАА – універсальний біологічний прилипач пестицидів і регуляторів росту рослин // Збірник матеріалів II-го всеукраїнського з'їзду екологів. – 2010. 7. Підгорський В.С., Коваленко О.Г., Васильєв В.М., Ісакова О.В. Використання кормових та пекарських дріжджів для отримання біологічно активних гліканів // Біотехнологія. – 2010. – Т.3, № 6. – С. 49–58. 8. Донець А.Т., Кошелев В.В., Бехтерева М.Н. Качественное и количественное содержание липидов у бактерий // Микробиология. – 1970. – Т.24. – №.2. – С. 300 – 304. 9. Ni, Q. Chen, H. Ruan Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* // Journal of Zhejiang University Science. – 2007. – Vol.8, №5. – P. 365 – 370. 10. Кучер Р. В., Лесик О. Ю, Карпенко О. В. Емульгування вуглеводнів – нова властивість культури дріжджів *Phaffia rhodozyma* // Доп. АН УРСР. Сер.Б. Геол., хім. та біол. науки. – 1990. – № 8. – С. 49–53. 11. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. of Biological Chemistry. – 1957.-№ 226.-P. 497-509. 12. Williams A.G., Wimpenny Y.W. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in bat culture // Journal of Biological Chemistry. – 1977. – Vol.102. – P.12 – 21. 13. ДСТУ 4138-2002. Насіння сільськогосподарських культур. Методи визначення якості. Чинний від 2004-01-01. Київ. Держспоживстандарт України. – 2003. – 173 с.