

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ МЕТАБОЛІТІВ *Rhodococcus erythropolis* Au-1 ТА ЇХ ПЕРСПЕКТИВИ ДЛЯ РОСЛИННИЦТВА

Н.І. Корецька^{1*}, О.В. Карпенко¹, В.І. Баранов², В.І. Лубенець³, Т.М. Ногіна⁴

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України, Львів, Україна

²Львівський національний університет ім. Івана Франка, Львів, Україна

³Національний університет "Львівська політехніка", Львів, Україна

⁴Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, Україна

*Corresponding author: natalya.koretska@gmail.com

Received 05 April 2019; Accepted 22 April 2019

Проблематика. Мікробні поверхнево-активні речовини трегалозоліпідної природи (ТПАР) є перспективними продуктами біотехнології для різних галузей сучасної промисловості та сільського господарства. Для створення ефективних екологічно безпечних агропрепаратів актуальним завданням є вивчення властивостей біогенних ПАР і механізмів їх впливу на рослини та мікроорганізми.

Мета. Дослідити біологічні властивості ТПАР – метаболітів штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1 – та можливі шляхи їх використання у рослинництві.

Методика реалізації. Штам культивували на модифікованому середовищі Гудвіна, ТПАР екстрагували з виділеної біомаси сумішшю Фолча. Дію ТПАР на проникність клітинних мембран тестових мікроорганізмів-фітопатогенів вивчали за кількістю вивільненого з клітин білка (методом Бредфорд), а чисельність життєздатних клітин – методом серійних розведень. Вплив ТПАР на активність біоцидів щодо тестових бактерій оцінювали за мінімальною інгібувальною (МІК) і бактерицидною концентраціями (МБК) препаратів, а на гриби – за зонами затримки росту на агаризованому середовищі. Дію ТПАР на активність фітогормона індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) визначали у біотестах на відрізках колеоптилів пшениці та на ризогенез живців квасолі. Вплив метаболітів *R. erythropolis* Au-1 на ріст рослин (за передпосівного оброблення насіння) визначали за морфометричними показниками пшениці та сої в лабораторних, вегетаційних і дрібноділянкових експериментах. Здатність штаму *R. erythropolis* Au-1 до синтезу фітогормонів-ауксинів визначали за їх наявністю у супернатанті культуральної рідини (реакція Сальковського).

Результати. Встановлено, що ТПАР штаму *R. erythropolis* Au-1 сприяють підвищенню проникності клітинних мембран мікроорганізмів-фітопатогенів (зі збереженням життєздатності клітин). Встановлено, що ТПАР підсилюють антимікробну активність біоцидів-тіосульфонатів: МІК і МБК у композиціях біоцидів з ТПАР знижувались на 20–50 % (для тестових бактерій), а зони затримки росту фітопатогенних грибів зростали в середньому на 53 %. Встановлено, що ТПАР підсилювали дію ІОК: використання ІОК у композиції з ТПАР дає змогу зменшити діючу концентрацію фітогормона в 10 разів. Встановлено стимулювальну дію метаболітів *R. erythropolis* УКМ Au-1 на ріст сої та пшениці: передпосівна обробка насіння розчинами ТПАР сприяла проросту довжини коренів і пагонів проростків на 29–37 %, а їх маси – на 20–31 % відносно контролю. Супернатант культуральної рідини був ефективнішим: приріст довжини кореня та пагона становив відповідно 58 та 24 % відносно контролю, що можна пояснити наявністю в його складі біологічно активних речовин, зокрема фітогормонів ауксинової природи.

Висновки. ТПАР завдяки впливу на проникність клітинних мембран здатні підвищувати ефективність біоцидів і ристрегуляторів, а також стимулювати ріст рослин. Отримані результати є перспективними для розробки ефективних та екологічно безпечних препаратів для сучасного рослинництва.

Ключові слова: трегалозоліпідні поверхнево-активні речовини; *Rhodococcus erythropolis*; проникність клітинних мембран; антимікробна активність; регулятори росту рослин.

Вступ

У наш час екологічно безпечні продукти біотехнології вважаються перспективними для застосування в промисловості, сільському господарстві, медицині як альтернатива препаратам синтетичного походження [1–3]. Серед таких

продуктів важливе місце посідають біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР), оскільки вони мають унікальні фізико-хімічні та біологічні властивості, що поєднуються з біодеградельністю і низькою токсичністю [1, 4]. БіоПАР рекомендують для застосування у фармацевтичній, косметичній, харчовій промисловості, при

ремедіації довкілля, також досліджується можливість їх використання для вирішення низки проблем рослинництва [4, 5]. Проте в сучасних агротехнологіях ще активно використовуються хімічні пестициди для знищення збудників захворювань рослин, добрива для підвищення родючості ґрунту та синтетичні ПАР в агрохімічних композиціях [6]. Незважаючи на важливу роль цих препаратів, вони мають низку недоліків, основним із яких є негативний вплив на довкілля та людину, зокрема через накопичення в рослинах, ґрунті й воді [6, 7]. З огляду на сказане розробка екологічно безпечних біодеградабельних і водночас ефективних агропрепаратів на основі біоПАР є важливим завданням сучасної біотехнології.

Так, розглядають перспективи використання біоПАР в агропромисловості для покращення якості ґрунту (зокрема, для прискорення біодеградації пестицидів), для біоконтролю фітопатогенів і для підвищення ефективності взаємодії в системі “мікроорганізм–рослина” [8]. На ринку агропрепаратів доступні перші біопестициди на основі біоПАР: препарат Serenade – фунгіцид компанії AgraQuest Inc, США, на основі ліпопептидів – продуктів синтезу штаму *Bacillus subtilis* QST 713 [9]; препарат Zonix – фунгіцид компанії Jeneil Biotech Inc, США, на основі рамноліпідів [10]. Також у США запатентовано способи застосування препаратів на основі рамноліпідів та їх продуцентів для боротьби зі шкідниками у різних сферах сільського господарства [11, 12].

За таких умов дослідження можливостей використання мікробних ПАР трегалозоліпідної природи у рослинництві є дійсно актуальним. У зв'язку з цим метою роботи є вивчення впливу трегалозоліпідних поверхнево-активних речовин (ТПАР) на біологічні об'єкти та можливості їх використання у рослинництві.

Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були трегалозоліпідні поверхнево-активні продукти біосинтезу штаму *Rhodococcus erythropolis* Au-1 з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології (ІМВ) ім. Д.К. Заболотного НАН України (*Rhodococcus erythropolis* УКМ Ас-603). Культивування мікроорганізмів проводили в колбах Ерленмейера (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за

температури 28–30 °С упродовж 5 діб на модифікованому середовищі Гудвіна такого складу (г/л): NaNO_3 – 3,0; дріжджовий екстракт – 1,0; K_2HPO_4 – 2,0; KH_2PO_4 – 2,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; цитрат натрію – 1,0 (рН 6,8–7,0) [13]. Як джерело вуглецю використовували гексадекан (2% мас.) – для отримання ТПАР або сахарозу – для одержання супернатанту культуральної рідини (для обробки насіння рослин).

Клітини бактерій відділяли від культуральної рідини центрифугуванням (6000 об/хв, 20 хв), осад клітин промивали дистильованою водою, якщо бактерії вирощували на сахарозі, або гексаном – для видалення залишкового гексадекану та сушили за 102 °С. Біомасу бактерій визначали гравіметричним методом на лабораторних вагах AXIS AN 100.

Трегалозоліпід екстрагували з біомаси сумішшю Фолча (хлороформ–метанол 2:1), екстракт випарювали під вакуумом до постійної маси [14].

Екзополісахаридний комплекс (ЕПК) виділяли осадженням із супернатанту культуральної рідини (СКР) при додаванні 2 об'ємів етанолу з подальшим переосадженням та висушуванням осаду за 80 °С до постійної маси [15].

Вплив ТПАР на проникність клітинних мембран тест-культур–фітопатогенних бактерій *Agrobacterium tumefaciens* і *Pseudomonas syringae* (з Української колекції мікроорганізмів ІМВ НАНУ) оцінювали за зміною кількості позаклітинного білка [16] методом Бредфорд [17] на спектрометрі UVmini-1240 (Shimadzu, Japan). Чисельність життєздатних клітин бактерій визначали методом серійних розведень [18].

Для оцінки дії ТПАР на антимікробну активність біоцидів використовували естери тіосульфокислот – етилтіосульфанілат (ЕТС) й алілтіосульфанілат (АТС), синтезовані на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології НУ “Львівська політехніка”. Дослідження бактерицидної дії проводили на культурах фітопатогенних бактерій: *Pseudomonas syringae*, *Clavibacter michiganensis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora* та *Xanthomonas campestris* з Української колекції мікроорганізмів ІМВ. Тест-культури вирощували на пластикових планшетах (Sarstedt, США) з об'ємом лунок 250,0 мкл із додаванням відповідних концентрацій ЕТС, ТПАР та їх композицій (1 доба, 30 ± 2 °С). Вплив оцінювали за значеннями мінімальної інгібувальної (МІК) і бактерицидної (МБК) концентрацій препаратів [19].

Визначення фунгіцидної активності ТПАР та їх композицій з тіосульфатними щодо тест-культур *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia cerealis* (із колекції мікроорганізмів ДП “Ензим”) проводили методом паперових дисків [18] за зонами затримки росту на агаризованому середовищі Сабуро. Чашки Петрі витримували 12 год у холодильнику для дифузії досліджуваних препаратів у середовище, термостатували 3 доби за 28 °С, далі вимірювали зони затримки росту грибів.

Вплив ТПАР на активність індоліл-3-оцтової кислоти визначали у 2-х біотестах: на відрізках колеоптилів пшениці (визначали приріст їх довжини за 24 год [20]) і на живцях квасолі (оцінювали ризогенез 10-добових живців [21]).

Вплив продуктів *R. erythropolis* Au-1 (ТПАР, екзополісахаридного комплексу, супернатанту культуральної рідини) на ріст рослин (пшениці озимої та сої) вивчали в лабораторних і польових умовах. Передпосівну обробку насіння проводили замочуванням на 3 год у розчинах досліджуваних речовин (ТПАР – за концентрації 0,01; 0,05; 0,10 г/л, ЕПК – 0,05 г/л, СКР за розведення 1:10), контроль – дистильована вода. Для проведення експериментів у лабораторних умовах оброблене насіння пшениці розкладали по 20 штук у чашки Петрі на зволожений фільтрувальний папір та помішали у термостат (20 °С). На 7-му добу визначали морфометричні показники проростків згідно з ДСТУ 4138–2002 [22]. У вегетаційних дослідках попередньо оброблене насіння сої висаджували в посудини об’ємом 900 мл і пророщували 45 діб за 18–20 °С. У дрібноділянкових дослідках насіння пшениці після передпосівної обробки досліджуваними препаратами висівали у відкритий ґрунт на ділянки (10 м²) і вирощували впродовж 50 діб [23].

Здатність штаму *R. erythropolis* Au-1 до синтезу фітогормонів ауксинової природи визначали за допомогою якісної реакції з використанням реактиву Сальковського за появою малинового забарвлення супернатанту культуральної рідини [20].

Повторність усіх мікробіологічних досліджень 3-разова; у дослідках з рослинами – 4-разова. Статистичний аналіз достовірності експериментальних даних проводили методами варіаційної статистики за Лакіним [24], обробку даних здійснювали із застосуванням програми Microsoft Excel 2010. Планування і проведення польових дослідів та статистичну обробку даних проводили за Б.А. Доспеховим [23].

Результати

Однією з найважливіших біологічних властивостей біоПАР є здатність змінювати проникність клітинних мембран, що визначає їх дію на мікроорганізми і рослини. Встановлено, що ТПАР підвищують проникність клітинних мембран тестових мікроорганізмів-фітопатогенів. Так, після оброблення клітин *A. tumefaciens* розчинами ТПАР (0,05–0,5 г/л) кількість позаклітинного білка зростала в середньому на 59 %, причому чисельність життєздатних клітин бактерій зменшувалася лише на порядок (табл. 1).

Таблиця 1: Вплив трегалозоліпідних ПАР на проникність клітинних мембран мікроорганізмів

Культури мікроорганізмів	Концентрація ТПАР, г/л	Вміст позаклітинного білка, % до контролю	Чисельність життєздатних мікроорганізмів після обробки ТПАР, КУО/мл
<i>P. syringae</i>	0	100,0	7×10 ¹⁰
	0,01	102,5	6×10 ¹⁰
	0,05	105,5	7×10 ¹⁰
	0,1	106,2	8×10 ⁹
	0,5	107,3	5×10 ⁹
<i>A. tumefaciens</i>	0	100,0	8×10 ¹⁰
	0,01	103,4	6×10 ¹⁰
	0,05	108,1	4×10 ¹⁰
	0,1	170,5*	4×10 ⁹
	0,5	200,3*	3×10 ⁹

Примітки. КУО – колонієутворювальні одиниці; в таблиці подані середні значення експериментальних даних; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$ відносно контролю.

Також вивчено антимікробну дію ТПАР та їх вплив на активність тіосульфатних біоцидів. Встановлено, що за концентрацій 0,05–1,0 г/л ТПАР не проявляли інгібувальної дії щодо досліджуваних фітопатогенних бактерій та грибів. Проте ТПАР (0,05 г/л) сприяли підвищенню активності тіосульфатів відносно низки фітопатогенних бактерій (*C. michiganensis*, *A. tumefaciens*, *X. campestris*, *P. syringae* і *E. carotovora*) та грибів (*F. oxysporum* і *R. cerealis*). Так, при додаванні ТПАР до біоциду етилтіосульфатилату мінімальні інгібувальна та бактерицидна концентрації ЕТС зменшувались на 20–50 % для всіх тестових бактерій (табл. 2). Для тест-культур грибів під дією композиції ЕТС (1,0 г/л) з ТПАР (0,05 г/л) діаметр зон інгібування росту збільшувався на 15,4 % (для *F. oxysporum*) і на 53,8 % (*R. cerealis*) порівняно з біоцидом. У суміші з ТПАР (0,05 г/л) фунгіцидна активність АТС (1,0 г/л) зростала на 42,4 і 83,1 % (табл. 3, рис. 1).

Таблиця 2: Антимікробна активність композиції трегалозоліпідних ПАР з етилтіосульфанілатом

Тестові мікроорганізми	ЕТС		ЕТС + ТПАР	
	МІК, мг/л	МБК, мг/л	МІК, мг/л	МБК, мг/л
<i>X. campestris</i>	50	90	30	60*
<i>E. carotovora</i>	30	40	20	30
<i>A. tumefaciens</i>	40	50	20*	40
<i>C. michiganensis</i>	30	70	20	50
<i>P. syringae</i>	20	60	10	40

Примітки. ЕТС – етилтіосульфанілат; ТПАР – трегалозоліпідні ПАР, 0,05 г/л; МІК – мінімальна інгібувальна концентрація; МБК – мінімальна бактерицидна концентрація; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

Таблиця 3: Фунгіцидні властивості композицій трегалозоліпідних ПАР з етилтіосульфанілатом і алілтіосульфанілатом

Препарати	Зона затримки росту, мм	
	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. cerealis</i>
ЕТС 1,0 г/л	13,0 ± 0,5	13,0 ± 0,5
ЕТС 2,0 г/л	17,0 ± 0,7	22,0 ± 1,0
ЕТС 1,0+ТПАР	15,0 ± 0,6	20,0* ± 0,9
АТС 1,0 г/л	12,5 ± 0,6	6,5 ± 0,3
АТС 2,0 г/л	18,0 ± 0,9	11,0 ± 0,5
АТС 1,0 + ТПАР	17,8* ± 0,9	11,9 ± 0,6

Примітки. ЕТС – етилтіосульфанілат; АТС – алілтіосульфанілат; ТПАР – трегалозоліпідні ПАР, 0,05г/л; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$.

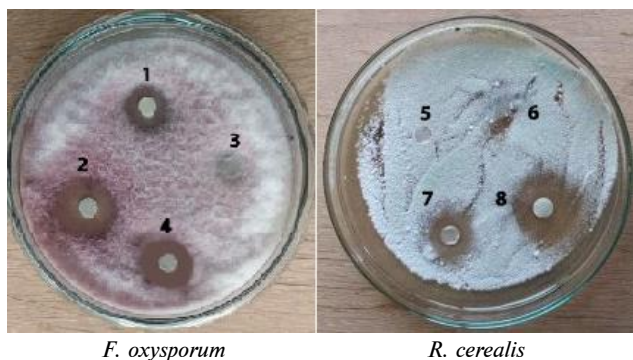


Рисунок 1: Підсилення фунгіцидної дії етилтіосульфанілату й алілтіосульфанілату за допомогою трегалозоліпідних ПАР: 1 – АТС 1 г/л; 2 – АТС 2 г/л; 3 – ТПАР 0,05 г/л; 4 – АТС 1,0 г/л + ТПАР 0,05 г/л; 5 – контроль (вода); 6 – ТПАР 0,05 г/л; 7 – ЕТС 1 г/л; 8 – ЕТС 1,0 г/л + ТПАР 0,05 г/л

Отримані результати свідчать, що в композиціях з ТПАР діючі концентрації тіосульфонатів можна знизити практично удвічі.

Визначено вплив ТПАР на активність індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) – фітогормона ауксинової природи, що є регулятором росту рослин. У біотесті на відрізках колеоптилів пшениці, який використовують для оцінки активності ауксинів, встановлено здатність ТПАР

впливати на ріст рослин. За сумісного використання ІОК (10^{-4} М) з ТПАР підвищувалась активність ауксину: приріст відрізків колеоптилів був на 19 % більшим, ніж у варіанті без ТПАР, і наближувався до дії ІОК за концентрації у 10 разів більшої (10^{-3} М) (рис. 2а). Підвищення активності ІОК у композиції з ТПАР підтверджено також за допомогою специфічного біотесту з використанням живців квасолі (рис. 2б): спостерігалось збільшення кількості та довжини корінців живців квасолі порівняно з контролем та варіантом, обробленим ІОК.

Отримані результати стали підґрунтям для проведення дослідів із рослинами (пшениця, соя), в яких ТПАР використовували для передпосівної обробки насіння. У лабораторних умовах на чашках Петрі вивчали вплив метаболітів *R. erythropolis* Au-1 на ріст проростків пшениці. Отримані результати підтвердили, що найкращою концентрацією ТПАР для передпосівної обробки насіння є 0,05 г/л, за якої приріст довжини коренів та пагонів проростків становив відповідно 36 та 29 %, а маси – 31 та 23 % відносно контролю (рис. 3).

Результати вегетаційних і дрібноділянкових експериментів підтвердили стимулювальну дію ТПАР на пшеницю та сою (рис. 4). Маса пагонів та коренів сої (вегетаційний дослід) відповідно зростала на 36,8 та 29 %, а пшениці (дрібноділянковий дослід) – на 28 та 20 % відносно контролю (рис. 5).

Ефективним та економічно доступним продуктом штаму *R. erythropolis* Au-1 є супернатант культуральної рідини, який містить у своєму складі різні метаболіти, зокрема ТПАР та екзополісахаридний комплекс [25]. У лабораторних умовах показано, що за передпосівної обробки насіння пшениці препаратом СКР (розведення 1:10) довжини кореня та пагона були більшими за контроль на 58 та 24 % відповідно (рис. 6).

Вплив компонентів СКР на морфометричні показники був дещо меншим: для ТПАР – на 36 та 29 % та для ЕПК – на 8 та 12 % відповідно.

Для пояснення підвищеної активності СКР щодо рослин було проведено якісне визначення фітогормонів ауксинової природи у його складі. Поява малинового забарвлення у специфічній реакції Сальковського вказує на наявність ауксинів у СКР штаму *R. erythropolis* Au-1 (рис. 7).

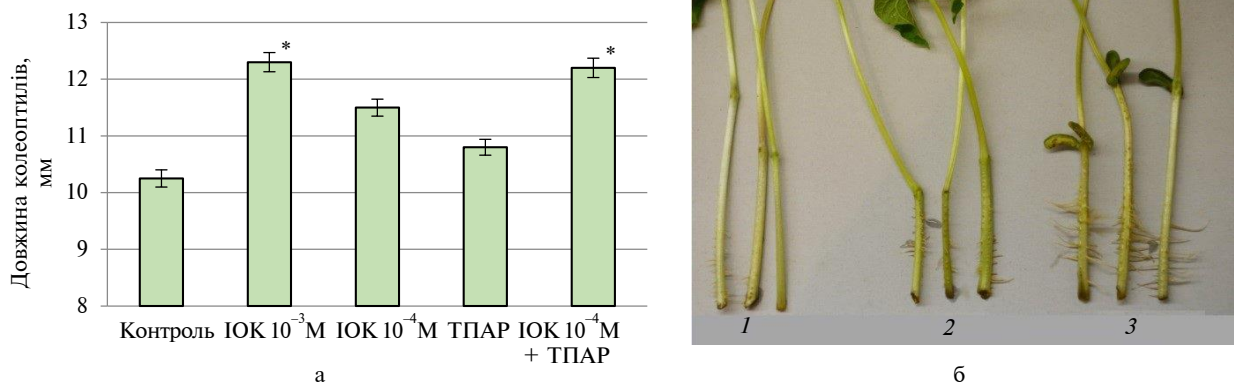


Рисунок 2: Вплив трегалозоліпідних ПАР та індоліл-3-оцтової кислоти в біотестах на колеоптилях пшениці (а) та ризогенезі живців квасолі (б): 1 – контроль; 2 – ІОК 10^{-4} М; 3 – ІОК 10^{-4} М + ТПАР 0,05 г/л; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$ відносно контролю

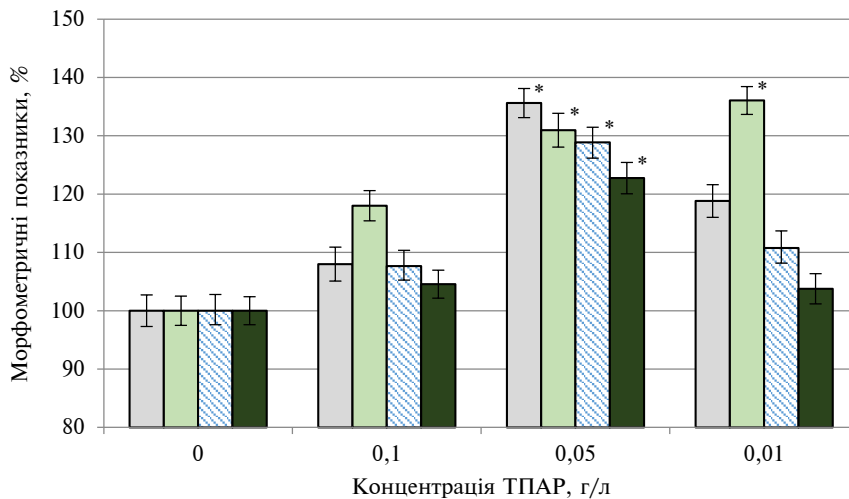


Рисунок 3: Вплив трегалозоліпідних ПАР на морфометричні параметри проростків пшениці в лабораторних умовах; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$ відносно контролю: ■ – довжина кореня; ■ – маса кореня; ▨ – довжина пагона; ■ – маса пагона



Рисунок 4: Вплив трегалозоліпідних ПАР (0,05 г/л) на ростові показники сої та пшениці за передпосівної обробки насіння (дрібnodілянкові та вегетаційні досліди): 1 – контроль; 2 – ТПАР 0,05 г/л

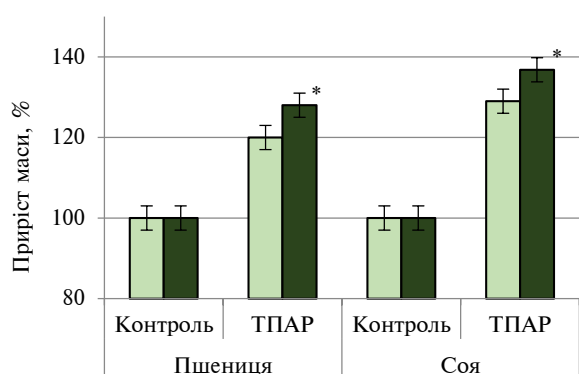


Рисунок 5: Вплив трегалозоліпідних ПАР (0,05 г/л) на ростові показники сої та пшениці за передпосівної обробки насіння; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$ відносно контролю: ■ – корінь; ■ – пагін

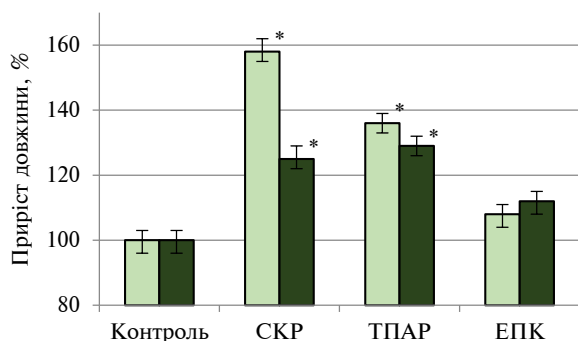


Рисунок 6: Вплив метаболітів *R. erythropolis* Au-1 на морфометричні параметри проростків пшениці: СКР – супернатант культуральної рідини, 1:10; ТПАР – трегалозоліпідні ПАР, 0,05 г/л; ЕПК – екзополісахаридний комплекс, 0,05 г/л; * – результати достовірні за $p \leq 0,05$ відносно контролю: ■ – корінь; ■ – пагін

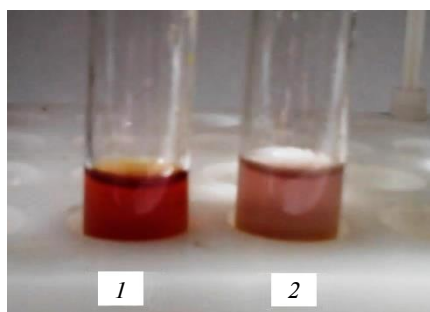


Рисунок 7: Якісне визначення фітогормонів ауксинової породи в супернатанті культуральної рідини штаму *R. erythropolis* Au-1: 1 – розчин індоліл-3-оцтової кислоти, 0,01 г/л; 2 – супернатант культуральної рідини штаму *R. erythropolis* Au-1

Обговорення

При розробленні композицій на основі біоПАР, зокрема для рослинництва, необхідна ін-

формація про їх вплив на клітини живих організмів, на якому ґрунтується дія біологічно активних препаратів [26, 27]. Ми встановили, що після обробки клітин досліджених бактерій *P. syringae* і *A. tumefaciens* розчинами ТПАР (0,05–0,1 г/л) кількість позаклітинного білка зростала в середньому на 50 % (зі збереженням життєздатності клітин). Такі результати можна пояснити тим, що ТПАР змінюють проникність клітинних мембран тестованих бактерій [27]. З літератури відомо, що ТПАР порівняно із синтетичними, мають більш “м’який” вплив на живі організми: за концентрацій, у яких синтетичні руйнують клітини, біоПАР лише змінюють проникність їх мембран [28]. Можливим молекулярним механізмом впливу біоПАР на клітини є утворення супрамолекулярних комплексів із мембранними фосfolіпідами [29], що також є одним із пояснень мембранотропної дії біоПАР.

Здатність біоПАР до регулювання проникності мембран була використана для їх композицій з біоцидами тіосульфатної структури та фітогормонами [28, 30]. Тіосульфати є слабо розчинними у воді, що лімітує їх біодоступність, отже, й їх використання. Завдяки фізико-хімічним і біологічним властивостям біоПАР можуть сприяти підвищенню розчинності й активності тіосульфатів: поєднання із біоПАР дає можливість підвищити ефективність і зменшити робочі концентрації синтетичних біоцидів [28]. Встановлено, що ТПАР (0,05 г/л) підсилюють антимікробну дію тіосульфатів щодо фітопатогенних грибів (*F. oxysporum* і *R. cerealis*) та бактерій (*C. michiganensis*, *A. tumefaciens*, *X. campestris*, *P. syringae* і *E. carotovora*). Результати показали, що використання тіосульфатів у композиціях з ТПАР дає змогу істотно зменшити діючі концентрації біоцидів, що має екологічне й економічне значення. Крім того, в композиції з ТПАР підвищується рістстимулювальна дія ІОК (фітогормона ауксинової природи). Показано, що ТПАР за сумісного використання з ІОК сприяють підвищенню її активності: приріст відрізків був на 19 % більшим, ніж у варіанті без ТПАР, і наближувався до дії ІОК за концентрації у 10 разів більшої. Такі властивості ТПАР можна використати для збільшення ефективності біологічно активних препаратів, зокрема для сільського господарства.

За результатами експериментів у лабораторних умовах та умовах відкритого ґрунту встановлено, що ТПАР здатні стимулювати ріст і розвиток рослин за передпосівної обробки

насіння. Показано, що найбільш ефективною концентрацією ТПАР є 0,05 г/л. Вплив ПАР на ріст рослин можна пояснити передусім їх здатністю змінювати проникність клітинних мембран. Також одним з імовірних механізмів їх стимулювальної дії є вплив на ріст клітин через розтягнення, що узгоджується з результатами біотестів на відрізках колеоптилів пшениці [30]. З літератури відомо, що ефект розтягнення рослинних клітин пов'язаний зі збільшенням поглинання води й активуванням мембранозв'язаних ферментів – Н⁺АТФ-ази та кислих гідролаз. Також при розтягненні клітинної стінки активуються процеси синтезу целюлози і везикулярної секреції, яка постачає полісахариди для клітинної стінки. Отже, одним із механізмів стимулювального впливу ПАР на розтягнення клітин і ріст рослин може бути їх дія на ферменти мембран. Це підтверджується даними про здатність ПАР до підвищення активності низки мембранозв'язаних ферментів [31, 32].

Показано, що всі досліджувані метаболіти штаму *R. erythropolis* Au-1 за передпосівної обробки насіння стимулюють ріст і розвиток рослин. Найбільш ефективним є використання супернатанту культуральної рідини (1:10), який сприяє збільшенню довжини кореня і пагона проростків відповідно на 58 та 24 % відносно контролю. Такий вплив, імовірно, можна пояснити синергічною дією компонентів СКР, зокрема ТПАР, ЕПК і фітогормонів ауксинової природи. Доцільність використання СКР як

рістстимулювального препарату для рослин також ґрунтується на його економічній доступності, оскільки технологія отримання препарату складається з меншої кількості технологічних стадій порівняно з виділенням ТПАР.

Висновки

Показано, що за дії трегалозоліпідних ПАР (0,05–0,1 г/л) підвищується проникність клітинних мембран мікроорганізмів зі збереженням їх життєздатності.

Встановлено, що ТПАР сприяють збільшенню антибактеріальної та фунгіцидної активності тіосульфонатів, а також підсилюють дію фітогормона ауксинової природи – індоліл-3-оцтової кислоти.

Визначено, що передпосівна обробка насіння пшениці та сої розчинами ТПАР, СКР та ЕПК штаму *R. erythropolis* Au-1 стимулює ріст рослин, причому найбільш ефективним і технологічно доступним препаратом є СКР: приріст довжини кореня та пагона становив 58 та 24 % відносно контролю.

Таким чином, ТПАР здатні підвищувати активність препаратів для захисту і регулювання росту рослин. Це дає змогу знижувати їх діючі концентрації та зменшувати екологічне навантаження на довкілля. Отримані результати вказують на значні перспективи використання ТПАР при створенні безпечних препаратів підвищеної ефективності для рослинництва.

References

- [1] Mulligan CN, Sharma SK, Mudhoo A. Biosurfactants: research trends & applications. Boca Raton: CRC Press, Taylor&Francis Group; 2014. 146 p.
- [2] Panchak LV. Lectins of mushrooms of the family *Russulaceae*: functions, cleaning, structural peculiarities and possibilities of practical application. *Biotechnologia Acta*. 2019;12(1):29-38. DOI: 10.15407/biotech12.01.029
- [3] Wang Sh, Zhang Y, Ren H, Wang Y, Jiang W, Fang B. Strategies and perspectives of assembling multi-enzyme systems. *Critical Rev Biotechnol*. 2017;37(8):1024-37. DOI: 10.1080/07388551.2017.1303803
- [4] Mir Sh, Jamal P, Alama Md Z, Mir A B, Ansari A H. Microbial surface tensio-active compounds: production and industrial application perspectives. *Int J Biotechnol Bioeng*. 2017;3(8):273-92.
- [5] Abdel-Mawgoud AM, Stephanopoulos G. Simple glycolipids of microbes: chemistry, biological activity and metabolic engineering. *Synthetic Systems Biotechnol*. 2017;3(1):3-19. DOI: 10.1016/j.synbio.2017.12.001
- [6] Abbasi A, Sajid A, Haq N, Rahman S, Misbah Z, Sanobar G, et al. Agricultural pollution: an emerging issue. In: Ahmad P, Wani M, Azooz M, Tran LS, editors. *Improvement of crops in the era of climatic changes*. New York: Springer Science+Business Media; 2014. Chapter 13. DOI: 10.1007/978-1-4614-8830-9_13
- [7] Mahmood I, Imadi SR, Shazadi K, Gul A, Hakeem KR. Effects of pesticides on environment. In: Hakeem K, Akhtar M, Abdullah S, editors. *Plant, soil and microbes*. Switzerland: Springer International Publishing; 2016. DOI: 10.1007/978-3-319-27455-3_13
- [8] Sachdev DP, Cameotra SS. Biosurfactants in agriculture. *Int J Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:1005-16. DOI: 10.1007/s00253-012-4641-8
- [9] Biopesticide Registration Action Document *Bacillus subtilis* Strain QST 713 (PC Code 006479). US Environmental Protection Agency [Internet]. www3.epa.gov. 2006 [cited 2019 Feb 24]. Available from: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_PC-006479_9-Aug-06.pdf

- [10] Biopesticides Registration Action Document Rhamnolipid Biosurfactant (PC Code 110029). US Environmental Protection Agency [Internet]. www3.epa.gov. 2004 [cited 2019 Feb 24]. Available from: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/decision_PC-110029_11-May-04.pdf
- [11] Awada SM, Spendlove RS, Awada M, inventors; Agscitech Inc. US, assignee. Microbial biosurfactants as agents for controlling pests. United States patent 7994138 B2. 2011 Aug 09.
- [12] Awada SM, Awada MM, Spendlove RS, inventors; Agscitech Inc. US, assignee. Compositions and methods for controlling pests with glycolipids. United States patent 8680060 B2. 2014 March 25.
- [13] Donets AV, Koshelev VV, Bechtereva MN. Qualitative composition and quantitative content of mycobacteria lipids. *Microbiologia*. 1970;39(2):300-4.
- [14] Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Bio Chem*. 1957;226:497-509.
- [15] Williams AG., Wimpenny YW. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in bat culture. *J Bio Chem*. 1977;102:12-21.
- [16] Vasileva-Tonkova E, Gesheva V. biosurfactant production by antarctic facultative anaerobe *Pantoea* sp. during growth on hydrocarbons. *Current Microbiol*. 2007;2:136-41. DOI: 10.1007/s00284-006-0345-6
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1-2):248-54. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- [18] Segi J. *Methods of soil microbiology*. Moscow: Kolos; 1983. 296 p.
- [19] Sotirova A, Avramova T, Lazarkevich I, Lubenets V, Karpenko E, Galabova D. Antimicrobial potential of selected thiosulfonates – based biocides and biosurfactants against bacteria and fungi. *Reports BAS*. 2010;6:21-5.
- [20] Kefely VY, Turetskaya RH, Kof EM. *Methods for determination of phytohormones, growth inhibitors, defoliant, and herbicides*. Moscow: Kolos; 1973. p. 7.
- [21] Harhota LV, Dovbish NF. Rhizogenesis of stalks of semi-arranged cuttings of ornamental sparse bush plants in the Donbas. *Promyslova Botanika*. 2008;8:161-5.
- [22] *Seeds of agricultural plants. Methods for seeds testing*. Kyiv: Derzhspozhivstandart Ukrainy; 2003. 148 p. DSTU 4138-2002.
- [23] Dosphehov BA. *The field experiment method (with basics of statistical processing of research results)*. Moscow: Agropromizdat; 1985. 351 p.
- [24] Lakyn AN. *The course of variation statistics*. Kyiv: Vyshcha Shkola; 1990. 116 p.
- [25] Koretska NI, Prystai MV, Karpenko OV. Rape phosphatide concentrate in the technologies of surfactants production by the Actinobacteria. *Ukr Food J*. 2014;3(3):429-36.
- [26] Ostroumov SA. *Biological effects of surfactants*. New York: CRC Press; 2005. 304 p.
- [27] Sotirova A, Spasova D, Vasileva-Tonkova E. Effects of rhamnolipid-biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res*. 2009;164(3):297-303. DOI: 10.1016/j.micres.2007.01.005
- [28] Sotirova A, Avramova T, Stoitsova S, Lazarkevich I, Lubenets V, Karpenko E, et al. The importance of rhamnolipid-biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates. *Current Microbiol*. 2012;65(5):534-41. DOI: 10.1007/s00284-012-0191-7
- [29] Pashynska V, Karpenko O. Mass spectrometric study of rhamnolipid supramolecular complexes with membrane phospholipids. In: *Proceedings of Int Summer School Supramolecular Systems in Chemistry and Biology; 2010 Sep 6–10*. p. 135.
- [30] Karpenko OV, Koretska NI, Scheglova NS, Karpenko IV, Baranov VI. Gramineae plants growth stimulation by surface-active rhamnolipids. *Biotechnologia Acta*. 2013;6(6):94-9. DOI: 10.15407/biotech6.06.094
- [31] Sandstrom R, Richard P, Robert E. Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants enrichment of sterols and activation of ATPase. *Plant Physiol*. 1989;90:1524-31. DOI: 10.1104/pp.90.4.1524
- [32] Shumylina EV, Zonova NJ, Schipunov JA. Influence of surfactants on the phospholipase DII activity. *Biologicheskie Membrany*. 1998;15(4):414-9.

Н.И. Корецкая, Е.В. Карпенко, В.И. Баранов, В.И. Лубенец, Т.М. Ногина

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОВЕРХНО-АКТИВНЫХ МЕТАБОЛИТОВ *Rhodococcus erythropolis* Au-1 И ИХ ПЕРСПЕКТИВЫ ДЛЯ РАСТЕНИЕВОДСТВА

Проблематика. Микробные поверхностно-активные вещества трегалозолипидной природы (ТПАВ) являются перспективными продуктами биотехнологии для различных отраслей современной промышленности и сельского хозяйства. Для создания эффективных экологически безопасных агропрепаратов актуальной задачей является изучение свойств биогенных ПАВ и механизмов их влияния на растения и микроорганизмы.

Цель. Исследовать биологические свойства ТПАВ – метаболитов штамма *Rhodococcus erythropolis* Au-1 – и возможные пути их использования в растениеводстве.

Методика реализации. Штамм культивировали на модифицированной среде Гудвина, ТПАВ экстрагировали из выделенной биомассы смесью Фолча. Действие ТПАВ на проницаемость клеточных мембран тестовых микроорганизмов-фитопатогенов оценивали по изменению количества внеклеточного белка (методом Брэдфорд), а численность жизнеспособных клеток – методом серийных разведений. Влияние ТПАВ на активность биоцидов по отношению к тестовым бактериям оценивали по минимальной ингибирующей (МИК) и бактерицидной (МБК) концентрациям препаратов, а на грибы – по зонам ингибирования роста на агаризованной среде. Действие ТПАВ на активность фитогормона индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) определяли в биотестах на отрезках coleoptiles пшеницы и на ризогенез черенков фасоли. Влияние метаболитов *R. erythropolis* Au-1 на рост растений (при предпосевной обработке семян) определяли по морфометрическим показателям пшеницы и сои в лабораторных, вегетационных и полевых экспериментах. Способность штамма *R. erythropolis* Au-1 к синтезу фитогормонов-ауксинов определяли по их наличию в супернатанте культуральной жидкости (реакция Сальковского).

Результаты. Установлено, что ТПАВ штамма *R. erythropolis* Au-1 способствуют повышению проницаемости клеточных мембран микроорганизмов-фитопатогенов (с сохранением жизнеспособности клеток). Установлено, что ТПАВ усиливают антимикробную активность биоцидов тиосульфатной структуры: МИК и МБК в композициях биоцидов с ТПАВ снижаются на 20–50 % (для тестовых бактерий), а зоны ингибирования роста фитопатогенных грибов увеличились в среднем на 53 %. Установлено, что ТПАВ усиливают действие ИУК: использование ТПАВ в композиции с ИУК позволяет уменьшить ее действующую концентрацию в 10 раз. Установлено стимулирующее действие метаболитов *R. erythropolis* Au-1 на рост сои и пшеницы: предпосевная обработка семян растворами ТПАВ способствовала приросту длины корней и побегов проростков на 29–37 %, а их массы – на 20–31 % относительно контроля. Супернатант культуральной жидкости был эффективнее: прирост длины корня и побега составлял соответственно 58 и 24 % относительно контроля, что можно объяснить наличием в его составе биологически активных веществ, в частности фитогормонов ауксиновой природы.

Выводы. ТПАВ за счет влияния на проницаемость клеточных мембран способны повышать эффективность биоцидов и рострегуляторов, а также стимулировать рост растений. Полученные результаты являются перспективными для разработки эффективных и экологически безопасных препаратов для современного растениеводства.

Ключевые слова: трегалозолипидные поверхностно-активные вещества; *Rhodococcus erythropolis*; проницаемость клеточных мембран; антимикробная активность; регуляторы роста растений.

N.I. Koretska, O.V. Karpenko, V.I. Baranov, V.I. Lubenets, T.M. Nogyna

BIOLOGICAL PROPERTIES OF SURFACE-ACTIVE METABOLITES OF *Rhodococcus erythropolis* Au-1 AND THEIR PROSPECTS FOR CROP TECHNOLOGY

Background. Trehalose lipids (TLs) are microbial surfactants, they are perspective for using in various industries and agriculture. Investigation of biosurfactants' properties, as well as mechanisms of their influence on biological objects, is the important task of biotechnology.

Objective. The aim of the paper is to study the biological properties of TLs – metabolites of *Rhodococcus erythropolis* Au-1 – and possible approaches of their using in crop production.

Methods. Bacteria were grown on the Goodwin nutrient medium, TLs were extracted from the isolated biomass by the Folch mixture. The influence of test microorganisms on the permeability of cells' membranes was studied by the release of extracellular protein. The protein content was determined by the Bradford method, the number of viable cells – by the method of serial dilution. Studying of the TLs effect on efficiency of the biocides was carried out on test bacteria by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the preparations. The influence of the compositions of TLs and biocides on test fungi was evaluated by diameter of inhibition zones in disk susceptibility tests on agar medium. The effect of TLs on the activity of the phytohormone – indolyl 3-acetic acid (IAA) was determined in 2 biotests: on coleoptile stalks of wheat and rhizogenesis of bean seedlings. The influence of metabolites of *R. erythropolis* Au-1 strain on plant growth was determined in laboratory, vegetative and field experiments. The morphometric indices of wheat and soybean were evaluated after pre-sowing seed treatment. The presence of auxins in the supernatant of *R. erythropolis* Au-1 was determined with the specific reaction of Salkovsky.

Results. It was established that the TLs of *R. erythropolis* Au-1 strain promote an increase of permeability of cell membranes of phytopathogenic microorganisms (while remaining cell viability). It was shown that TLs enhance antimicrobial activity of biocide-thiosulfonates. The MIC and MBC of biocides in the compositions with trehalose lipids were reduced by 20–50% (for test bacteria), and the diameter of inhibition zones for phytopathogenic fungi increased by an average of 53%. The use of TLs in the IAA composition allows the active concentration of IOC to be reduced by 10 times. In experiments with plants, it has been shown that pre-sowing treatment of seeds with TLs solutions promotes an increase of root and sprout length of the seedlings by 29–37%, and their mass – by 20–31% relative to control. In laboratory conditions it was shown that the supernatant is the most effective preparation: pre-sowing treatment of wheat seed with the supernatant promotes an increase of root and sprout lengths by 58% and 24% respectively. It is established that phytohormones of auxin nature are in the supernatant of *R. erythropolis* strain.

Conclusions. Due to the effect on cell membranes permeability trehalose lipids promote increasing the effectiveness of biocides and plant growth regulators, as well as stimulating plant growth. The obtained results are promising for the development of effective and environmentally friendly products for modern crop production.

Keywords: trehalose lipids; *Rhodococcus erythropolis*; permeability of cell membranes; antimicrobial activity; plant growth regulators.