

УДК: 577.11:631.8

Н.С. Щеглова¹, О.В. Карпенко¹, Р.І. Вільданова¹, М.В. Пристай¹,
Н.Ю. Лісова², Т.М. Ногіна³

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М.Литвиненка НАН України,
вул. Наукова, 3-а, Львів, 79053, Україна, тел.: +38 (032) 264 07 40,
e-mail: e.v.karpenko@gmail.com

²Інститут землеробства і тваринництва західного регіону УААН, с. Оброшино,
Пустомитівського р-ну Львівської обл.

³Інститут мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Заболотного, 154, Київ, Д03680, Україна

ВПЛИВ БІОГЕННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА ФОРМУВАННЯ СИМБІОЗУ *SYNORHIZOBIUM MELILOTI* З ЛЮЦЕРНОЮ

Встановлено, що біогенні поверхнево-активні речовини (трегалозоліпіди, рамноліпідний біокомплекс) у складі бактеріальних препаратів S. meliloti ЛН11 стимулюють формування симбіозу ризобій з люцерною. Досліджено різні способи отримання комплексних препаратів: внесення біогенних ПАР в поживне середовище росту ризобій та їх додавання безпосередньо до бактеріального препарату. При бактеризації насіння одержаними препаратами збільшується нодуляційна активність ризобій, надземна та коренева маса рослин. Визначено, що найбільш ефективними були препарати S. meliloti ЛН11, до складу яких входили трегалозоліпіди. Запропоновано оптимальний спосіб отримання комплексних препаратів – додавання трегалозоліпідів (0,01 г/л) при культивуванні ризобій.

Ключові слова: Synorhizobium meliloti, люцерна, біоПАР, рамноліпідний біокомплекс, трегалозоліпіди, нодуляційна активність.

Розробка ефективних екологічно безпечних препаратів для рослинництва є актуальною проблемою сучасної біотехнології. Значну перспективу для створення нових та удосконалення існуючих бактеріальних препаратів мають біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР). БіоПАР при своїй високій ефективності та унікальності їх властивостей є екологічно безпечними і нетоксичними, що визначає перспективу їх використання у різних галузях народного господарства. Відомо, що біоПАР впливають на проникність клітинних мембран, здатні регулювати ріст та метаболізм бактерій, підвищуючи активність ферментів [12]. Відомо, що рослинні ПАР сапоніни стимулюють нодуляційну активність і формування активного симбіозу ризобій з бобовими рослинами [9]. Особливу роль, на нашу думку, біоПАР можуть відігравати на початкових етапах розвитку кореневої системи рослини та її колонізації симбіотичними азот-

© Н.С. Щеглова, О.В. Карпенко, Р.І. Вільданова, М.В. Пристай, Н.Ю. Лісова, Т.М. Ногіна, 2011



фіксаторами (ініціацію кореневих бульбочок, конкурентоспроможність та нодуляційну активність ризобій), що впливає на формування ефективних взаємовідносин між мікро- і макросимбіонтами, сприяє підвищенню врожайності та отриманню якісної продукції рослинництва. В наших попередніх дослідженнях встановлено стимулювальний вплив біоПАР різної природи на проростання насіння бобових рослин [6]. Метою даної роботи є вивчення впливу біоПАР на формування симбіотичної системи бульбочкових бактерій *S. meliloti* ЛН 11 та рослин люцерни сорту Роксолана.

Матеріали і методи досліджень

Об'єкти досліджень: штам *Synorhizobium meliloti* ЛН11 (з колекції мікроорганізмів Інституту землеробства і тваринництва західного регіону УААН), люцерна сорту Роксолана; поверхнево-активні метаболіти: рамноліпідний біокомплекс (суміш рамноліпідів та полісахаридів) — продуцент штам *Pseudomonas* sp. PS-17 (з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України); ПАР, які містять трегалозоліпіди (ТЛ) — продуцент штам *Rhodococcus erythropolis* УКМ Ас-50 (з Української колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України).

Штам *Pseudomonas* sp. PS-17 вирощували 5 діб на оптимізованому мінеральному середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 3,0; NaCl — 0,3; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,3; гліцерофосфат Са — 2,46; CaCO_3 — 0,01; MnSO_4 — 0,001; FeSO_4 — 0,001; цитрат Na — 2,0; гліцерин — 30,0; рН — 6,8–7,0. Рамноліпідний біокомплекс виділяли із супернатанту культуральної рідини *Pseudomonas* sp. PS-17 при додаванні 10%-го розчину соляної кислоти до рН 3,0. Отриманий осад витримували 12 год при 4 °С та відділяли центрифугуванням (8000 об/хв., 20 хв.). Він складається із 80% рамноліпідів та 20% полісахаридів [13]. Штам *R. erythropolis* УКМ Ас–50 культивували протягом 5 діб на середовищі Гудвіна в нашій модифікації (г/л): NH_4NO_3 — 0,4; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ — 2,0; KH_2PO_4 — 1,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; дріжджовий екстракт — 1,0; джерело вуглецевого живлення (гексадекан) — 20,0; рН 6,8–7,0. Трегалозоліпіди екстрагували з біомаси бактерій сумішшю Фолча (хлороформ/метанол, 2:1). Штам *S. meliloti* ЛН11 вирощували на манітно-дріжджовому середовищі (МД) впродовж 3 діб [10]. Для отримання модифікованих препаратів: 1 — штам *S. meliloti* ЛН11 культивували на поживному середовищі впродовж 3 діб з додаванням ПАР; 2 — ПАР додавали безпосередньо до суспензії клітин. Рамноліпідний біокомплекс або трегалозоліпіди вносили до біопрепаратів за концентрацій 0,05; 0,02; 0,01 г/л.

Вегетаційні досліді з люцерною проводили в умовах піщаної культури у поліетиленових посудинах ємністю 200 мл (напівстерильний дослід) на поживному середовищі Гельрїгеля [3], що містило 0,2 норми азоту. До середовища додавали розчин мікроелементів (1 мл/кг піску): $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ — 0,5 г/л; H_3BO_3 — 1,0 г/л, рН — 6,8–7,0. Повторність до-



слідів 6-ти кратна, загальна кількість рослин у варіанті — 30 шт. Насіння перед висівом стерилізували сумішшю пероксид водню (12%) — етанол (1:1). Бактеризацію насіння проводили суспензією клітин *S. meliloti* ЛН11 з титром $2 \cdot 10^9$ кл/мл.

Вплив біоПАР на ініціацію та формування кореневих бульбочок вивчали за їх загальною кількістю на корені та за розмірами: великі — 4–5 мм; середні — 2–3 мм; дрібні — ≤ 1 мм [2]. Підрахунок кореневих бульбочок і облік зеленої маси проводили на 60-й день після сходів. Визначення надземної та кореневої маси проводили згідно із стандартною методикою.

Нітрогеназну (ацетиленвідновну) активність кореневих бульбочок визначали ацетиленовим методом [11] на газовому хроматографі ЛХМ-80 з полум'яно-іонізаційним детектором, колонка з оксидом алюмінію LL 5/40 (0,4 x 130 см), температура 80 °С, газ-носії — гелій (30 мл/хв). Об'єм зразку газової суміші становив 0,2–1 см³. Вміст етилену визначали за калібрувальним графіком, як стандарт використовували етилен (ГОСТ 25070-87). Для кожного зразку брали по 5 корінців, експозиція в ацетилені 0,5 год.

Результати та їх обговорення

Встановлено, що при внесенні рамноліпідних ПАР (біокомплексу) при культивуванні бактерій, а також при їх додаванні безпосередньо до бактеріальної суспензії *S. meliloti* ЛН11 підвищувалася ефективність бактеризації насіння люцерни. Залежно від концентрації рамноліпідних ПАР у препараті коренева маса люцерни збільшувалась на 19,2–23,1%, а надземна — на 14,5–17,1% порівняно з інокуляцією *S. meliloti* ЛН11; проте такий вплив був у межах середньостатистичної похибки (табл. 1). Нодуляційна активність ризобій за всіх концентрацій біокомплексу у препараті зросла на 20,4–29,6%.

Одним з пояснень такої стимулювальної дії біокомплексу може бути покращення контакту мікроорганізмів з поверхнею кореня, що обумовлено їх поверхнево-активними властивостями. Важливу роль, на нашу думку, відіграє і їх біологічна активність, зокрема вплив на активність пектиназ ризобій [5], оскільки ці ферменти спричиняють лізис клітинної стінки, що сприяє первинному інфікуванню кореневих волосків [1]. Причиною зростання нодуляційної активності ризобій також може бути підвищення синтезу екзополісахаридів під впливом ПАР [7], оскільки відомо, що полісахариди ризобій відіграють важливу роль у формуванні ефективного симбіозу з бобовими рослинами [1, 2].

Рамноліпідні ПАР у складі бактеріальних препаратів практично не впливали на формування кореневих бульбочок або незначно зменшували кількість великих і середніх бульбочок. Їх азотфіксувальна активність практично не відрізнялась від варіанту інокуляції *S. meliloti* ЛН11.



Таблиця 1
Вплив рамноліпідного біокомплексу (БК) на формування симбіозу *S. meliloti* ЛН11 — люцерна (сорт Роксолана)

Table 1
Influence of rhamnolipid biocomplex (BC) on the formation of symbiosis *S. meliloti* LN11 — alfalfa (var. Roksolana)

Варіант досліджу	БК (г/л)	Суха коренева маса, г/10 рослин	Суха надземна маса, г/10 рослин	Кількість корневих бульбочок, шт/10 рослин	Нітрогеназна активність, нмоль С ₂ H ₄ /год/рослину
Контроль (вода)	0	0,46±0,02	0,67±0,03	0	—
<i>S. meliloti</i> ЛН11	0	0,52±0,04	0,76±0,05	270	37,3±7,9
Внесення БК при культивуванні бактерій	0,05	0,66±0,09	0,88±0,05	408	46,3±10,7
	0,02	0,58±0,04	0,89±0,06	432	42,3±10,5
	0,01	0,62±0,04	0,91±0,07	440	42,3±7,0
Внесення БК до суспензії клітин	0,05	0,63±0,06	0,87±0,06	350	37,8±7,8
	0,02	0,62±0,06	0,87±0,05	325	33,8±9,1
	0,01	0,68±0,06	0,89±0,08	342	35,0±8,0

n= 27; p≤0,05

Визначено, що при культивуванні *S. meliloti* ЛН11 на поживному середовищі з рамноліпідами їх вміст у культуральній рідині після 72 год росту бактерій зменшувалася з 0,01 г/л до 0,002 г/л. Цей факт свідчить, що досліджені ПАР впливали на нодуляційну активність бактерій за низьких концентрацій.

Трегалозоліпіди, у складі бактеріальних препаратів, виявляли більший стимулювальний вплив на симбіотичні показники системи *S. meliloti* ЛН11 — люцерна сорту Роксолана, ніж рамноліпідні ПАР. Коренева маса рослин зросла на 39,4—42,4%, надземна маса — на 19,5—33,8%; нодуляційна активність ризобій підвищилася на 35—79% залежно від концентрації трегалозоліпідів та способу їх внесення у бактеріальну суспензію (табл. 2).



Таблиця 2

Вплив трегалозоліпідів (ТЛ) на формування симбіотичної системи
S. meliloti ЛН 11 – люцерна (сорт Роксолана)

Table 2

Influence of trehalose lipids on the formation of symbiotic system
S. meliloti LN11 – alfalfa (variety Roksolana)

Варіант дослідів	ТЛ, (г/л)	Суха коренева маса, г/10 рослин	Суха надземна маса, г/10 рослин	Кількість корених бульбочок, шт/10 рослин	Нітрогеназ- на активність, нмольС ₂ Н ₄ / год/рослину
Контроль (вода)	0	0,30±0,06	0,73±0,04	0	-
<i>S. meliloti</i> ЛН 11	0	0,33±0,04	0,77±0,04	204	54,3±5,0
Внесення ТЛ при культивуванні бактерій	0,05	0,46±0,03	0,96±0,06	275	65,1±5,3
	0,02	0,46±0,04	0,92±0,05	338	61,7±6,0
	0,01	0,47±0,05	1,03±0,10	365	59,4±5,5
Внесення ТЛ до суспензії бактерій	0,05	0,44±0,03	0,95±0,07	335	53,7±9,5
	0,02	0,45±0,05	0,92±0,05	346	59,2±9,1
	0,01	0,47±0,05	0,94±0,05	362	59,1±6,9

n=30; p<0,05

За бактеризації насіння препаратами, які модифіковані трегалозоліпідами, виявлено тенденцію до зростання кількості великих та достовірно збільшення кількості середніх корених бульбочок (рис. 1). Найбільшу ефективність виявили біопрепарати *S. meliloti* ЛН 11, отримані на поживних середовищах з трегалозоліпідами (0,01 г/л), при бактеризації якими одержано максимальний приріст кореневої та надземної маси люцерни.

Одним з механізмів впливу біоПАР на ріст рослин може бути підвищення активності фітогормонів, зокрема індолілоцтової кислоти (ІОК), яка синтезується ризобіями [4]. В модельному тесті на ризогенез живців квасолі було показано, що використання біогенних ПАР спільно з ІОК підсилювало її дію: збільшувалася кількість утворених корінців, їх довжина та маса [8].

Отже, встановлено стимулювальний вплив біогенних ПАР у складі бактеріальних препаратів на формування симбіозу *S. meliloti* ЛН11- люцерна сорту Роксолана. Показано ефективність бактеризації насіння комплексними препаратами, отриманими за різних способів: внесення біогенних ПАР до поживного середовища росту ризобій або безпосередньо до бактеріальної суспензії.



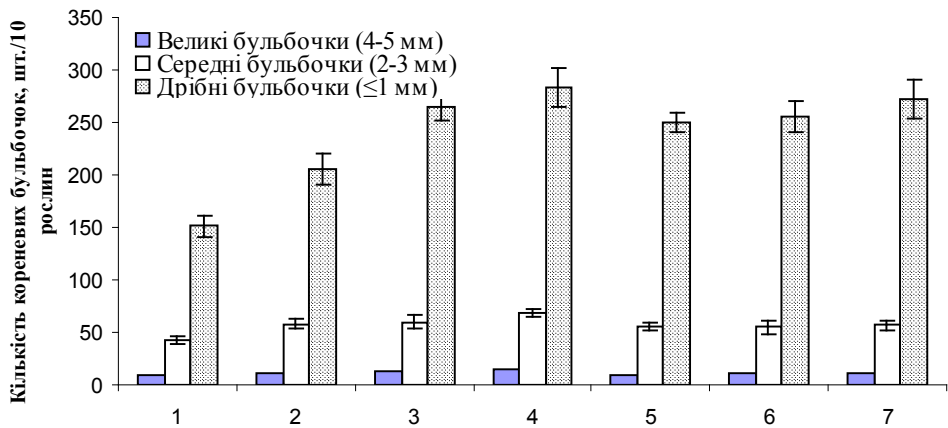


Рис. 1. Вплив трегалозоліпідів на формування кореневих бульбочок у системі *S. meliloti* ЛН11 – люцерна (сорт Роксолана):

1 – *S. meliloti* ЛН 11; 2, 3, 4 – ТЛ: 0,05 г/л; 0,02 г/л; 0,01 г/л, відповідно, вносили при культивуванні бактерій; 5, 6, 7 – ТЛ: 0,05 г/л; 0,02 г/л; 0,01 г/л, відповідно, додавали до бактеріальної суспензії.

Fig. 1. Influence of trehalose lipids on the formation of root nodules in system *S. meliloti* LN11 – alfalfa (var. Roksolana):

1 – *S. meliloti* LN11; 2, 3, 4 – TL was introduced when cultivating bacteria in concentrations 0,05 g/l; 0,02 g/l; 0,01 g/l; 5, 6, 7 – TL in concentrations 0,05 g/l; 0,02 g/l; 0,01 g/l respectively, were added to bacterial suspension.

Встановлено специфічність дії ПАР залежно від їх природи: використання рамноліпідних ПАР у складі бактеріальних препаратів меншою мірою впливало на формування симбіозу *S. meliloti* ЛН11 – люцерна сорту Роксолана ніж трегалозоліпіди.

Отримані результати дозволили запропонувати новий біотехнологічний підхід у виробництві комплексних бактеріальних препаратів для бобових рослин – додавання трегалозоліпідів (0,01 г/л) у поживне середовище при культивуванні ризобій.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Генетика симбиотической азотфиксации с основами селекции* // Под. ред. И.А. Тихоновича, Н.А. Проворова. –С.-Пб.: Наука, 1998. – 194 с.
2. *Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс* // Под. ред. Е.Н. Мишустина. – М.: Наука, 1973. – 380 с.



3. *Сэги Й.* Методы почвенной микробиологии / Под ред. Г.С. Муромцева —М.: Колос. — 1983. — С. 107–109.

4. *Трепач А.О., Токмачева Л.М., Близнюк Н.М.* Фітогормональна активність *Rhizobium radiobacter* // Сільськогосп. мікробіол., — 2007. — вип. 5. — С. 82–89.

5. *Шульга А.Н., Карпенко О.В., Гуменюк В.В., Петрів М. Д.* Біогенні поверхнево-активні речовини для підвищення ефективності кормів сільськогосподарських тварин // Наук. Вісник Львівського нац. універ. ветеринарної медицини та біотехнології ім. С.З. Гжицького, серія «Сільськогосп. науки», — Т. 12, № 2 (44), ч. 3, — С. 270–274.

6. *Щеглова Н., Покиньюброда Т., Карпенко О.* Гліколіпідні ПАР — екологічно безпечні стимулятори росту сільськогосподарських рослин // Вісник НУ «Львівська політехніка». — Хімія та технологія хімічних речовин. — 2007. — № 590. — С. 133–138.

7. *Щеглова Н., Лісова Н., Карпенко О.* Стимуляція біосинтезу полісахаридів культури *E. nimipressuralis* ЛН 1 // Вісник Львів. ун-ту, серія «Біологія», — 2008. — Вип. 48. — С. 135–139.

8. *Щеглова Н., Вильданова Р., Лісова Н., Баранов В., Карпенко О.* Влияние биогенных поверхностно-активных веществ на рост бобовых растений // Радостим : зб. матеріалів конф., 23–25 октября 2010, Краснодар. —С. 113.

9. *Galan M., Lisova N., Oleszek W.* The role of saponins in nodulation of leguminous plants // International conference on saponins «Phytochemistry and Application of Plant Saponins», Poland , 14–17 September 2004, — 532 p.

10. *Zdor R.E.* Early infection and competition for nodulation of seybian by *B. japonicum* 123 and 138 / R.E. Zdor, S.G. Pueppke // Appl. and Environmental Microbiol. — 1988. — № 8. — P. 1996–2002.

11. *Hardy R.W., Holsten R.D., Jackson E.* Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation // Soil. Biol. and Biochem. — 1973. — Vol. 5, № 1. — P. 47–81.

12. *Ron E., Rosenberg E.* Natural roles of biosurfactants // Env. Microbiology. — 2001. — Vol. 3, № 4. — P. 229–236.

13. *Пат. 71792 А* Україна 7 С12N1/02 С12R1:38. Поверхнево-активний біопрепарат / О.В. Карпенко, Н.Б. Мартинюк, О.Н. Шульга, Н.С. Щеглова. — заявл. 25.12.2003; опубл. 15.12.2004, Бюл № 12.



Н.С. Щеглова¹, О.В. Карпенко¹, Р.И. Вильданова¹, М.В. Пристай¹,
Н.Е. Лисова², Т.М. Ногина³

¹ Отделение физико-химии горючих ископаемых ИнФОУ им. Л.М. Литвиненко НАН Украины, ул. Научная, За, Львов, 79053, Украина, тел.:+38 (032) 264 07 40, e-mail: e.v.karpenko@gmail.com

² Институт земледелия и животноводства западного региона УААН, с. Оброшино, Пустомитовского р-на Львовской обл.

³ Институт микробиологии и вирусологии имени Д.К. Заболотного НАН Украины, ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ФОРМИРОВАНИЕ СИМБИОЗА *SYNORHIZOBIVM MELILOTI* С ЛЮЦЕРНОЙ

Реферат

Установлено, что биогенные поверхностно-активные вещества (трегалозолипиды, рамнолипидный биокомплекс) в составе бактериальных препаратов *S. meliloti* ЛН11 стимулируют формирование симбиоза ризобий с люцерной (сорт Роксолана). Исследованы разные способы получения комплексных препаратов: внесение биогенных ПАВ в питательную среду роста ризобий или непосредственно в бактериальную суспензию. При бактеризации семян полученными препаратами возрастает нодуляционная активность ризобий, надземная и корневая масса растений. Показано, что наиболее эффективными были препараты *S. meliloti* ЛН11, в состав которых входили трегалозолипиды. Предложен оптимальный способ получения комплексных препаратов – внесение трегалозолипидов (0,01 г/л) при культивировании ризобий.

Ключевые слова: *Synorhizobium meliloti*, люцерна, биоПАВ, рамнолипидный биокомплекс, трегалозолипиды, нодуляционная активность.



**N.S. Shcheglova¹, O.V. Karpenko¹, R.I. Vildanova¹, M.V. Prystay¹,
N.Yu. Lisova², T.M. Nogina³**

¹ Department of Physical Chemistry of Combustible minerals of Lytvynenko Institute of Physical-Organic Chemistry and Coal Chemistry NASU, 3а, Naukova str., Lviv, 79053, Ukraine, tel.:+38 (032) 264 07 40, e-mail: e.v.karpenko@gmail.com

² Institute of agriculture and animal breeding of Western region of Ukraine, Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, 81115 Obroshyno, Pustomyivskiyi district, Lviv region, Ukraine

³ Zabolotny Institute of Microbiology And Virology NASU, 154, Acad. Zabolotny str., Kyiv, MSP, GO3680, Ukraine

INFLUENCE OF BIOGENIC SURFACE-ACTIVE SUBSTANCES ON FORMATION OF SYMBIOSIS *SYNORHIZOBIUM MELILOTI* WITH ALFALFA

Summary

The influence of biogenic surface-active substances (biosurfactants) – rhamnolipid biocomplex and trehalodolipid in the composition of bacterial preparations on the formation of symbiosis *S. meliloti* LN11 – alfalfa (variety Roksolana) was determined. It was shown that in spite of the way of biosurfactants application (introduction into the nutrient medium when culturing *S. meliloti* or introduction in inoculum when bacterizing seeds) the aboveground and root mass of alfalfa increased as well as nodulation activity of root nodules. The specificity of the biosurfactant effect depending on their chemical structure was ascertained: the greatest efficiency was performed by *S. meliloti* LN11 preparations, included trehalosolipids. It was shown that the best way of modification of biopreparations is addition of trehalosolipids into the nutrient medium when culturing rhizobia at concentration of 0.01 g/L.

Key words: *Synorhizobium meliloti*, alfalfa, biosurfactants, rhamnolipid biocomplex, trehalosolipids.

