

УДК 579.841.222

**СТИМУЛЯЦІЯ БІОСИНТЕЗУ ПОЛІСАХАРИДІВ
КУЛЬТУРИ *ENTEROBACTER SP.*****Н. Щеглова*, Н. Лісова**, О. Карпенко***

*Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України
вул. Наукова, 3а, Львів 79060, Україна
e-mail: biotech@org.lviv.net

**Інститут землеробства і тваринництва західного регіону УААН
вул. Грушевського, 5, смт Оброшино,
Пустомитівський р-н, Львівська обл. 81115, Україна

Встановлено, що додавання у поживне середовище біогенних поверхнево-активних сполук (біоПАР) і цитрату натрію стимулює біосинтез екзополісахаридів (ЕПС) штамом *Enterobacter sp.* Вихід ЕПС підвищується на 13–19% при модифікації середовища росту біоПАР і на 36 та 48% – з цитратом і сукцинатом натрію, відповідно. При цьому підвищується емульгувальна активність культуральної рідини ентеробактера та стабільність емульсій у часі. При гетерофазному культивуванні вказаних бактерій у присутності глауконітових сорбентів біомаса зростає на 11–12% та синтез ЕПС на 10–15% залежно від концентрації глауконіту, та на 23–30% при комплексному внесенні біоПАР і глауконіту у середовище росту.

Ключові слова: *Enterobacter*, біоПАР, глауконіт, екзополісахариди.

Азотфіксувальні мікроорганізми роду *Enterobacter sp.* широко розповсюджені в ризосфері злакових та інших рослин. Ці бактерії значно підвищують урожайність ряду сільськогосподарських рослин завдяки асоціативній азотфіксації та фосфатмобілізуючій активності. Виділені останнім часом фосфатмобілізуючі бактерії *Enterobacter nimipressuralis*, що застосовуються у зрешувальному землеробстві, дали змогу підняти врожайність кукурудзи на 2,7 ц/га, рапсу – на 1,1 ц/га [7]. Ефективність біодобрив (біопрепаратів), які виготовляються на основі високоактивних асоціативних мікроорганізмів-азотфіксаторів і застосовуються в сільському господарстві, залежить від багатьох чинників. Зокрема, важливу роль у процесах нодуляції бобових рослин відіграють полісахариди, що синтезуються бульбочковими бактеріями. Поверхневі полісахариди, що оточують бактерію, мають багато важливих функцій. Вони можуть виступати у ролі протекторів: ізолювати мікробну клітину від корневих виділень або створювати опір антимікробним речовинам, формувати в'язкий дифузійний бар'єр [4]. Інформації про роль мікробних полісахаридів у асоціативних системах із рослинами в літературі недостатньо. Показано, що виділений з ґрунту штам *Enterobacter cloacae*, який стимулює ріст рослин, синтезує від 0,6 до 1,2 г/л полісахаридів. Інокуляція насіння цим штамом прискорює ріст рослин (приріст кореневої та зеленої маси, продуктивності рослин). Заслуговує уваги, що обробка насіння чистими полісахаридами має той самий ефект, що й обробка інокулятом *Enterobacter cloacae*. Стимулювальний вплив мікробного препарату й ЕПС на рослини зберігався також і при внесенні цих препаратів у ґрунт [5].

Встановлено вплив полісахаридів різного походження (мікробні, рослинні, тваринні) на проростання насіння і розвиток здорової кореневої системи, ріст рослин і змі-

цення опору до інфекцій. Цей ефект досягається обробкою насіння препаратами, що містять полісахарид і/або протеїн. Найбільший позитивний вплив на рослини мали такі полісахариди: крохмальні декстрини, пектин, гуміарабік, целюлоза, карагінін, альгінати і їхні суміші [8].

За нашими попередніми даними, кількість полісахаридів, що утворює асоціативний діазотроф *Enterobacter* sp., впливає на нагромадження зеленої маси ярого ячменю. Тому доцільно встановити можливість підвищення синтезу полісахаридів цієї культури при модифікації середовища росту різноманітними модуляторами.

Серед чинників, які можуть стимулювати синтез екзополісахаридів у мікроорганізмів, особливої уваги заслуговують біогенні поверхнево-активні речовини. БіоПАР мають здатність регулювати проникність клітинних мембран, впливати на метаболічні процеси клітин [9]. Відомо, що застосування глинистих мінералів та високодисперсних сорбентів (насамперед природних) також впливає на активність мікроорганізмів-азотфіксаторів. Це обумовлено їх здатністю активізувати метаболізм мікроорганізмів, регулювати водно-сольовий баланс, впливати на інтенсифікацію ферментативних процесів [6]. Становило також інтерес дослідити вплив на синтез ЕПС цитрату й сукцинату як потенційних стимуляторів біосинтезу вторинних метаболітів [1].

Метою нашої роботи було вивчити вплив біоПАР, глауконіту, сапонінів, цитрату й сукцинату на ріст і синтез ЕПС асоціативним діазотрофом *Enterobacter* sp.

Поверхнево-активні речовини, що використані в дослідженнях: рамноліпіди (RL) та біокомплекс (суміш рамноліпідів і полісахаридів) є продуктами біосинтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17; трегалозоліпіди (TL), продуцентом яких є штаму *Rhodococcus erythropolis* 140; сапоніни – рослинні ПАР, виділені з насіння озимої вики.

Глауконіт (ТУУ02497915.001-2001) є глинистим мінералом, належить до групи гідролюд підкласу шаруватих силікатів. До його складу входять іони калію, заліза, магнію, алюмінію, фосфору, кальцію та широкий спектр мікроелементів.

У роботі використовували високоактивний азотфіксувальний штаму *Enterobacter* sp. Штаму культивували на манітно-дріжджовому середовищі (МД, г/л): KH_2PO_4 – 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,4; NaCl – 0,1; CaCO_3 – сліди; маніт – 10,0; дріжджовий екстракт (“Difco”) – 0,5; рН – 6,8–7,0. Суміш мікроелементів за Федоровим [10] додавали до середовища МД. Вказане середовище модифікували додаванням біоПАР, глауконіту, натрію цитрату і натрію сукцинату.

Біомасу клітин *Enterobacter* sp. визначали гравіметрично [3] та спектрофотометрично на КФК-2 при 540 нм у кюветах 5 мм.

Полісахариди виділяли з культуральної рідини осадженням 2 об'ємами ізопропілового спирту. Концентрацію полісахаридів встановлювали ваговим і спектрофотометричними методами із застосуванням фенолу та сірчаної кислоти [11]. Оптичну густина розчинів вимірювали на КФК-2 при 490 нм.

Емульгуювальну активність препаратів визначали за методом [2] у нашій модифікації: 10 мл культуральної рідини перемішували з 10 мл рослинної олії впродовж 2 хв на гомогенізаторі “Ми-2”. Визначали індекс емульгування (E_{24}) як величину відношення висоти емульсійного шару до загальної висоти рідини. Для характеризування стійкості емульсії в часі індекс емульгування визначали також через 2 тижні ($E_{2 \text{ тиж}}$).

Встановлено стимулюючий вплив цитрату і сукцинату натрію, біоПАР та суміші цих чинників на ріст, синтез полісахаридів, індекс емульгування *Enterobacter* sp. у рідкому середовищі МД (табл. 1).

Таблиця 1

Ріст і синтез ЕПС культурою *Enterobacter* sp. на модифікованих середовищах

Варіант	Біомаса, г/л	Полісахарид, г/л	E ₂₄ , %	E _{2 тиж.} , %
Контроль	1,15±0,01	1,50±0,01	80	60
Цитрат натрію (2 г/л)	1,10±0,02	2,05±0,02	100	95
Цитрат натрію (2 г/л) + мікроелементи	1,30±0,02	2,50±0,01	100	100
Цитрат натрію (2 г/л) + R1 (0,1 г/л)	1,28±0,01	2,02±0,02	100	95
Цитрат натрію (2 г/л) + (R1 0,1 г/л) + мікроелементи	1,28±0,01	2,58±0,01	100	95
Рамноліпіди (0,1 г/л)	1,22±0,01	1,70±0,01	90	80
Біокомплекс (0,1 г/л)	1,25±0,01	1,78±0,01	95	85
Біокомплекс (0,1 г/л) + цитрат натрію (2 г/л)	1,25±0,02	2,37±0,02	100	090
Сапоніни (0,1 г/л)	1,30±0,01	1,80±0,01	85	75
Сукцинат натрію (2 г/л)	1,35±0,01	2,22±0,01	90	60

Аналіз результатів експерименту свідчить, що внесення до середовища росту поверхнево-активних рамноліпідів та біокомплексу в концентрації 0,1 г/л практично не впливає на ріст біомаси мікроорганізмів, але збільшує синтез полісахаридів на 13% для рамноліпідів і на 19% – для біокомплексу. Застосування рослинних ПАР сапонінів, що були виділені з насіння вики, стимулювали як приріст біомаси *Enterobacter* sp., так і синтез полісахаридів на 13 та 20%, відповідно. Значний вплив на збільшення синтезу полісахаридів має додавання до середовища цитрату натрію (2,0 г/л), а також сумісне внесення цитрату натрію з мікроелементами. При цьому синтез полісахаридів збільшувався на 36 і 66%, відповідно. Також значно зростає стійкість емульсії у часі. Індекс емульгування протягом двох тижнів практично не змінювався.

Визначено вплив глауконіту при додаванні до поживного середовища на ріст і синтез полісахаридів бактерій *Enterobacter* sp. Результати експерименту представлені в табл. 2.

Встановлено, що за концентрації глауконіту у середовищі 1,0–2,0 г/л спостерігається приріст біомаси *Enterobacter* sp. на 11–12% і збільшення синтезу полісахаридів на 10–15%.

Найбільший стимулюючий вплив на вихід ЕПС спричиняло сумісне додавання біоПАР (рамноліпіди і трегалозоліпіди) з глауконітом до середовища росту бактерій. Збільшення виходу ЕПС становило 23–30% за концентрації глауконіту 1,0 г/л та біоПАР 0,1 г/л (рис. 1).

Узагальнюючи результати експериментів за впливом різних чинників на ріст *Enterobacter* sp. та синтез екзополісахаридів, слід визначити, що внесення поверхнево-активних рамноліпідів, трегалозоліпідів і біокомплексу в концентрації 0,1 г/л практично не впливає на приріст біомаси *Enterobacter* sp., але синтез полісахаридів збільшується в середньому на 13% – для рамноліпідів; 15% – для трегалозоліпідів і на 19% – при внесенні біокомплексу. Додавання глауконіту (1,0–2,0 г/л) у поживне середовище спричиняє стимуляцію росту бактерій *Enterobacter* sp.

Таблиця 2

Вплив глауконіту на ріст біомаси та синтез полісахаридів *Enterobacter* sp.

Варіант	Біомаса, г/л	Полісахариди, г/л
Контроль	1,26±0,01	0,52±0,01
Глауконіт (1,0 г/л)	1,41±0,02	0,60±0,02
Глауконіт (2,0 г/л)	1,40±0,01	0,57±0,02
Глауконіт (5,0 г/л)	1,35±0,01	0,54±0,02
Глауконіт (10,0 г/л)	1,25±0,01	0,51±0,01

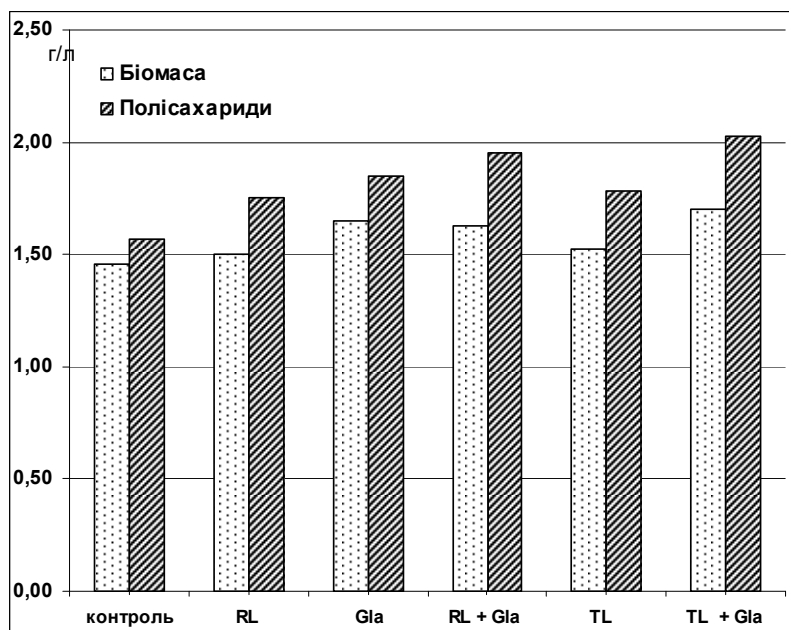


Рис. 1. Вплив біоПАР та глауконіту (Gla) на ріст і синтез ЕПС культурою *Enterobacter* sp.

на 11–12% та синтез полісахаридів на 10–15% залежно від концентрації глауконіту. Сумісне застосування біоПАР (0,1 г/л та глауконіту (1,0 г/л) збільшує вихід ЕПС на 23–30%. Значний ефект стимуляції виходу полісахаридів спричиняє додавання до середовища росту культури *Enterobacter* sp. цитрату і сукцинату натрію (2,0 г/л) – на 36 і 48% відповідно. Ефект збільшується за сумісного внесення цитрату натрію з мікроелементами та суміші цитрату натрію з мікроелементами і рамноліпідами (0,1 г/л). Вихід полісахаридів при цьому становить 66 та 72% відповідно.

Отримані результати мають як теоретичне, так і практичне значення, і можуть бути використані для створення вискоєфективних комплексних препаратів-біодобрив для сільського господарства, а також нових екологічно безпечних біополімерів широкого спектру застосування.

1. Елисеєв С. А., Кучер Р.В. Поверхностно-активные вещества и биотехнология. К.: Наук. думка, 1991. С. 18–36.
2. Йозеф Сеги. Методы почвенной микробиологии. М.: Колосс, 1983. 271 с.
3. Кореман И. М. Методы определения органических соединений. М.: Химия, 1970. 343 с.
4. Курдиш И. К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. К.: КВЦ, 2001. 142 с.
5. Патица В. П., Коць С. Я., Волкогон В. В. та ін. Біологічний азот. К.: Світ, 2003. С. 105–125.
6. Пат. 0256001 США. Method For Treating Crops to Enhance Plant Performance. R.Smith, A. Jabar Jr. Заявл. 14.10.2003. Опубл. 17.11.2005. 5 с.
7. Пат. 5,360,737 США. *Enterobacter cloacae* Ferm BR1529 Having Plant growth acceleratory activity. Tacafumi Ischii, Tacashi Adachi, Toshio Yasumura; Shinji Miyadoh Hidemasa Hidata all of Kanadawa, Japan. Заявл. 02.10.1993. Опубл. 01.11.1994. 7 с.

8. Шульга А. Н., Карпенко Е. В., Елисейев С. А. и др. Внеклеточные липиды и поверхностно-активные свойства бактерии *Rhodococcus erythropolis* в зависимости от источника углеродного питания // Микроб. 1990. Т. 59. № 3. С. 443–447.
9. Gutnick D. L., Minas W. Perspectives on microbial surfactants // Biochem. Society Transactions. 1987. Vol. 15. P. 225–355.
10. Hommel R., Sturwer O., Stuber W., Haferburg D., Kleber H.-P. Production of water-acide exopolipids by *Torulopsis apicola* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987. Vol. 26. P. 199–205.
11. Leigh J. A., Cople D. L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions // Annu. Rev. Microbiol. 1992. Vol. 46. P. 307–346.

**STIMULATION OF BIOSYNTHESIS OF POLYSACCHARIDES
OF THE STRAIN *ENTEROBACTER* SP.**

N. Shcheglova*, N. Lisova, O. Karpenko***

*Department of Physical-Organic Chemistry Institute of NAS of Ukraine
3a, Naukova St., Lviv 79060, Ukraine

**Institute of Agriculture and Stockbreeding of West Region UAAS
5, Hrushevskiy St., v. Obroshyno, Lviv District 81115, Ukraine

It was determined that the addition of biogenous surface-active substances (biosurfactants) and sodium citrate to the nutrient medium stimulates the biosynthesis of exopolysaccharides (EPS) by strain *Enterobacter* sp. The EPS yield increases on 13–19% when modifying the growth medium with biosurfactants, on 36–48% – when adding sodium citrate and sodium succinate respectively. The emulsifying activity (E_{24}) of *Enterobacter* sp. cultural broth as well as stability of emulsions in time increased. The biomass increased on 11–12% and the EPS synthesis increased on 10–15% during the heterophase cultivation of the mentioned bacteria in presence of glauconite sorbents, and on 23–30% when adding biosurfactants with glauconites into the growth medium.

Key words: *Enterobacter*, biosurfactants, glauconite, exopolysaccharides.

Стаття надійшла до редколегії 07.07.08

Прийнята до друку 02.10.08