

Н. І. Корецька¹, І. В. Карпенко¹, Т. В. Плотникова², Є. М. Тютюнникова²,
Г. Г. Мідяна¹, В. І. Лубенець³

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

²ФГБНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт табака,
махорки и табачных изделий”,

³Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук,
фармації і біотехнології

ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ БІОГЕННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ТА ЕТИЛТІОСУЛЬФАНІЛАТУ У ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОЩУВАННЯ ТЮТЮНУ

© Корецька Н. І., Карпенко І. В., Плотникова Т. В., Тютюнникова Є. М.,
Мідяна Г. Г., Лубенець В. І., 2015

Вивчено вплив біологічно активних речовин на ростові показники та врожайність тютюну у дрібноділянкових дослідах та в польових умовах. Досліджено рамноліпідний біокомплекс штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, трегалозоліпідні ПАР, синтезовані штамом *R. erythropolis* Au-1, а також біоцид етилтіосульфанілат, розчини яких застосовували для замочування насіння перед висівом та для оброблення рослин. За комплексного використання обох методів спостерігався приріст врожаю тютюну на 8 – 28 % залежно від досліджуваної речовини.

Ключові слова: рамноліпідний біокомплекс, трегалозоліпідни, етилтіосульфанілат, тютюн.

The influence of biologically active substances (BAS) on growth parameters and tobacco crop yield in small-lot experiments and afield was studied. Rhamnolipid biocomplex of the *Pseudomonas* sp. PS-17 strain, trehalose lipid SAS, synthesized by the *R. erythropolis* Au-1 strain, as well as biocide ethylthiosulfanilate, whose solutions were used for soaking the seeds before sowing and for treatment of plants, were studied. In case of an integrated use of both methods, there was an 8-28 % increase in tobacco yield depending on the plant considered.

Key words: rhamnolipid biocomplex, trehalose lipids, ethylthiosulfanilate, tobacco.

Постановка проблеми і її зв'язок з важливими науковими завданнями. Тютюн є харчосмаковим продуктом, тому технологія його вирощування повинна бути екологічно безпечною. У зв'язку з цим у технологічну схему вирощування тютюну доцільно вводити біологічно активні речовини (БАР). Вони повинні бути насамперед низькотоксичними, біодеградабельними та застосовуватися в низьких концентраціях, що виключає забруднення навколишнього середовища. БАР можуть бути стимуляторами росту рослин і, що важливо, сприяти активуванню імунної системи рослин, що дає змогу зменшити кількість хімічних пестицидів для обробки тютюну. Особливо актуальне застосування БАР в періоди, коли рослина є найвразливішою до шкідливих організмів, технологічних і погодних стресів.

Технологія вирощування тютюну починається з одержання розсади. Це дуже відповідальний етап, оскільки своєчасно отримані стандартні рослини з добре розвинутою кореневою системою є запорукою високого і якісного врожаю. У парниковий період розсада найчастіше піддається впливу погодних умов, особливо, якщо її вирощування проводиться в парниках, що не опалюються. Це може призвести до затримки росту рослин, подовженню тривалості розсадного періоду, прогресуванню корневих і стеблових гнилей. Крім того, складним етапом вегетації тютюнової рослини є період приживлення розсади в полі після висадки. Включення в агротехнологію тютюну новітніх розробок біотехнології – біологічно активних речовин – допоможе вирішити ці актуальні завдання.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Відомо, що біогенні поверхнево-активні речовини (біоПАР) є низько токсичними і біодеградабельними, впливають на проникність клітинних мембран та активність ферментів [1]. Завдяки таким властивостям біоПАР здатні стимулювати ріст та розвиток рослин [2], покращувати поглинання мінеральних елементів рослинами [3] та можуть володіти здатністю підвищувати стійкість рослин до стресових умов та фітопатогенів [4]. У лабораторії біотехнології Відділення фізико-хімії ГК ІнФОВ ім. Л. М. Литвиненка НАН України отримано та вивчено поверхнево-активні речовини, які є продуктами мікробного синтезу штамів *Pseudomonas sp.* PS-17 та *R. erythropolis* Au-1 [5, 6]. Досліджується можливість впровадження даних біоПАР у агротехнології.

Етилтіосульфанілат (ЕТС) – синтетичний структурний аналог природних фітонцидів часнику та цибулі. ЕТС синтезовано у лабораторії кафедри ТБСФБ ІХХТ Національного університету “Львівська політехніка”. Попередньо обґрунтовано та експериментально доведено його фунгіцидні та бактерицидні властивості [7, 8]. Також наявні дані про стимулювальний вплив тіосульфонатів на ріст рослин та їх стійкість до фітопатогенів [9].

Мета роботи. Метою роботи є дослідження впливу поверхнево-активних речовин мікробного походження та етилтіосульфанілату на морфометричні показники та врожайність тютюну.

Матеріали і методи досліджень. Об’єкти досліджень – біологічно активні речовини (БАР): 1) поверхнево-активний рамноліпідний біокомплекс (РБК), що складається з рамноліпідів і полісахариду (4:1), – продукт біосинтезу штаму *Pseudomonas sp.* PS-17; 2) трегалозоліпідні ПАР (ТЛ ПАР) синтезовані штамом *R. erythropolis* Au-1; 3) етилтіосульфанілат.

РБК виділяли з супернатанту культуральної рідини штаму *Pseudomonas sp.* PS-17, шляхом додавання 10N HCl до рН 3,0 [10].

Трегалозоліпідні ПАР отримували методом екстракції з клітинної маси штаму *R. erythropolis* Au-1 сумішшю Фолча (хлороформ:метанол – 2:1) з подальшим випарюванням у вакуумі [6].

ЕТС одержували із 4-ацетиламінобензенсульфохлориду окисно-відновною взаємодією з натрій сульфідом і наступним алкілуванням одержаного натрій тіосульфанілату етил бромідом [9].

Для вивчення впливу отриманих поверхнево-активних продуктів бактерій та ЕТС на ріст і врожайність тютюну було проведено ряд дрібноділянкових та польових експериментів.

Для дослідження використовували насіння тютюну сорту Ювілейний новий 142, отриманого в ФГБНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт табака, махорки и табачных изделий”, м. Краснодар, Росія.

Насіння перед посівом замочували у розчинах досліджуваних речовин, ефективна концентрація яких була попередньо встановлена при пророщуванні в лабораторних умовах: 0,001 % при експозиції 3 години і 0,005 % – 1 година. Висаджували в парнику на ділянки площею 1 м² Позакореневе оброблення здійснювали за фазами розвитку розсади “вушка” і “готова до висадки” – проводили повне змочування надземної частини рослин робочими розчинами БАР (в тих самих концентраціях, що і передпосівне оброблення насіння) в кількості 1 л/м². Якість розсади в парнику визначали за кожним варіантом за такими показниками: довжина рослини (до точки росту і до кінця витягнутих листків), діаметр стебла над кореневою шийкою, сира маса надземної і кореневої частини 25 рослин.

Для вивчення ефективності застосування БАР на врожай і якість тютюну проводили польові експерименти на дослідно-селекційній ділянці інституту. Закладання досліду здійснювали відповідно до “Методичних вказівок по проведенню польових агротехнічних дослідів з тютюном (*Nicotiana tabacum* L.)” [11]. Догляд за тютюном проводили згідно із “Рекомендаціями щодо вирощування тютюну на Північному Кавказі” [12]. У польовому досліді визначали висоту рослин (за фазами розвитку), площу листя середнього ярусу на 25 рослинах (встановлювали за таблицями Губенко) [13] і врожайність культури (ц/га). Урожай збирали вручну по мірі дозрівання листків і розраховували для кожної ділянки досліду. Повторність дослідів чотирьох кратна.

Результати та обговорення. Результати проведених експериментів підтверджують доцільність комплексного застосування передпосівного замочування насіння з подальшим позакореневим обробленням розчинами БАР. Високу ефективність щодо росту та розвитку тютюну показав ЕТС у концентрації 0,005 %. Так, довжина рослин до точки росту і до кінця витягнутих листків за цим варіантом досліду перевищила контроль на 68 і 24 %, сира маса надземної і кореневої частин рослин збільшилася на 57 % і 40 % відповідно (табл. 1).

Таблиця 1

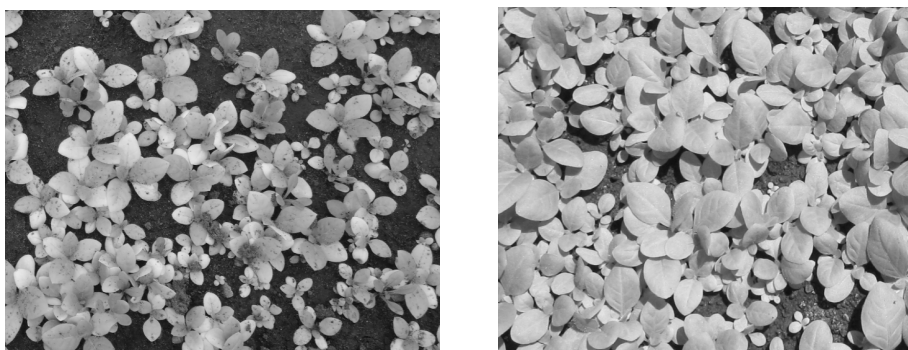
Вплив БАР на формування розсади тютюну

Варіант досліду	Висота рослини, см		Діаметр стебла над кореневою шийкою, мм	Маса (сира), г	
	до точки росту	до кінця витягнутих листків		стебла	Кореня
Контроль	6,3±0,4	15,6±0,9	3,9±0,2	85,1±4,3	6,4±0,4
РБК 0,001 %	9,4±0,6	18,4±1,1	4,5±0,2	94,8±4,9	7,0±0,4
РБК 0,005 %	7,2±0,5	16,6±1,0	4,5±0,2	88,9±4,4	6,8±0,4
ЕТС 0,001 %	9,1±0,6	17,9±1,1	4,4±0,3	92,5±4,6	7,0±0,4
ЕТС 0,005 %	10,6±0,7	19,3±1,1	4,6±0,3	133,6±6,9	9,0±0,5
ТЛ ПАР 0,001 %	6,9±0,4	15,7±0,9	4,3±0,2	87,5±4,8	6,8±0,4
ТЛ ПАР 0,005 %	9,8±0,6	18,8±1,1	4,5±0,3	94,8±5,2	7,4±0,5

Хорошими є результати у розсади, обробленої розчинами трегалозоліпідних ПАР у концентрації 0,005 %. За цим варіантом довжина рослин від точки росту і до кінця витягнутих листків відповідно зростала на 56 % і 21 %, маса надземної та кореневої частини рослин – на 11 % і 16 %.

Позитивний вплив проявив також рамноліпідний біокомплекс в концентрації 0,001 %: довжина рослин від точки росту і до кінця витягнутих листків відповідно зростала на 49 % і 18 %, маса надземної та кореневої частини рослин – на 11 % і 16 %.

Варто зазначити, що використання БАР мало значну антипатогенну дію, яка проявлялася в зниженні рівня ураження тютюну розсадними гнилями. Так, кількість рослин, заражених мікозами за варіантами, коли вносили БАР, не перевищувала 5 %. При цьому за контрольним варіантом ураження рослин у середньому становило 50–70 % (рисунок).



Розсада тютюну у фазі “вушка” (ліворуч – здорова, праворуч – уражена кореневою гниллю в прихованій формі)

Так отримано якісну розсаду тютюну для подальшого висадження в поле. Також зазначено, що позакореневе оброблення розсади розчинами БАР (для пролонгації дії) перед відбором рослин вплинуло на подальший ріст і розвиток тютюну в польових умовах (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив БАР на ріст і розвиток тютюну в полі

Варіант досліджу	Висота рослини, см			Площа листя середнього ярусу, см ²	Урожайність, ц/га
	через 30 днів після посадки	у фазі інтенсивного росту	у кінці періоду вегетації		
Контроль	17,9±1,0	87,7±4,4	105,4±5,6	425,2±23,4	29,8±1,6
РБК 0,001 %	19,2±1,1	116,7±6,4	130,2±7,2	496,0±27,3	32,3±1,8
РБК 0,005 %	19,1±1,1	108,8±6,0	117,9±6,2	493,7±27,2	31,0±1,7
ЕТС 0,001 %	21,3±1,2	100,2±5,5	124,9±6,7	518,6±28,5	31,6±1,7
ЕТС 0,005 %	22,3±1,2	118,3±6,5	134,4±7,4	562,0±30,9	38,4±2,1
ТЛ ПАР 0,001 %	18,5±1,0	100,2±5,5	111,7±6,1	484,3±26,6	30,2±1,6
ТЛ ПАР 0,005 %	18,6±1,0	110,9±6,1	131,6±7,2	543,2±28,9	34,6±1,9

Кращими результати щодо рістстимуляції рослин були після використання етилтіосульфанілату в концентрації 0,005 %. Зазначено, що висота рослин до закінчення періоду вегетації за цим варіантом становила 134,4 см, що перевищувало дані контролю на 28 % (табл. 2). У цих рослин виявлено найбільшу площу поверхні листків – 562 см² (на 32 % більше контролю). ЕТС в концентрації 0,001 % також проявив високу ефективність на ріст рослин – їх висота до кінця періоду збору становила 125 см (перевищує контроль на 19 %), а площа листків – 519 см² (на 22 % більше контролю).

Високими були показники за впливу трегалозоліпідних ПАР. Висота рослин до кінця періоду вегетації перевищувала контрольні зразки на 6–25 % (залежно від концентрації досліджуваного розчину), площа листя – на 14–28 % (відповідно у концентрації 0,001 % та 0,005 % ТЛ ПАР).

Стимулювальний ефект також отримано при використанні РБК. Після оброблення розчином РБК (0,001 %) висота рослин перевищувала контрольні на 24 %, а площа листя збільшилась на 17 %. При використанні препарату в концентрації 0,005 % показники становили відповідно 12 % і 16 %.

Узагальнюючим показником впливу БАР на тютюн є врожайність цієї культури. Варто зазначити, що всі вказані відмінності в зростанні і розвитку рослин позначились на продуктивності кожного з варіантів. Так, застосування ЕТС в період розсади за концентрації 0,005 % дало змогу отримати достовірний приріст ($HCp_{0,5} = 1,8$), забезпечивши підвищення врожайності на 8,6 ц/га (29 %), ТЛ ПАР (0005 %) – на 4,8 ц/га (16 %) та РБК (0,001 %) – на 2,4 ц/га (8 %) (табл. 2). На інших варіантах встановлено незначне зростання врожайності культури.

Отже, досліджувані біологічно-активні речовини стимулювали ріст та розвиток тютюну, сприяли формуванню здорової і якісної розсади та дозволили підвищити врожайність культури.

Висновки. 1. Встановлено, що досліджені біологічно активні речовини є стимуляторами росту та розвитку тютюну: морфометричні показники обробленої досліджуваними речовинами розсади зростали на 11–68 % порівняно з контролем. У польових умовах така тенденція зберігалась: ростові параметри за впливу БАР перевищували контрольний варіант на 6–28 %.

2. Показано, що посів попередньо обробленого насіння розчинами БАР в комплексі з дворазовим позакореневим обробленням розсади на стадіях розвитку “вушка” та “готова до висадки” сприяє зниженню ураженості рослин патогенною інфекцією. Це забезпечує формування здорової і якісної розсади.

3. Визначено, що за використання БАР підвищується урожайність тютюну. Після висаджування розсади з відповідних ділянок парника в поле відмічено, що на варіантах із застосуванням ЕТС і ТЛ ПАР в концентрації 0,005 % і РБК (0,001 %) врожайність становила 38,4 ц/га, 34,6 ц/га і 32,3 ц/га, при цьому дані перевищили контроль на 28 %, 16 % і 8 % відповідно.

5. Показано, що етилтіосульфат і поверхнево-активні продукти синтезу штамів *Pseudomonas sp.* PS-17 та *R. erythropolis* Au-1 є перспективними для використання у технології вирощування тютюну.

1. Banat I. M, Makkar R. S, Cameotra S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 53(5):495-508. 2. Карпенко О. В., Корецька Н. І., Щеглова Н. С., Карпенко І. В., Баранов В. І. Стимулювання росту злакових рослин поверхнево-активними рамноліпідами // *Biotechnologia Acta*. – 2013. – Т.6. – №6. – С. 94 – 99. 3. Корецька Н. І., Карпенко О. В., Баранов В. І. Вплив препарату трегалозоліпідів на поглинання калію та кальцію проростками сої та пшениці // *Матеріали наукової конференції “Стан і біорізноманіття екосистем Шацького національного природного парку”, 12–15 вересня 2013р.* – Львів: Сполом. – С.38. 4. Benincasa M, Abalos A, Oliveira I et al. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Antonie van Leeuwenhoek* 2004; 85:1-8. 5. Оптимальные методы выделения биогенных поверхностно-активных рамнолипидов / Е. В. Карпенко, Т. Я. Покинъброда, Р. Г. Макитра, Е. Я. Пальчикова // *Журнал общей химии*. – 2009. – Т. 12 – С. 2011 – 2014. 6. Koretska N., Prystai M., Karpenko E. Rape phosphatide concentrate in the technologies of surfactants production by the Actinobacteria // *Ukrainian Food Journal*. – 2014 – V. 3. – Issue 3. – P. 429 – 436. 7. Lubenets Vira, Karpenko Olena, Ponomarenko Mykola, Zahoriy Gleb, Krychkovska Aelita, Novikov Volodymyr Development of new antimicrobial compositions of thiosulfonate structure // *Chemistry & Chemical technology*. - 2013. – 119-124. 8. Anna Sotirova, Tatyana Avramova, Stoyanka Stoitsova, Irina Lazarkevich, Vera Lubenets, Elena Karpenko, Danka Galabova. The importance of rhamnolipid- biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates // *Curr. Microbiol.*, 2012, Vol. 65, № 5, P.534–541. 9. Болдырев Б. Г., Былосор Т. К., Вязло Р. Й., Кожарский А. И., Лубенец В. И. и др. Противомикробная и физиологическая активность эфиров тиосульфокислоты возможные пути их практического использования в различных отраслях народного хозяйства. *Межвузовский сборник Биоповреждения в промышленности. Горький.* 1983. С. 44–52. 10. Карпенко И. В., Мидяна Г. Г., Карпенко Е. В., Пальчикова Е. Я., Макитра Р. Г. Экстракционное выделение биогенных поверхностно-активных рамнолипидов // *Журнал общей химии*. – 2014. – Т. 84. – С. 1172 – 1175. 11. Алехин С. Н., Саломатин В. А., Исаев А. П., Рудомаха В. П., Плотникова Т. В. [и др.]. *Методическое руководство по проведению полевых агротехнических опытов с табаком (Nicotiana tabacum L.)* / ГНУ ВНИИГТИ. – Краснодар, 2011. – 42 с. 12. Рекомендации по возделыванию табака на Северном Кавказе. – Краснодар, 1985. – 64 с. 13. Губенко Ф. П. Таблицы площадей листьев (группа третья) / – Симферополь: Гос. изд-во Крымской АССР, 1936. – 45 с.