

УДК 759.873.088.5:661.185

А.Д. Конон¹, аспірант

А.Б. Скочко¹, магістрант

Т.П. Пирог^{1,2}, доктор біол. наук

Г.О. Іутинська², член-кореспондент НАН України

¹Національний університет харчових технологій

²Інститут мікробіології і вірусології НАН України

МИКРОБНИ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИ РЕЧОВИНИ ЯК АНТИФІТОПАТОГЕННИ АГЕНТИ

Показано, що препарати поверхнево-активних речовин (ПАР) Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 проявляли антимікробну активність проти фітопатогенних бактерій (Xanthomonas campestris pv. campestris 8003, Pseudomonas syringae 8511, Xantomonas vesicatoria 7790, Pseudomonas corrugata 9070, Pseudomonas syringae pv. coronafaciens 9129, Pectobacterium carotovorum 8982). Ефективність антимікробної дії залежала від ступеня очищення препаратів.

Ключові слова: *Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, поверхнево-активні речовини, антимікробні властивості, фітопатогенні мікроорганізми, ступінь очищення препаратів*

МИКРОБНЫЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА КАК АНТИФИТОПАТОГЕННЫЕ АГЕНТЫ

Показано, что препараты поверхностно-активных веществ (ПАВ) Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 проявляли антимикробную активность против фитопатогенных бактерий (Xanthomonas campestris pv. campestris 8003, Pseudomonas syringae 8511, Xantomonas vesicatoria 7790, Pseudomonas corrugata 9070, Pseudomonas syringae pv. coronafaciens 9129, Pectobacterium carotovorum 8982). Эффективность антимикробного действия зависела от степени очистки препаратов.

Ключевые слова: *Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241, поверхностно-активные вещества, антимикробные свойства, фитопатогенные микроорганизмы, степень очищения препаратов*

MICROBIAL SURFACTANTS AS ANTIPHYTOPATHOGENIC AGENTS

It was shown that preparations of surface-active substances (SAS) of Acinetobacter calcoaceticus IMB B-7241 had antimicrobial effect against phytopathogenic microorganisms (Xanthomonas campestris

pv. *campestris* 8003, *Pseudomonas syringae* 8511, *Xantomonas vesicatoria* 7790, *Pseudomonas corrugata* 9070, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* 9129, *Pectobacterium carotovorum* 8982).
Efficiency of the antimicrobial activity depended on the purity of preparations.

Key words: *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241, surface-active substances, antimicrobial properties, phytopathogenic microorganisms, purity of preparations.

Надмірне використання хімічних пестицидів та хімічних добрив у сучасному сільському господарстві призводить до погіршення родючості ґрунтів, а також внутрішньоклітинного накопичення хімічних агентів і появи пестицид-стійких мутантів комах і рослин в усьому світі [9]. Щоб подолати ці проблеми, доцільно застосовувати засоби біоконтролю, які включають використання природних об'єктів – ефективних штамів мікроорганізмів і мікробних метаболітів, органічних добрив замість хімічних засобів боротьби зі шкідниками сільськогосподарських культур. Такі методи останнім часом привертають увагу як альтернатива хімічним пестицидам та добривам [9].

З літератури відомо, що ефективними антимікробними агентами є поверхнево-активні речовини (ПАР) мікробного походження, яким притаманна антибактеріальна та антифунгальна активність щодо широкого спектру мікроорганізмів [4, 10-12]. Найвідомішим є сурфактин синтезований різними штамми *Bacillus subtilis*, якому притаманна антимікробна дія [5, 9]. Наприклад, штами *B. subtilis* BS119 та K36p88 за рахунок продукування цього ліпопептиду пригнічували ріст *Colletotrichum gloeosporioides* (збудник антракнозу) на 88 % і 84 % відповідно [9], а за дії очищеного сурфактину в концентрації 160 мг/л повністю пригнічувався радіальний ріст *Aspergillus flavus* (колонізатор кукурудзи, бавовни і горіхів, продуцент мікотоксинів) [9].

Крім того, антифунгальна активність характерна для ітурину (продуцент *B. subtilis*) [5], бамілоцину А (*Bacillus amyloliquefaciem* LP03) [7] та ліпопептиду *B. subtilis* 20В [6] і *Bacillus* sp. ІВА 33 [8]. Бамілоцин А діяв на збудників захворювань цибулі, капусти, моркви, томатів, цукрового буряка (*Bolrytis cineria*), плодів і овочів (фузаріозу) і картоплі (*Fusarium oxysporum*), а також *Rhizoctonia solani* [7], а ліпопептид *B. subtilis* 20В – на фітопатогенні гриби *Chrysosporium indicum*, *Alternaria burnsii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium udum*, *Trichoderma herzanium* і *Rhizoctonia bataticola* [6]. Ліпопептид *Bacillus* sp. ІВА 33 виявився ефективним проти збудника псування лимонів *Geotrichum candidum* [8]. Суміш ітурину А, сурфактину та фенгіцину (продуцент *B. subtilis* RP 24) пригнічувала ріст різних фітопатогенних грибів (табл.1) [5].

Антагоністичний вплив *B. subtilis* RP 24 щодо фітопатогенних грибів

Гриби	Зона затримки росту, мм	Рослини-мішені
<i>Macrophomina phaseolina</i>	9,00 ± 0,82	Бавовник
<i>Pythium ultimum</i>	7,50 ± 0,72	Пшениця, капуста
<i>Pythium aphanidermatum</i>	8,25 ± 0,90	
<i>Rhizoctonia solani</i>	8,80 ± 0,78	Культури овочів
<i>Fusarium solani</i>	7,85 ± 0,83	Огірки
<i>Fusarium oxysporum</i>	8,25 ± 0,75	Бавовник, пшениця, кукурудза
<i>Fusarium moniliforme</i>	7,50 ± 0,71	
<i>Fusarium udum</i>	8,50 ± 0,83	
<i>Alternaria solani</i>	7,25 ± 0,71	Томати
<i>Alternaria alternata</i>	8,30 ± 0,84	
<i>Aspergillus niger</i>	8,50 ± 0,76	Пшениця

Таким чином, в літературі є велика кількість повідомлень про антифунгальну дію мікробних ПАР, проте на сьогодні актуальною є проблема боротьби з бактеріозами сільськогосподарських рослин.

У зв'язку з цим мета нашої роботи – дослідження антимікробної дії препаратів поверхнево-активних речовин *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241 щодо фітопатогенних бактерій.

Матеріали і методи

Основним об'єктом дослідження був штамп *Acinetobacter calcoaceticus* IMB В-7241, виділений із забрудненого нафтою зразку ґрунту і депонований в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології та вірусології за номером IMB В-7241 [3]; а також штамми *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8003, *Pseudomonas syringae* 8511, *Xanthomonas vesicatoria* 7790, *Pseudomonas corrugata* 9070, *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* 9129, *Pectobacterium carotovorum* 8289.

Встановлено, що штамп IMB В-7241 є продуцентом ПАР, які за хімічною природою є комплексом гліко-, аміно- та нейтральних ліпідів, причому гліколіпіди представлені трегалозоміколатами.

Культивування *A. calcoaceticus* IMB В-7241 здійснювали на рідкому мінеральному середовищі такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ – 0,35, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,1, NaCl – 1,0, Na_2HPO_4 – 0,6, KH_2PO_4 – 0,14, рН 6,8–7,0. Як джерело вуглецю використовували етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка). У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат – 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів – 0,1 % (об'ємна частка). Посівним матеріалом слугувала культура *A. calcoaceticus* IMB В-7241 з кінця експоненційної фази росту (48 год), вирощена на середовищі

наведеного вище складу. Для отримання посівного матеріалу використовувалися добові культури *A. calcoaceticus* IMB В-7241, вирощені на м'ясо-пептонному агарі при температурі 30 °С. Посівний матеріал вносили у концентрації 10 % від загального об'єму. Культивування проводили на качалках (320 об/хв, t=30 °С) впродовж 120 год.

Як препарати ПАР у експериментах використовували:

- 1) *препарат 1* – супернатант культуральної рідини (концентрація ПАР 0,28 мг/мл);
- 2) *препарат 2* – розчин ПАР, виділених із супернатанту (*препарат 1*) шляхом екстракції сумішшю Фолча (метанол:хлороформ 2:1).
- 3) *препарат 3* – водна фаза супернатанту (*препарату 1*), одержана після екстракції ПАР сумішшю Фолча.

Для одержання супернатанту (*препарат 1*) культуральну рідину центрифугували (5000 g, 45 хв). Для отримання *препарату 2* ПАР із супернатанту екстрагували сумішшю Фолча. Для цього 25 мл супернатанту поміщали в циліндричну ділильну воронку об'ємом 100 мл, додавали 16 мл суміші хлороформу і метанолу (2:1, суміш Фолча) і струшували (з метою екстракції ліпідів) протягом 5 хв. Отриману після екстракції суміш залишали в воронці для розділення фаз, після чого нижню фракцію збирали (органічний екстракт 1), а водну фазу піддавали повторній екстракції. При повторній екстракції до водної фази додавали 16 мл суміші Фолча і проводили екстракцію ліпідів протягом 5 хв. Після розділення фаз, збирали нижню фракцію і отримували органічний екстракт 2. На третьому етапі до водної фази додавали 25 мл суміші Фолча і здійснювали екстракцію, як описано вище, отримуючи органічний екстракт 3. Екстракти 1-3 змішували і упарювали на роторній випарній установці ИР-1М2 (Росія) при температурі 50 °С і абсолютному тиску 0,4–0,5 атм до постійної маси. Сухий залишок розчиняли у стерильному фосфатному буфері (рН 7,0) до початкового об'єму.

Усі препарати стерилізували при 112 °С упродовж 30 хв.

Визначення антимікробних властивостей препаратів поверхнево-активних речовин здійснювали так. У вихідній суспензії добових тест-культур, вирощених на агаризованому середовищі (сусло агар та м'ясо-пептонний агар у співвідношенні 1:1) при 30 °С, визначали кількість живих клітин за методом Коха (колоній-утворювальні одиниці, КУО/мл). Потім суспензію тест-культур вносили у пробірки по 1,5 мл, додавали по 1,5 мл досліджуваного препарату і витримували упродовж 1 і 2 год при температурі, оптимальній для росту тест-культури. Після експозиції визначали за методом Коха кількість живих клітин (з врахуванням змінення об'єму суспензії в результаті внесення супернатанту).

Вживання клітин визначали як відношення кількості живих клітин у зразках, підданих дії препаратів ПАР, до кількості клітин у вихідній суспензії і виражали у відсотках. Статистичну

обробку експериментальних даних проводили за Лакінім [2]. Достовірність результатів досліджень оцінювали згідно з *t*-критерієм Стьюдента при 5%-му рівні значимості.

Результати та їх обговорення

Раніше нами було встановлена антимікробна дія препаратів ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 у вигляді супернатанту культуральної рідини щодо умовно-патогенних бактерій та дріжджів, а також залежність антимікробної активності ПАР від фізіологічного стану тест-культур [1].

Наші наступні дослідження були присвячені вивченню антимікробної дії препаратів ПАР різного ступеня очищення щодо фітопатогенних бактерій-шкідників пасльонових (томатів, картоплі, баклажанів і перцю) та хрестоцвітних (ріпаку, капусти) рослин.

Порівняння активності препаратів 1 і 2 щодо досліджуваних тест-культур показало, що загалом очищені зразки були ефективніші, ніж неочищені (табл. 2 і 3).

Таблиця 2

Вплив препаратів ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 на ріст деяких представників роду *Xanthomonas*

Тест-культури	Препарати	Виживання клітин (%), через	
		1 год	2 год
<i>X. campestris</i> рв. <i>campestris</i> 8003	1	20±1,0	140±7,0*
	2	17,7±0,9	37,3±1,9
<i>X. vesicatoria</i> 7790	1	2±0,1	0
	2	0	0

Примітка. Кількість клітин *X. campestris* рв. *campestris* 8003 до внесення препаратів ПАР становила $3,9 \cdot 10^6$ КУО/мл, *X. vesicatoria* 7790 – $1 \cdot 10^5$ КУО/мл. «*» - стимуляція росту клітин. Тут і у табл. 3–5: кількість клітин у контрольних (не оброблених препаратами ПАР) варіантах не змінювалася упродовж 2 год експозиції.

Як видно із даних, наведених у табл. 2, препарати ПАР ефективніше діяли на *X. campestris* рв. *campestris* 8003 після 1 год обробки, знижуючи кількість живих клітин на 80–82,3 %. За внесення препаратів 1 і 2 у суспензію *X. vesicatoria* 7790 (збудник плямистої хвороби помідорів) вже через 1 годину експозиції спостерігали майже повну загибель клітин.

Наступні експерименти показали значне зниження виживання представників роду *Pseudomonas* за умови обробки препаратами 1 і 2 (табл. 3).

Таблиця 3

Виживання фітопатогенних псевдомонад за присутності препаратів ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241

Тест-культури	Препарати	Виживання клітин (%), через	
		1 год	2 год
<i>P. syringae</i> 8511	1	26,9±1,3	18,4±0,9
	2	34,9±1,7	9,2±0,5
<i>P. corrugata</i> 9070	1	92,9±4,6	96,5±4,8
	2	74,7±3,7	25,7±1,2
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> 9129	1	99,7±5,0	35,2±1,8
	2	34,4±1,7	32,8±1,6

Примітка. Кількість клітин *P. syringae* 8511 до внесення препаратів ПАР становила $3,0 \cdot 10^6$ КУО/мл, *P. corrugata* 9070 – $2,3 \cdot 10^7$ КУО/мл, *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9129 – $4,2 \cdot 10^5$ КУО/мл.

Результати, наведені у табл. 3, свідчать про яскраво виражену антимікробну дію супернатанту (препарат 1) і розчину ПАР (препарат 2) щодо досліджуваних псевдомонад. Так, за присутності препарату 1 кількість живих клітин *P. syringae* 8511 знижувалася на 73,1–81,6 %, препарату 2 – на 63,1–90,8 %. Виживання *P. corrugata* 9070 після обробки препаратом 1 становило 3,5–7,1 %, а препаратом 2 – на 25,3–74,3 %, залежно від часу експозиції. Після обробки препаратом 1 суспензії клітин *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9129 впродовж 1 год їх виживання знижувалося лише на 0,3 %, а із збільшенням тривалості обробки, а також за використання препарату 2 кількість клітин знижувалася на 64,8–67,2 %.

Ще одним об'єктом досліджень був представник роду *Pectobacterium* – штам *P. carotovorum* 8982. Встановлено, що препарати ПАР починали діяти лише після 2 год експозиції, знижуючи виживання клітин на 43–67 % залежно від ступеня очищення, причому препарат 2 виявився ефективнішим (табл. 4).

Таблиця 4

Антимікробна дія препаратів ПАР *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 щодо *P. carotovorum* 8982

Препарати	Виживання клітин (%) через	
	1 год	2 год
1	94±4,7	57±2,9
2	100±5,0	33±1,7

Примітка. Кількість клітин *P. carotovorum* 8982 до внесення препаратів ПАР становила $2,4 \cdot 10^7$ КУО/мл.

Зазначимо, що за дії препарату 3 (водної фази супернатанту після вилучення ПАР) майже на всі досліджувані тест-культури (*P. syringae* 8511, *X. vesicatoria* 7790, *P. corrugata* 9070, *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9129) спостерігали збільшення кількості клітин навіть на порядки (табл. 5). Ми припускаємо, що *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 продукує комплекс біологічно активних речовин (наприклад, фітогормонів), які залишаються у водній фазі після екстракції ПАР і можуть слугувати стимуляторами росту рослин. За внесення препарату 3 у суспензію *X. campestris* pv.

campestris 8003 та *P. carotovorum* 8982 спостерігали зниження кількості клітин фітопатогенних бактерій, що також може свідчити про синтез штамом ІМВ В-7241 метаболітів відмінних від ПАР, яким притаманна антимікробна дія. Вивченню цього питання будуть присвячені наші подальші дослідження.

Таблиця 5

Дія препарат 3 на деякі фітопатогенні бактерії

Тест-культури	Логарифм початкової кількості клітин	Логарифм кількості живих клітин через	
		1 год	2 год
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> 8003	6,3±0,32	6,1±0,31	6,0±0,30
<i>P. syringae</i> 8511	6,2±0,31	6,7±0,33	6,7±0,33
<i>X. vesicatoria</i> 7790	4,7±0,23	5,0±0,25	5,3±0,27
<i>P. corrugata</i> 9070	7,1±0,35	7,2±0,33	7,3±0,35
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> 9129	5,3±0,27	5,5±0,27	5,6±0,28
<i>P. carotovorum</i> 8982	7,38±0,36	7,29±0,36	7,30±0,36

Отже, нами було показано, що поверхнево-активним речовинам *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 притаманна антимікробна дія проти фітопатогенних бактерій родів *Pseudomonas* та *Xanthomonas*, які є збудниками плямистих бактеріозів пасльонових та хрестоцвітих рослин. Препарати у вигляді супернатанту і розчину очищених ПАР знижували виживання клітини фітопатогенних штамів – *X. campestris* pv. *campestris* 8003 на 0,2–82,3 %, *P. syringae* 8511 – на 65,1–90,8 %, *X. vesicatoria* 7790 – на 98–100%, *P. corrugata* 9070 – на 4,5–74,3 %, *P. syringae* pv. *coronafaciens* 9129 – на 64,6–67,2 %, залежно від тривалості обробки; при цьому очищені препарати ПАР виявилися ефективнішими.

Список літератури

1. Антимікробные свойства биосурфактантов *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 и *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 / А.Д. Конон, А.П. Морозова, Т.П. Пирог, А.Б. Скочко // VII межд. конф. «Современное состояние микробиологии и биотехнологии» (Минск, Беларусь, 31 мая – 4 июня 2010 г.): тез. док. – Минск, 2010. – С. 357–359.
2. Биометрия / Лакин Г.Ф. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

3. Влияние условий культивирования штамма *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 на синтез поверхностно-активных веществ / Т.П. Пирог, С.И. Антонюк, Е.В. Карпенко, Т.А. Шевчук // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т.45, № 3. – С. 304–310.
4. Das P., Mukherjee S., Sen R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans* / P. Das, S. Mukherjee, R. Sen // J. Appl. Microbiol. – 2008. – Vol. 104, № 6. – P. 1675–1684.
5. Grover M., Nain L., Singh S.B., Saxena A.K. Molecular and biochemical approaches for characterization of antifungal trait of a potent biocontrol agent *Bacillus subtilis* RP24 / M. Grover, L. Nain, S.B. Singh, A.K. Saxena // Curr. Microbiol. – 2010. – Vol. 60, № 2. – P. 99–106.
6. Joshi S., Bharucha C., Desai A. J. Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B / S. Joshi, C. Bharucha, A. J. Desai // Bioresour. Technol. – 2008. – V. 99. – P. 4603–4608.
7. Lee S., Kim S., Chung S., Choi Y. Isolation and structural analysis of bamylocin A, novel lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* LP03 having antagonistic and crude oil-emulsifying activity / S. Lee, S. Kim, S. Chung, Y. Choi // Arch. Microbiol. – 2007. – V. 188. – P. 307–312.
8. Maldonado M. C., Corona J., Gordillo M. A., Navarro A. R. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites produced by *Bacillus* sp. IBA 33 / M. C. Maldonado, J. Corona, M. A. Gordillo, A. R. Navarro // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2009. – V. 59. – P. 646–650.
9. Mohammadipour M., Mousivand M., Abbasalizadeh S. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides* / M. Mohammadipour, M. Mousivand, S. Abbasalizadeh // Can. J. Microbiol. – 2009. – V. 55. – P. 395–404.
10. Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. Biosurfactants: potential applications in medicine / L. Rodrigues, I.M. Banat, J. Teixeira, R. Oliveira // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – V. 57. – P. 609–618.
11. Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Applications aspects / A. Singh, J.D. Van Hamme, O.P. Ward // Biotechnol. Adv. – 2007. – Vol. 25, № 1. – P. 99–121.
12. Singh P., Cameotra S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences / P. Singh, S. Cameotra // Trends in Biotechnol. – 2004. – V. 22. – P. 142–146.