

УДК 759.873.088.5:661.185

## ДЕЙСТВИЕ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241, *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017 И *Nocardia vaccinii* К-8 НА ФИТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ

© 2013 г. Т. П. Пирог\*, \*\*, А. Д. Конон\*\*, А. П. Софилканич\*\*, Г. А. Иутинская\*

\*Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 03680

\*\*Национальный университет пищевых технологий, Киев, 01601

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Поступила в редакцию 5.07.2012 г.

Исследовано влияние поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Nocardia vaccinii* К-8 на фитопатогенные бактерии.

Показано, что после обработки в течение 2 ч препаратами ПАВ (0.15–0.4 мг/мл) штаммов ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 выживаемость клеток ( $10^5$ – $10^7$  в мл) фитопатогенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas* составляла 0–33%. В присутствии препаратов ПАВ (0.085–0.85 мг/мл) *N. vaccinii* К-8 количество клеток большинства исследуемых фитопатогенных бактерий снижалось на 95–100%.

Полученные данные показывают перспективность использования микробных ПАВ для разработки экологически безопасных препаратов для контроля численности фитопатогенных бактерий.

DOI: 10.7868/S0555109913040119

Необходимость разработки современных препаратов с антимикробными свойствами обусловлена увеличением патогенных микроорганизмов, резистентных к известным биоцидам. Микробные поверхностно-активные вещества (ПАВ) рассматриваются многими исследователями, как альтернатива синтетическим антимикробным агентам [1–5]. Кроме того, актуальной проблемой на сегодняшний день остается борьба с бактериозами сельскохозяйственных растений [6].

Ранее из загрязненных нефтью образцов почвы нами были выделены нефтеокисляющие бактерии, идентифицированные, как *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 (ИМВ В-7241), *Rhodococcus erythropolis* ЭК-1 (ИМВ Ас-5017), *Nocardia vaccinii* К-8 и установлена способность штаммов синтезировать метаболиты с поверхностно-активными и эмульгирующими свойствами на различных гидрофобных и гидрофильных субстратах [7–10]. Изучены оптимальные условия культивирования продуцентов, обеспечивающие максимальное образование ПАВ [8–10], показана возможность интенсификации синтеза поверхностно-активных веществ на основе исследования особенностей метаболизма используемого субстрата и внесения в среду экзогенных предшественников биосинтеза [10–12], использовании смешанных субстратов [13], а также осуществлено масштабирование процесса биосинтеза ПАВ на ферментационном оборудовании [14].

В предыдущих исследованиях было установлено антимикробное действие препаратов ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 по отношению к некоторым бактериям и дрожжам [15]. Отметим, что в работе [15] использовали неочищенные препараты ПАВ (в виде стерильного супернатанта культуральной жидкости), после обработки которыми наблюдали увеличение количества живых клеток некоторых тест-культур, что можно объяснить наличием в супернатанте, кроме ПАВ, и других биологически активных веществ.

Из литературы известно, что антимикробные свойства микробных ПАВ зависят от способа их выделения и степени очистки [16]. Так, комплекс синтезируемых *Bacillus circulans* ПАВ липопептидной природы состоит из шести фракций. Исследование антимикробных свойств одной из фракций показало, что ее действие значительно эффективнее, чем комплекс ПАВ, выделенный экстракцией органическими растворителями [16].

Цель работы – исследование антимикробных свойств ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* К-8 различной степени очистки по отношению к некоторым фитопатогенным бактериям.

### МЕТОДИКА

**Объекты исследований.** Основными объектами исследований являлись штаммы *Rhodococcus*

*erythropolis* ЭК-1 и *Acinetobacter calcoaceticus* К-4, зарегистрированные в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины под номерами ИМВ Ас-5017 и ИМВ В-7241 соответственно, а также *Nocardia vaccinii* К-8.

По химической природе ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 являются комплексом глико- (трегалозомоно- и димиколаты), нейтральных (цетиловый спирт, пальмитиновая кислота, метиловый эфир н-пентадекановой кислоты, миколовые кислоты) и фосфолипидов (фосфатидилглицерин, фосфатидилэтаноламин) [8]. В составе ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 выявлены глико- (трегалозомоно- и димиколаты, трегалозомоно- и диацелаты) и аминоклипыды [9]. *N. vaccinii* К-8 синтезирует комплекс нейтральных, глико- и аминоклипыдов [10]. Нейтральные липиды представлены миколовыми и н-алкановыми кислотами, гликолипыды – трегалозодиацелатами и трегалозомиколатами.

В работе использовали фитопатогенные бактерии из Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ): *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1095, *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027, *P. syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1015, *P. syringae* pv. *coronafaciens* – УКМ В-1154, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049.

Объектами исследования также были фитопатогенные бактерии из коллекции отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины: *P. corrugate* 9070, *P. savastanoi* pv. *glycinea* 8571, *X. translucens* pv. *translucens* 7696, *X. vesicatoria* 7790.

Штаммы фитопатогенных бактерий были любезно предоставлены сотрудниками отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.

**Состав сред и условия культивирования.** *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 выращивали на жидкой минеральной среде (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 1.3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.1,  $\text{NaCl}$  – 1.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0.6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.14,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.01, pH 6.8–7.0. В качестве субстрата использовали пережаренное подсолнечное масло в концентрации 2 об. %.

Для культивирования *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 использовали питательную среду следующего состава (г/л):  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  – 0.35,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.1,  $\text{NaCl}$  – 1.0,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 0.6,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.14, pH 6.8–7.0. В среду дополнительно вносили дрожжевой автолизат – 0.5 об. % и раствор микрореземтов – 0.1 об. % [9]. Источник углерода – этанол в концентрации 2 об. %.

Штамм *N. vaccinii* К-8 выращивали на синтетической питательной среде (г/л):  $\text{NaNO}_3$  – 0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.1,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0.1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.1,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0.1, дрожжевой автолизат – 0.5 об. % (по объему). Источник углерода и энергии – глицерин в концентрации 1.5 об. %.

В качестве инокулята использовали культуры из экспоненциальной фазы роста, выращенные на соответствующих жидких средах, содержащих 0.5–1 об. % субстрата. Количество посевного материала ( $10^4$ – $10^5$  кл./мл) составляло 5–10% от объема питательной среды. Культивирование бактерий осуществляли в колбах объемом 750 мл со 100 мл среды на качалке (320 об/мин) при 28–30°C в течение 120 ч.

**Определение показателей синтеза ПАВ.** Синтез ПАВ оценивали по следующим показателям: поверхностное натяжение ( $\sigma_s$ ) супернатанта культуральной жидкости, условная концентрация ПАВ (ПАВ\*, безразмерная величина), концентрация внеклеточных ПАВ (г/л), которые определяли, как было описано ранее [7–14].

**Выделение поверхностно-активных веществ.** Из супернатанта культуральной жидкости, содержащего ПАВ (**препарат 1**), экстракцией смесью хлороформа и метанола в соотношении 2 : 1 (**смесь Фолча**) выделяли ПАВ (**препарат 2**). Оставшаяся после экстракции ПАВ водная фаза условно названа нами **препарат 3**.

Выросшие клетки отделяли центрифугированием (5000 г) в течение 45 мин, супернатант (**препарат 1**) подвергали дальнейшей обработке. Для этого 50 мл супернатанта помещали в цилиндрическую делительную воронку объемом 200 мл, добавляли 50 мл смеси Фолча, воронку закрывали шлифованной пробкой и встряхивали (экстрагировали липиды) в течение 5 мин. Полученную после экстракции смесь оставляли в делительной воронке для разделения фаз, после чего нижнюю фракцию сливали (органический экстракт 1), а водную фазу подвергали повторной экстракции, как описано выше. После разделения фаз сливали нижнюю фракцию, получая органический экстракт 2. На третьем этапе к водной фазе добавляли 50 мл смеси Фолча, осуществляли экстракцию, получая органический экстракт 3. Экстракты 1–3 объединяли и упаривали на ротационном испарителе ИР-1М2 (Россия) при 50°C и абсолютном давлении 0.4 атм до постоянной массы. Сухой остаток растворяли в стерильной водопроводной воде до первоначального объема. Все препараты стерилизовали при 112°C в течение 30 мин.

Концентрацию ПАВ в препаратах 1 и 2 устанавливали весовым методом после экстракции смесью Фолча.

**Исследование антимикробных свойств препаратов.** В исходной суспензии 1 сут фитопатогенных тест-культур, выращенных на агаризованной среде (сусло-агар и мясо-пептонный агар в соотношении 1 : 1) при 30°C, определяли количество живых клеток по методу Коха (колониеобразую-

шие единицы, КОЕ/мл). Затем по 1.5 мл суспензии тест-культуры помещали в пробирки, добавляли по 1.5 мл препаратов 1–3 и выдерживали в течение 1 и 2 ч при температуре, оптимальной для роста тест-культуры, после чего определяли количество живых клеток.

Выживание фитопатогенных бактерий определяли, как отношение количества клеток в вариантах, обработанных препаратами 1–3, к количеству клеток в исходной суспензии и выражали в процентах.

Все опыты проводили в 3 повторностях, количество параллельных определений в экспериментах составляло от 3 до 5. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по Лакину [17]. Различия средних показателей считали достоверными при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Антимикробные свойства препаратов *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241.** В табл. 1 представлены данные по антимикробным свойствам препаратов 1 (супернатант культуральной жидкости, содержащий ПАВ), и 2 (раствор ПАВ после экстракции из препарата 1 смесью Фолча) штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017. Концентрация поверхностно-активных веществ в препаратах 1 и 2 *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 составляла 0.8 мг/мл, *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 – 0.3 мг/мл. Установлено, что после экстракции ПАВ из супернатанта культуральной жидкости исследуемых штаммов последний не обладал поверхностно-активными свойствами, что позволяет утверждать об отсутствии ПАВ в препаратах 3.

Учитывая, что при определении антимикробных свойств препаратов объемное соотношение их растворов и суспензии тест-культур составляет 1 : 1 (см. раздел “Методика”), реально исследуемая концентрация ПАВ в препаратах 1 и 2 *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 составляла 0.4 и 0.15 мг/мл соответственно. В дальнейшем при изложении материала в тексте указана реальная концентрация ПАВ.

Так как препараты 2 штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 различаются по содержанию ПАВ, в некоторых вариантах исследовали антимикробные свойства препарата 2 *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 более низкой концентрации (0.2 и 0.1 мг/мл).

Эксперименты показали, что как для штамма ИМВ Ас-5017, так и ИМВ В-7241 наибольшее ингибирующее действие на фитопатогенные бактерии оказывал препарат 2 – раствор ПАВ (табл. 1). Практически во всех случаях эффективность этих препаратов по отношению к фитопатогенным бактериям родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas* усиливалась с увеличением времени экспозиции.

Данные, представленные в табл. 1, свидетельствуют, что препарат ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 с концентрацией 0.15 мг/мл обладал более сильным антимикробным действием по отношению к некоторым исследуемым фитопатогенам, чем препарат *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 более высокой концентрации (0.4 мг/мл). Такое явление можно объяснить различным химическим составом исследованных ПАВ. Так, в составе ПАВ штамма ИМВ В-7241 обнаружены аминоклипыды [9], которые, как известно, характеризуются достаточно сильным антимикробным действием [5, 16, 18].

Отметим, что после обработки *X. vesicatoria* ИМВ 7790 и *P. syringae* УКМ В-1027 препаратами 2 штамма ИМВ Ас-5017 более низкой концентрации (0.2 и 0.1 мг/мл) наблюдали увеличение количества живых клеток фитопатогенных бактерий, которое коррелировало со снижением концентрации ПАВ в препаратах (табл. 1).

Препарат 1 штамма ИМВ В-7241, представляющий собой супернатант после отделения клеток, проявлял эффективное антимикробное действие только по отношению к *X. vesicatoria* 7790 и *P. syringae* УКМ В-1027 (табл. 1). Препарат 1 штамма ИМВ Ас-5017 оказался не таким эффективным и в лучшем случае в его присутствии наблюдали гибель 20% клеток *P. corrugate* 9070. Отметим, что обработка препаратом 1 тест-культур сопровождалась даже стимулированием роста некоторых фитопатогенных бактерий (табл. 1).

На следующем этапе исследовали влияние на фитопатогенные бактерии препаратов 3 (водная фаза, оставшаяся после экстракции ПАВ из супернатанта культуральной жидкости) штаммов ИМВ В-7241 и Ас-5017 (рис. 1).

Отметим, что после обработки суспензии тест-культур *X. vesicatoria* 7790, *P. corrugate* 9070 и *P. syringae* рв. *coronafaciens* УКМ В-1154 препаратом 3 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 наблюдали существенное увеличение количества клеток (рис. 1а). В некоторых случаях препарат 3 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 проявлял слабую антимикробную активность (например, против *X. campestris* рв. *campestris* УКМ В-1049 и *P. carotovorum* УКМ В-1095, рис. 1а).

Препарат 3 *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 практически не влиял на *P. corrugate* 9070 и незначительно стимулировал рост *P. carotovorum* УКМ В-1095 через 2 ч экспозиции (рис. 1б). В то же время обработка в течение 1 ч препаратом 3 штамма ИМВ Ас-5017 суспензии тест-культур *X. campestris* рв. *campestris* УКМ В-1049 и *P. syringae* УКМ В-1027 сопровождалась более существенным стимулированием роста этих фитопатогенных бактерий (численность 150–165%, рис. 1б).

Таким образом, препарат 3 как штамма *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, так и *R. erythropolis* ИМВ

**Таблица 1.** Влияние ПАВ штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 на фитопатогенные бактерии родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas*

Тест-культура	Продуцент метаболита	Препарат	Выживаемость клеток, % через		
			1 ч	2 ч	
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> УКМ В-1049	ИМВ В-7241	1	20.0 ± 1.0	140.0 ± 7.0	
		2	17.7 ± 0.9	Н.о.	
	ИМВ Ас-5017	1	115.0 ± 5.8	148.0 ± 7.4	
		2	40.0 ± 2.0	14.0 ± 0.7	
<i>X. vesicatoria</i> 7790	ИМВ В-7241	1	2.0 ± 0.1	0	
		2	0	0	
	ИМВ Ас-5017	1	77.0 ± 2.6	81.0 ± 2.6	
		2	23.0 ± 1.1	11.0 ± 0.9	
		2*	58.0 ± 2.9	Н.о.	
		2**	98.1 ± 1.9	Н.о.	
<i>P. syringae</i> УКМ В-1027	ИМВ В-7241	1	26.9 ± 1.3	18.4 ± 0.9	
		2	34.9 ± 1.7	9.2 ± 0.5	
	ИМВ Ас-5017	1	124.0 ± 2.7	156.0 ± 3.1	
		2	42.0 ± 1.2	12.0 ± 0.9	
		2*	61.5 ± 3.1	Н.о.	
		2**	93.3 ± 4.7	Н.о.	
	<i>P. corrugate</i> 9070	ИМВ В-7241	1	96.5 ± 4.8	92.9 ± 4.6
			2	74.7 ± 3.7	25.7 ± 1.2
ИМВ Ас-5017		1	87.0 ± 2.3	81.0 ± 2.2	
		2	31.0 ± 1.0	29.0 ± 1.0	
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В-1154	ИМВ В-7241	1	99.7 ± 5.0	35.2 ± 1.8	
		2	34.4 ± 1.7	32.8 ± 1.6	
	ИМВ Ас-5017	1	96.0 ± 4.8	98.0 ± 4.9	
		2	27.0 ± 1.4	10.0 ± 0.5	
<i>P. carotovorum</i> УКМ В-1095	ИМВ В-7241	1	94.0 ± 4.7	57.0 ± 2.9	
		2	95.0 ± 5.0	33.0 ± 1.7	
	ИМВ Ас-5017	1	91.0 ± 2.1	89.0 ± 2.0	
		2	79 ± 1.8	70 ± 1.6	

Примечание. Получение препаратов описано в разделе "Методика". Концентрация ПАВ в препаратах 1 и 2 (мг/мл): *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 – 0.4; *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 – 0.15. Количество клеток до внесения препаратов (КОЕ/мл): *X. campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049 –  $4 \times 10^6$ , *X. vesicatoria* 7790 –  $1 \times 10^5$ , *P. syringae* УКМ В-1027 –  $3 \times 10^6$ , *P. corrugate* 9070 –  $2 \times 10^7$ , *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 –  $4 \times 10^5$ , *P. carotovorum* УКМ В-1095 –  $2 \times 10^7$ ; количество клеток в контрольных (не обработанных препаратами) вариантах не изменялось в течении 2 ч экспозиции.

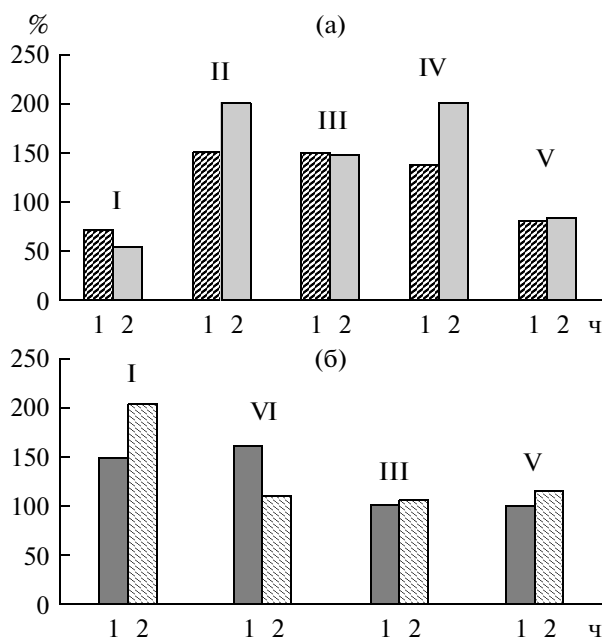
"\*" и "\*\*" – концентрация ПАВ в препарате 2 штамма ИМВ Ас-5017 0.2 и 0.1 мг/мл соответственно. Н.о. – не определяли.

Ас-5017 проявлял стимулирующее действие на большинство исследованных фитопатогенных бактерий. Подобный эффект супернатанта культуральной жидкости *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, только на эукариотические клетки (*C. tropicalis* ПБТ-5, *C. albicans* Д-6 и *C. guilliermondii* МБ-4) был описан нами ранее [15].

Наблюдаемое увеличение количества клеток после обработки препаратами 1 и 3 (см. табл. 1 и

рис. 1) может быть объяснено тем, что штаммы ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017, кроме ПАВ, синтезируют ряд других биологически активных веществ, в том числе стимулирующих рост микроорганизмов. Выяснению этого вопроса будут посвящены наши будущие исследования.

**Препараты ПАВ *N. vaccinii* К-8 как антимикробные агенты.** Несколько другие закономерности наблюдали при действии ПАВ *N. vaccinii* К-8 (концен-



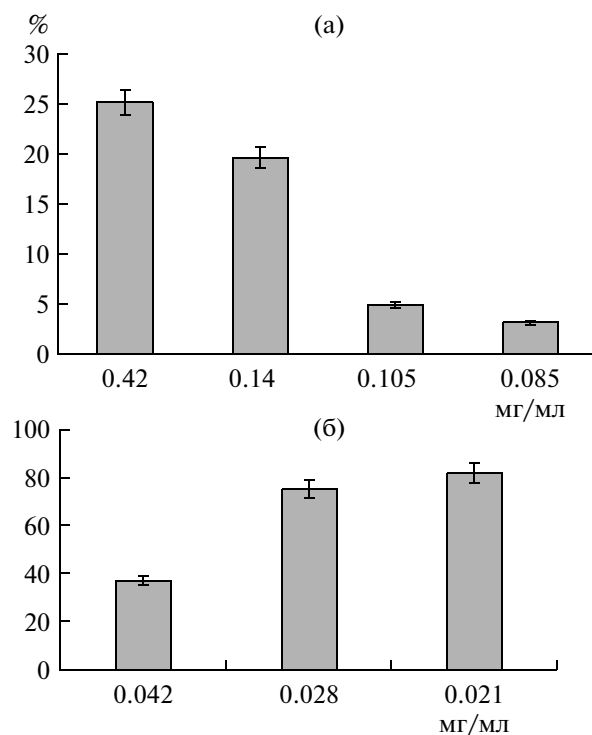
**Рис. 1.** Влияние препарата 3 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 (а) и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 (б) на фитопатогенные бактерии.

Время экспозиции 1 и 2 ч. Фитопатогенные бактерии: I – *X. campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049, II – *X. vesicatoria* 7790, III – *P. corrugate* 9070, IV – *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154, V – *P. carotovorum* УКМ В-1095, VI – *P. syringae* УКМ В-1027.

Контроль (100%) – количество клеток до внесения препарата 3.

трация ПАВ в препаратах 1 и 2 – 0.85 мг/мл) на представителей родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas* (табл. 2). Во-первых, антимикробное действие установлено для обоих исследуемых препаратов. Во-вторых, обработка препаратами штамма К-8 сопровождалась гибелью значительного количества клеток (80% и выше). В-третьих, антимикробное действие обоих препаратов оказалось практически одинаковым, а в некоторых случаях препарат 1 оказался более эффективным. В-четвертых, из исследованных препаратов ПАВ всех штаммов препараты *N. vaccinii* К-8 проявляли наиболее сильное антимикробное действие (табл. 1 и 2), что может быть объяснено более высокой концентрацией содержащихся в них ПАВ по сравнению с аналогичными препаратами *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017.

На следующем этапе исследовали влияние на *X. vesicatoria* 7790 и *P. corrugate* 9070 препарата ПАВ (препарат 2) *N. vaccinii* К-8 более низкой концентрации. Выбор именно этих фитопатогенных бактерий для проведения исследований обусловлен высокой выживаемостью (до 20–22%) клеток штаммов 7790 и 9070 после обработки препаратом 2 *N. vaccinii* К-8, что на порядок выше,



**Рис. 2.** Зависимость выживаемости (%) *X. vesicatoria* 7790 (а) и *P. corrugate* 9070 (б) от концентрации ПАВ (мг/мл) в препарате 2 *N. vaccinii* К-8.

Время экспозиции 2 ч. Количество клеток фитопатогенных бактерий до внесения препарата 2 *N. vaccinii* К-8 –  $10^5$ – $10^6$  КОЕ/мл.

чем других исследованных фитопатогенных бактерий (см. табл. 2). Кроме того, количество живых клеток *X. vesicatoria* 7790 и *P. corrugate* 9070 практически не зависело от времени обработки препаратом 2 штамма К-8 (см. табл. 2). Эти данные позволили предположить, что для ингибирования клеток штаммов 7790 и 9070 необходима более низкая концентрация ПАВ *N. vaccinii* К-8.

Дальнейшие эксперименты показали, что снижение концентрации ПАВ в препарате 2 штамма К-8 до 0.42 и 0.21 мг/мл (разбавление исходного препарата ПАВ в 2 и 4 раза соответственно) практически не влияло на выживаемость клеток *X. vesicatoria* 7790, которое составляло 20–25% и было таким же, как и после обработки препаратом 2 с более высокой концентрацией ПАВ (рис. 2а; табл. 2). Однако при концентрации препарата ПАВ 0.085–0.105 мг/мл (разбавление препарата 2 в 8 и 10 раз) наблюдали снижение количества живых клеток до 2–5% (рис. 2а).

Обработка суспензии клеток *P. corrugate* 9070 как исходным, так и разбавленным препаратом 2 *N. vaccinii* К-8 (концентрация ПАВ до 0.085 мг/мл) не сопровождалась существенным изменением количества живых клеток, которое для всех исследованных в диапазоне 0.085–0.85 мг/мл концентраций

**Таблица 2.** Выживаемость фитопатогенных бактерий при действии препаратов ПАВ *N. vaccinii* К-8

Тест-культура	Препарат	Выживаемость клеток, % через	
		1 ч	2 ч
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i> 7696	1	1.17 ± 0.05	1.76 ± 0.08
	2	1.7 ± 0.08	2.5 ± 0.12
<i>X. vesicatoria</i> 7790	1	0.37 ± 0.02	2.08 ± 0.10
	2	22.2 ± 1.11	20.8 ± 1.04
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i> УКМ В-1049	1	0.1 ± 0.01	0.6 ± 0.03
	2	8.8 ± 0.44	4.5 ± 0.23
<i>P. savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> 8571	1	1.86 ± 0.09	0.7 ± 0.03
	2	2.8 ± 0.14	1.25 ± 0.06
<i>P. syringae</i> pv. <i>atrofaciens</i> УКМ В-1015	1	0.42 ± 0.02	0.14 ± 0.01
	2	1.14 ± 0.06	0.35 ± 0.02
<i>P. corrugate</i> 9070	1	22.4 ± 1.12	0
	2	18.8 ± 0.94	12.2 ± 0.61
<i>P. syringae</i> УКМ В-1027	1	51.1 ± 2.55	28.2 ± 1.14
	2	24.7 ± 1.23	4.7 ± 0.23
<i>P. syringae</i> pv. <i>coronafaciens</i> УКМ В-1154	1	3.8 ± 0.19	3.5 ± 0.18
	2	0.22 ± 0.01	0

Примечание. Количество клеток фитопатогенных бактерий до внесения препаратов *N. vaccinii* К-8 составляло  $10^5$ – $10^6$  КОЕ/мл. Концентрация ПАВ в препаратах 1 и 2 – 0.85 мг/мл.

ПАВ составляло от 12 до 20%. При дальнейшем снижении концентрации ПАВ в препарате 2 до 0.042–0.021 мг/мл (разбавление исходного препарата в 20–40 раз) выживание клеток постепенно увеличивалось до 80% (рис. 2б).

Таким образом, ингибирующее действие препарата 2 штамма К-8 с концентрацией ПАВ 0.042–0.085 мг/мл на *X. vesicatoria* 7790 и *P. corrugate* 9070 сравнимо с таковым препаратом 2 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, содержащим 0.15 и 0.4 мг/мл ПАВ соответственно (см. рис. 2 и табл. 1), что может быть объяснено различным химическим составом исследуемых ПАВ.

Учитывая достаточно сильное антимикробное действие препарата ПАВ штамма К-8 в виде супернатанта культуральной жидкости (препарат 1), которое не уступало таковому препарату 2 (раствор очищенных ПАВ), мы предположили, что *N. vaccinii* К-8 синтезирует и другие, отличные от ПАВ, антимикробные метаболиты. В пользу этого предположения свидетельствовали и данные по влиянию препарата 3 штамма К-8 (водная фаза после экстракции ПАВ из супернатанта) на фитопатогенные бактерии, выживание которых после обработки таким препаратом составляло всего 0.2–1%. Отметим, что как и для штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017, после экстракции ПАВ из

супернатанта культуральной жидкости *N. vaccinii* К-8 последний не обладал поверхностно-активными свойствами, что позволяло утверждать об отсутствии ПАВ в препарате 3 штамма К-8.

В литературе нам не удалось обнаружить сведений о синтезе представителями рода *Nocardia* поверхностно-активных веществ с антимикробными свойствами. В то же время известно, что бактерии рода *Nocardia* синтезируют различные антимикробные метаболиты, не снижающие поверхностное натяжение [18–24]. Это Цефамицин С (цефалоспориин II поколения, продуцент *Nocardia lactamdurans* NRRL 3802) [18], бис-(2-этилгексил) фталат, бис-(5-этилгептил) фталат (*Nocardia levis* МК-VL 113) [19], Амицилин (1,1-дихлоро-4-этил-5-(4-нитро-фенил)-гексан-2-он, продуцент *Nocardia* sp. ALAA 2000) [20], Трансвалецин А (хелатный комплекс цинка и органических кислот с замещенными фенольными и тиазолидиновыми группами, *Nocardia transvalensis* IFM 10065), Нокобактин NA (липидорастворимый хелатный Fe-содержащий комплекс, *Nocardia asteroides* ATCC 3318) [21], Нокатиоцин (гликотииогексидная структура, *Nocardia* sp. ATCC 202099) [22], Бразилибактин А (*Nocardia brasiliensis* IFM 0995) [23], которые эффективны как против грамположительных и грамотрицательных бактерий, так и не-

которых грибов. Нокарацин и Бразилихинон D, синтезируемые *N. brasiliensis* IFM 0667 [23], а также Нокардитиацин (тиопептид) *Nocardia pseudobrasiliensis* IFM 0757 [24] в основном действуют на кислотоустойчивые бактерии. Кроме того, Бразилибактин А и Бразилихинон D проявляют цитотоксическую активность против лейкемии мышей L1210 и клеток KB карциномы человека, а Нокарацин — по отношению к HL-60 клеткам лейкемии человека [23]. Мы предполагаем, что подобные антимикробные вещества может синтезировать и штамм *N. vaccinii* К-8, что будет предметом наших дальнейших исследований.

**Перспективы практического использования препаратов *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* К-8.** Имеющиеся в литературе сведения об антимикробных по отношению к фитопатогенным микроорганизмам свойствах ПАВ касаются в основном их действия на микромицеты [3, 25–27], в то же время исследованию антибактериальной активности таких препаратов уделяется значительно меньше внимания.

Так, известно, что итурин и сурфактин (липopeптиды *B. subtilis* OG) в концентрации 5 мг/мл проявляли антимикробное действие по отношению к *X. campestris* и *X. axonopodis* [28]. Установлено, что механизм действия данных ПАВ состоит в повреждении бактериальной клеточной стенки. Отметим, что исследованные нами препараты ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* К-8 были эффективны против фитопатогенных бактерий в концентрациях на один-два порядка ниже (0.085–0.85 мг/мл).

В работе [29] показана возможность использования клеток *B. subtilis* 6051, а также их метаболитов (сурфактин) в борьбе с фитопатогенными бактериями *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, поражающими корни арабидопсиса. Минимальная ингибирующая концентрация сурфактина составляла 25 мкг/мл. Результаты, приведенные в настоящей работе, свидетельствуют, что препарат ПАВ (препарат 2) *N. vaccinii* К-8 (42 мкг/мл) вызывал гибель 60% клеток *P. corrugate* 9070 (рис. 26). Определению минимальной ингибирующей концентрации препаратов ПАВ штаммов ИМВ В-7241, ИМВ Ас-5017 и К-8 будут посвящены наши дальнейшие исследования.

Наши данные показывают возможность применения в качестве антимикробного по отношению к фитопатогенным бактериям препарата супернатанта культуральной жидкости *N. vaccinii* К-8 (без дополнительного выделения ПАВ и других веществ), что значительно удешевляет технологию получения. Отметим, что одним из факторов, сдерживающих промышленное производство микробных ПАВ, является дорогостоящая процедура выделения и очистки целевого продук-

та, представляющая в большинстве случаев экстракцию органическими растворителями [30]. Однако в последнее время разработаны и другие, более дешевые и безопасные методы выделения ПАВ: осаждение сульфатом аммония, экстракция нетоксичным метил-трет-бутиловым эфиром, кристаллизация, ультрафильтрация, сорбция на полистирольных матрицах и активированном угле, ионообменная хроматография [30].

Результаты, представленные в настоящей работе, могут быть использованы для разработки безотходной биотехнологии на основе *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 с целью получения микробных препаратов различного биологического действия. Так, при получении препаратов ПАВ штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 осажденные клетки могут быть использованы для очистки воды от нефти [6]; полученный супернатант культуральной жидкости — для дальнейшего выделения ПАВ с антимикробными (в том числе, и по отношению к фитопатогенным бактериям) свойствами. Учитывая, что водная фаза, оставшаяся после экстракции ПАВ, активизировала рост клеток, необходимо в дальнейшем изучить перспективность ее использования для стимулирования роста микроорганизмов и растений.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что препараты ПАВ *N. vaccinii* К-8, *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 обладают антимикробными свойствами по отношению к ряду фитопатогенных бактерий. Эффективность исследуемых препаратов зависит от степени их очистки, времени экспозиции и концентрации ПАВ. Полученные результаты являются перспективными для разработки экологически безопасных биопрепаратов для контроля численности фитопатогенных бактерий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kalyani R., Bishwambhar M., Suneetha V. // Int. Res. J. Pharm. 2011. V. 2. № 8. P. 11–15.
2. Kulakovskaya T.V., Golubev W.I., Tomashevskaya M.A., Kulakovskaya E.V., Shashkov A.S., Grachev A.A., Chizhov A.S., Nifantiev N.E. // Mycopathologia. 2010. V. 169. № 2. P. 117–123.
3. Varnier A.L., Sanchez L., Vatsa P., Boudesocque L., Garcia-Brugger A., Rabenoelina F., Sorokin A., Renault J.H., Kauffmann S., Pugin A., Clement C., Bailleul F., Dorey S. // Plant Cell Environ. 2009. V. 32. № 2. P. 178–193.
4. Grover M., Nain L., Singh S.B., Saxena A.K. // Curr. Microbiol. 2010. V. 60. № 2. P. 99–106.
5. Velho R.V., Medina L.F.C., Segalin J., Brandelli A. // Folia Microbiol. (Praha). 2011. V. 56. № 4. P. 297–303.
6. Гвоздяк Р.И., Пасичник Л.А., Яковлева Л.М., Мороз С.М., Литвинчук О.О., Житкевич Н.В., Ходос С.Ф., Буценко Л.М., Данкевич Л.П., Гриник И.В.,

- Патыка В.Ф. Фитопатогенные бактерии. Бактериальные заболевания растений. Киев: НВП “Интерсервис”, 2011. 444 с.
7. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 1. С. 58–63.
  8. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Карпенко Е.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2004. Т. 40. № 5. С. 544–550.
  9. Пирог Т.П., Антонюк С.И., Карпенко Е.В., Шевчук Т.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 3. С. 304–310.
  10. Пирог Т.П., Гриценко Н.А., Хомяк Д.И., Конон А.Д., Антонюк С.И. // Микробиол. журн. 2011. Т. 73. № 4. С. 15–24.
  11. Пирог Т.П., Корж Ю.В., Шевчук Т.А., Тарасенко Д.А. // Микробиология. 2008. Т. 77. № 6. С. 749–757.
  12. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Клименко Ю.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 651–658.
  13. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Конон А.Д., Шулякова М.А., Иутинская Г.А. // Микробиол. журн. 2012. Т. 74. № 1. С. 20–27.
  14. Пирог Т.П., Игнатенко С.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. № 4. С. 436–442.
  15. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Скочко А.Б. // Микробиол. журн. 2011. Т. 73. № 3. С. 14–20.
  16. Das P., Mukherjee S., Sen R. // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 104. № 6. P. 1675–1684.
  17. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
  18. Kaglival L.D., Survase S.A., Singhal R.S. // Bioresour. Technol. 2009. V. 100. № 9. P. 2600–2606.
  19. Kavitha A., Prabhakar P., Vijayalakshmi M., Venkateswarlu Y. // Lett. Appl. Microbiol. 2009. V. 49. № 4. P. 484–490.
  20. El-Gendy M.M.A., Hawas U.W., Jaspars M. // J. Antibiot. (Tokyo). 2008. V. 61. № 6. P. 379–386.
  21. Hoshino Y., Chiba K., Ishino K., Fukai T., Igarashi Y., Yazawa K., Mikami Y., Ishikawa J. // J. Bacteriol. 2011. V. 193. № 2. P. 441–448.
  22. Leet J.E., Li W., Ax H.A., Matson J.A., Huang S., Huang R., Cantone J.L., Drexler D., Dalterio R.A., Lam K.S. // J. Antibiot. (Tokyo). 2003. V. 56. № 3. P. 232–242.
  23. Tsuda M., Yamakawa M., Oka S., Hoshino Y., Mikami Y., Sato A., Fujiwara H., Ohizumi Y., Kobayashi J. // J. Nat. Prod. 2005. V. 68. № 3. P. 462–464.
  24. Mukai A., Fukai T., Hoshino Y., Yazawa K., Harada K., Mikami Y. // J. Antibiot. (Tokyo). 2009. V. 62. № 11. P. 613–619.
  25. Jadhav M., Kagalkar A., Jadhav S., Govindwar S. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2011. V. 133. № 11. P. 1347–1356.
  26. Petatán-Sagahón I., Anducho-Reyes M.A., Silva-Rojas H.V., Arana-Cuenca A., Tellez-Jurado A., Cárdenas-Álvarez I.O., Mercado-Flores Y. // Int. J. Mol. Sci. 2011. V. 12. № 9. P. 5522–5537.
  27. Raaijmakers J.M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. // FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. № 6. P. 1037–1062.
  28. Etcheagaray A., de Castro Bueno C., de Melo I.S., Tsai S.M., Fiore M.F., Silva-Stenico M.E., de Moraes L.A., Teschke O. // Arch. Microbiol. 2008. V. 190. № 6. P. 611–622.
  29. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. // Plant. Physiol. 2004. V. 134. № 1. P. 307–319.
  30. Mukherjee S., Das P., Sen R. // Trends Biotechnol. 2006. V. 24. № 11. P. 509–515.

## Effect of Surface-Active Substances of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on Phytopathogenic Bacteria

T. P. Pirog<sup>a, b</sup>, A. D. Konov<sup>b</sup>, A. P. Sofilkanich<sup>c</sup>, and G. A. Iutinskaya<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Zabolotnyi Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Zabolotnoho 154, Kiev, 03680 Ukraine

<sup>b</sup> National University of Food Technologies, Kiev, 01601 Ukraine

e-mail: tapirog@nuft.edu.ua

Received July 5, 2012

**Abstract**—The effect of surface-active substances (SAS's) of *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241, *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017, and *Nocardia vaccinii* K-8 on phytopathogenic bacteria has been studied. It was shown that the survival of cells ( $10^5$ – $10^7$  in a milliliter) of the *Pseudomonas* and *Xanthomonas* phytopathogenic bacteria was found to be 0–33% after treatment with SAS preparations of the IMV Ac-5017 and IMV B-7241 strains for 2 h (0.15–0.4 mg/mL). In the presence of *N. vaccinii* K-8 SAS preparations (0.085–0.85 mg/mL), the number of cells of the majority of the studied phytopathogenic bacteria decreased by 95–100%. These data show prospects for using microbial SAS's for the construction of ecologically friendly drugs for regulating the number of phytopathogenic bacteria.