

УДК 759.873.088.5:661.185

**ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ *ACINETOBACTER CALCOACETICUS*  
ИМВ В-7241, *RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS* ИМВ Ас-5017 И  
*NOCARDIA VACCINII* К-8 КАК ПРЕПАРАТЫ ДЛЯ БИОКОНТРОЛЯ НАД  
ФИТОПАТОГЕНАМИ**

Покора К.А., 4 курс, факультет биотехнологии и экологического контроля  
Чеботарева К.В., 3 курс, факультет биотехнологии и экологического контроля

Конон А.Д., аспирант 2-го года обучения,

Софилканич А.П., аспирант 3-го года обучения

Научный руководитель: д.б.н., профессор Пирог Т.П.

Консультант – член-корреспондент НАН Украины,

д.б.н., профессор Иутинская Г.А.

Национальный университет пищевых технологий, г. Киев, Украина

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 [4]. В литературе имеются данные об ингибировании фитопатогенных грибов препаратами гликолипидных микробных ПАВ [5] и липопептидов [6]. Однако актуальной проблемой на сегодняшний день остается борьба с бактериозами сельскохозяйственных растений, которая рассматривается как существенный вклад в решение глобальных продовольственных проблем. Использование средств биологического контроля над фитопатогенами является важным условием устойчивого развития агроэкосистем [7].

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 данных штаммов синтезировать ПАВ на различных субстратах. 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 (*Bacillus subtilis* БТ-2, *Escherichia coli* ИЕМ-1, *Candida tropicalis* ПБТ-5, *Candida albicans* Д-6, *Candida utilis* БВС-65, *Saccharomyces cerevisiae* ОБ-3 и др.) [1]. Отметим, что в работе [1] использовали неочищенные препараты ПАВ в виде стерильного супернатанта культуральной жидкости.

Из литературы известно, что антимикробные свойства микробных ПАВ зависят от способа их выделения и степени очистки. Так, с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии было установлено, что комплекс синтезируемых *Bacillus circulans* ПАВ липопептидной природы состоит из шести фракций. Исследование антимикробных свойств одной из фракций показало, что её действие значительно эффективнее, чем комплекс ПАВ, выделенный экстракцией органическими растворителями [3].

В связи с изложенным выше цель данной работы – исследовать антимикробные свойства 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.

В работе использовали фитопатогенные бактерии из Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ): *Pectobacterium carotovorum* УКМ В-1095 – полифаг, возбудитель гнилей у широкого круга сельскохозяйственных и цветочных растений; *Pseudomonas syringae* УКМ В-1027 – полифаг, возбудитель пятнистостей широкого круга сельскохозяйственных растений, цветочных и древесных культур; *Pseudomonas syringae* pv. *atrofaciens* УКМ В-1015 – возбудитель базального бактериоза пшеницы, ржи и ячменя; *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* – УКМ В-1154 – возбудитель ореольного бактериоза ржи; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049 – возбудитель сосудистого бактериоза многих сельскохозяйственных растений.

Объектами исследования также были фитопатогенные бактерии из коллекции отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины: *Pseudomonas corrugate* 9070 – вызывает некроз сердцевины стеблей томатов; *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* 8571 – вызывает угловатую пятнистость сои; *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* 7696 – возбудитель черного бактериоза зерновых; *Xanthomonas vesicatoria* 7790 – возбудитель черной бактериальной пятнистости томатов. Штаммы фитопатогенных бактерий были любезно предоставлены сотрудниками отдела фитопатогенных бактерий Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.

Культивирование *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* К-8 проводили на минеральных питательных средах, описанных ранее [1, 2]. Выделение поверхностно-активных веществ из супернатанта культуральной жидкости, содержащего ПАВ (препарат 1), осуществляли экстракцией смесью Фолча (хлороформ–метанол 2:1) и получали препарат 2. Оставшаяся после экстракции ПАВ водная фаза условно названа нами препарат 3. Начальная концентрация поверхностно-активных веществ в препаратах 1 и 2 *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 составляла 0,4 мг/мл, *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 – 0,15 мг/мл, *N. vaccinii* К-8 – 0,85 мг/мл. В некоторых вариантах исследовали антимикробные свойства препарата 2 штаммов ИМВ Ас-5017 и К-8 более низкой концентрации. 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.

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. Практически во всех случаях эффективность этих препаратов по отношению к фитопатогенным бактериям родов *Pseudomonas* и *Xanthomonas* усиливалась с увеличением времени экспозиции. Так, через 2 ч экспозиции препарат 2 штамма *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 оказался эффективнее аналогичного препарата *R. erythropolis* ИМВ Ас-

5017 по отношению к *X. vesicatoria* 7790 и *P. carotovorum* УКМ В-1095. И только в одном случае после обработки в течение 2 ч суспензии *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 препаратом 2 штамма ИМВ Ас-5017 наблюдали гибель значительно большего количества клеток, чем в присутствии препарата 2 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 (выживание 10 и 33 % соответственно). Таким образом, препарат ПАВ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 с концентрацией 0,15 мг/мл обладал более сильным антимикробным действием, 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 [7], которые, как известно, характеризуются достаточно сильным антимикробным действием [3]. 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.

Препарат 1 штамма ИМВ В-7241, представляющий собой супернатант культуральной жидкости, проявлял эффективное антимикробное действие только по отношению к *X. vesicatoria* 7790 и *P. syringae* УКМ В-1027, выживание которых через 2 ч экспозиции составляло 0 и 18–19 % соответственно. 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 стимуляцией роста некоторых фитопатогенных бактерий, например *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049.

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. Отметим, что после обработки суспензии тест-культур *X. vesicatoria* 7790, *P. corrugate* 9070, *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 препаратом 3 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 наблюдали существенное увеличение количества клеток. Максимальная стимуляция роста в присутствии препарата 3 штамма ИМВ В-7241 установлена для *P. syringae* УКМ В-1027: уже через 1 ч экспозиции количество клеток этих фитопатогенных бактерий увеличивалось в 3,3 раза. В некоторых случаях препарат 3 *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 проявлял слабую антимикробную активность (например, против *X. campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049 и *P. carotovorum* УКМ В-1095).

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. В то же время обработка в течение 1 ч препаратом 3 штамма ИМВ Ас-5017 суспензии тест-культур *X. campestris* pv. *campestris* УКМ В-1049 и *P. syringae* УКМ В-1027 сопровождалась более существенной стимуляцией роста этих фитопатогенных бактерий (численность 150–165 %). Максимальную активацию роста в присутствии препарата 3 *R. erythropolis*

ИМВ Ас-5017 наблюдали для *X. vesicatoria* 7790 и *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154: количество клеток через 2 ч экспозиции возрастало в 3,5–3,7 раза.

Наблюдаемое увеличение количества клеток после обработки препаратами 1 и 3 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.

Совершенно другие закономерности наблюдали при действии внеклеточных метаболитов *N. vaccinii* К-8 на представителей родов *Xanthomonas* и *Pseudomonas*. Во-первых, антимикробное действие установлено для всех исследуемых препаратов 1–3 *N. vaccinii* К-8. Во-вторых, обработка препаратами 1–3 штамма К-8 сопровождалась гибелью значительного количества клеток (80 % и выше). В-третьих, наиболее сильным антимикробным действием обладал препарат 3 (выживание до 3 % максимум, как установлено для *P. syringae* УКМ В-1027, для остальных – 100 % гибель через 2 ч экспозиции). В-четвертых, из исследованных препаратов ПАВ всех штаммов препарат 2 *N. vaccinii* К-8 оказался наиболее эффективным, что может быть объяснено более высокой концентрацией содержащихся в нем ПАВ по сравнению с аналогичными препаратами *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017.

Дальнейшие эксперименты показали, что снижение концентрации ПАВ в препарате 2 штамма К-8 до 0,42 и 0,21 мг/мл практически не влияло на выживание клеток *X. vesicatoria* 7790, которое составляло 20–25 % и было таким же, как и после обработки препаратом 2 с более высокой концентрацией ПАВ. Однако при концентрации препарата ПАВ 0,085–0,105 мг/мл наблюдали снижение количества живых клеток до 2–5 %. 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 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 %.

Данные, представленные в настоящей работе, 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. Кроме того, наши результаты 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 [2]; 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 её использования для стимуляции роста микроорганизмов и растений.

### Библиографический список

1. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Скочко А.Б. Антимикробное действие поверхностно-активных веществ *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 и *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1 // Микробиол. журнал. – 2011. – Т.73, № 3. – С. 14–20.
2. Пирог Т.П., Шевчук Т.А., Волошина И.Н., Гречирчак Н.Н. Использование иммобилизованных на керамзите клеток нефтеокисляющих микроорганизмов для очистки воды от нефти // Прикл. биохимия и микробиология. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 58–63.
3. Das P., Mukherjee S., Sen R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans* // J. Appl. Microbiol. – 2008. – V. 104, № 6. – P. 1675–1684.
4. Kalyani R., Bishwambhar M, Suneetha V. Recent potential usage of surfactant from microbial origin in pharmaceutical and biomedical arena: a perspective // International research journal of pharmacy. – 2011. – V. 2, № 8. – P. 11–15.
5. Kulakovskaya, T.V., Golubev, W.I., Tomashevskaya, M.A., Kulakovskaya E.V., Shashkov A.S., Grachev A.A., Chizhov A.S., Nifantiev N.E. Production of antifungal cellobiose lipids by *Trichosporon porosum* // Mycopathologia. – 2010. – V. 169, № 2. – P. 117–123.
6. Velho R.V., Medina L.F.C., Segalin J., Brandelli A. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi // Folia Microbiol. (Praha). – 2011. – V. 56, № 4. – P. 297–303.
7. Xu X.M., Jeffries P., Pautasso M., Jeger M. J. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice // Phytopathology. – 2011. – V. 101, № 9. – P. 1024–1031.

### **EXOCELLULAR METABOLITES OF ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMV B-7241, RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS IMV Ac-5017 AND NOCARDIA VACCINII K-8 AS PREPARATIONS FOR BIOCONTROL OF PHYTOPATHOGEN BACTERIA**

Pokora Kh.A., Chebotarova K.V., Konon A.D., Sofilkanych A.P., Pirog T.P.

It was shown that after 2 hours of treatment by surfactant preparations (0.15–0.4 mg/mL) of *Rhodococcus erythropolis* IMV Ac-5017 and *Acinetobacter calcoaceticus* IMV B-7241 the cell survival ( $10^5$ – $10^7$  CFU/mL) of pathogenic bacteria was 0–33%. In the presence of surfactant preparation (0.085–0.85 mg/mL) and other exocellular metabolites of *Nocardia vaccinii* K-8 the amount of cells of studied phytopathogenic bacteria reduced by 95–100%.