

**EFFECT OF EXTRACELLULAR METHABOLITES
RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS IMB Ac-5017,
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241 AND
NOCARDIA VACCINII IMB B-7405 ON
PHYTOPATHOGENIC BACTERIA PSEUDOMONAS
SYRINGAE PV. CORONAFACIENSУКМ B-1154**

K. Panasyuk, T. Pirog

National University of Food Technologies

Key words:

Antimicrobial action
Surfactants
Phytopathogenic bacteria
Minimum inhibitory concentration

Article history:

Received 24.12.2014
Received in revised form
13.01.2015
Accepted 30.01.2015

Corresponding author:

K. Panasyuk
E-mail:
npnuht@ukr.net

ABSTRACT

The effect of surface-active substances (SAS, surfactants) *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 and *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 on *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ B-1154 — bacteriosis pathogen of agricultural crops was studied. It was shown, that after treatment (1 h) with SAS (0.15—0.4 mg/ml) of IMB B-7241 and IMB Ac-5017 strains, cell survival (10^6 — 10^7 cells/ml) of phytopathogenic bacteria was 40 %, while in the presence of *N. vaccinii* IMB B-7405 SAS (0.4 mg/ml) — 22 %. It was established that the minimum inhibitory concentration of *R. erythropolis* IMB Ac-5017, *A. calcoaceticus* IMB B-7241 and *N. vaccinii* IMB B-7405 surfactants concerning *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ B-1154 МІК was found to be (mg/ml): 0.056, 0.024 and 0.075 respectively. These data has shown prospects for using microbial SAS for the construction of ecologically friendly preparations for regulating the number of phytopathogenic bacteria.

**ВПЛИВ ПОЗАКЛІТИННИХ МЕТАБОЛІТІВ
RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS IMB AC-5017,
ACINETOBACTER CALCOACETICUS IMB B-7241 I
NOCARDIA VACCINII IMB B-7405 НА ФІТОПАТОГЕННІ
БАКТЕРІЇ PSEUDOMONAS SYRINGAE PV.
CORONAFACIENSУКМ B-1154**

К.В. Панасюк, Т.П. Пирог

Національний університет харчових технологій

У статті досліджено вплив поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* IMB Ac-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* IMB B-7241 і *Nocardia vaccinii* IMB B-7405 на *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ B-1154 —

збудника бактеріозів сільськогосподарських рослин. Показано, що після обробки упродовж 1 год препаратами ПАР (0,15—0,4 мг/мл) штамів ІМВ В-7241 і ІМВ Ас-5017 виживання клітин (10^6 — 10^7 КУО/мл) фітопатогенних бактерій становило 40 %, у той час як за наявності препаратів ПАР *N. vaccinii* ІМВ В-7405 (0,4 мг/мл) — 22 %. Встановлено, що мінімальна інгібуюча концентрація ПАР *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *N. vaccinii* ІМВ В-7405 щодо *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 МІК становила 0,056, 0,024 та 0,075 (мг/мл) відповідно. Отримані результати показують перспективність використання мікробних ПАР для розробки екологічно безпечних препаратів для контролю кількості фітопатогенних бактерій.

Ключові слова: антимікробна дія, поверхнево-активні речовини, фітопатогенні бактерії, мінімальна інгібуюча концентрація.

Постановка проблеми. Відомо, що втрати врожаю від шкідників, хвороб і бур'янів в Україні щороку становлять від 30 до 50 % [1—4]. У сільському господарстві через пригнічення грибної мікрофлори в результаті застосування антибіотиків та антифунгальних біопрепаратів гостро постало питання боротьби із бактеріо-зами рослин, спричиненими фітопатогенними бактеріями родів *Pectobacterium*, *Pseudomonas* та *Xanthomonas* [1, 5—7]. Фітопатогенні бактерії *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 є збудниками захворювань багатьох злакових культур (овес, жито тощо) [4].

У попередніх дослідженнях було встановлено антимікробну дію поверхнево-активних речовин (ПАР) *Rhodococcus erythropolis* ІМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ІМВ В-7241 і *Nocardia vaccinii* ІМВ В-7405 щодо ряду фітопатогенних бактерій [8]. З літератури відомо, що оптимальним критерієм активності того чи іншого препарату з антимікробними властивостями є мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) — найменша концентрація препарату, що пригнічує видимий неозброєним оком ріст тест-культури [9].

Мета статті. Дослідження антимікробних властивостей ПАР штамів ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 і ІМВ В-7405 і визначення мінімальної інгібуючої концентрації щодо фітопатогенних бактерій *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154.

Матеріали і методи. Штами *Rhodococcus erythropolis* ЕК-1, *Acinetobacter calcoaceticus* К-4 та *Nocardia vaccinii* К-8 зареєстровані в Депозитарії мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за номерами ІМВ Ас-5017, ІМВ В-7241 і ІМВ В-7405 відповідно.

Фітопатогенні бактерії *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 з Української колекції мікроорганізмів (УКМ) були люб'язно надані співробітниками відділу фітопатогенних бактерій Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

R. erythropolis ІМВ Ас-5017 вирощували на рідкому поживному середовищі (г/л): NaNO_3 — 1,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl — 1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01; рН 6,8—7,0. Як субстрат використовували пересмажену соняшникову олію у концентрації 2 % (об'ємна частка).

Для культивування *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 використовували поживне середовище такого складу (г/л): $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ — 0,35; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; NaCl —

1,0; Na_2HPO_4 — 0,6; KH_2PO_4 — 0,14; рН 6,8—7,0. У середовище додатково вносили дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка) і розчин мікроелементів — 0,1 % (об'ємна частка). Джерело вуглецю — етанол у концентрації 2 % (об'ємна частка).

Штам *N. vaccinii* ІМВ В-7405 вирощували на середовищі такого складу (г/л): NaNO_3 — 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; KH_2PO_4 — 0,1; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,1; дріжджовий автолізат — 0,5 % (об'ємна частка). Джерело вуглецю та енергії — гліцерин у концентрації 1,5 %.

Як інокулянт використовували культури з експоненційної фази росту, вирощені на рідких середовищах наведеного вище складу з відповідними джерелами вуглецю (0,5 %). Концентрація посівного матеріалу (10^4 — 10^5 КУО/мл) становила 5—10 % від об'єму поживного середовища. Культивування бактерій здійснювали в колбах об'ємом 750 мл із 100 мл середовища на качалці (320 об/хв) при 28—30 °С упродовж 120—168 год.

Синтез ПАР оцінювали за концентрацією поверхнево-активних речовин у культуральній рідині (г/л), яку визначали ваговим методом [8].

У дослідженнях використовували препарати поверхнево-активних речовин *N. vaccinii* ІМВ В-7405, *R. erythropolis* ІМВ Ас-5017, *A. calcoaceticus* ІМВ В-7241 різного ступеня очищення [8]: із супернатанту культуральної рідини (препарат 1), що містив ПАР, екстракцією сумішню Фолча (хлороформ-метанол, 2:1) виділяли ПАР (препарат 2). Водна фаза після екстракції ПАР умовно названа нами препарат 3. Для одержання супернатанту (препарат 1) культуральну рідину центрифугували (5000-г, 45 хв).

Антимікробні властивості препаратів 1—3 визначали так: у суспензії добової культури *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154, вирощеної на м'ясо-пептонному агарі, визначали кількість живих клітин за методом Коха (колоній-утворювальні одиниці, КУО/мл). Потім суспензію тест-культури вносили у пробірки (1,5 мл), додавали по 1,5 мл розчину досліджуваного препарату і витримували упродовж 1 год при температурі 30 °С, після чого визначали кількість живих клітин (з урахуванням змінення об'єму суспензії в результаті внесення препаратів). Виживання клітин визначали як відношення кількості живих клітин у зразках, підданих дії ПАР, до кількості клітин у вихідній суспензії і виражали у відсотках.

Для визначення МІК застосовували метод двократних серійних розведень [9] у рідкому середовищі Громико (м'ясо-пептонний бульйон і суло, 1:1). У стерильних умовах у 10 пробірок вносили по 1 мл середовища Громико, в першу додавали 1 мл розчину ПАР певної концентрації, перемішували, відбирали 1 мл і переносили у наступну пробірку. З останньої пробірки піпеткою відбирали 1 мл. Таким чином, кінцевий об'єм середовища в кожній пробірці становив 1 мл (середовище Громико та розчин ПАР), а концентрація ПАР у кожній наступній пробірці знижувалася у 2 рази. Як контроль використовували 1 мл середовища Громико без додавання розчину ПАР. Далі 0,1 мл суспензії тест-культури (10^5 КУО/мл) вносили у кожну з пробірок та перемішували. Пробірки інкубували упродовж 24 год при 30 °С. Результати оцінювали візуально за помутнінням середовища: (+) — пробірки, де спостерігалося помутніння середовища (ріст тест-культури), (–) — помутніння було

відсутнє (немає росту). Мінімальну інгібуючу концентрацію розчину ПАР визначали як середнє значення між концентраціями ПАР в останній пробірці, де ріст був відсутній і в першій, де він був наявний.

Результати і обговорення. На першому етапі досліджували антимікробні властивості препаратів ПАР *R. erythropolis* IMB Ас-5017, *A. calcoaceticus* IMB В-7241 і *N. vaccinii* IMB В-7405 різного ступеня очищення щодо *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 (табл.).

Таблиця. Вплив препаратів поверхнево-активних речовин штамів IMB В-7241, IMB Ас-5017, IMB В-7405 на виживання *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154

Штам-продуцент ПАР	Препарати ПАР	Вживання, %
<i>A. calcoaceticus</i> IMB В-7241	1	87,0
	2	38,9
<i>R. erythropolis</i> IMB Ас-5017	1	52,0
	2	40,0
<i>N. vaccinii</i> IMB В-7405	1	33,0
	2	22,0

Примітки. Концентрація ПАР в препаратах 1 (супернатант культуральної рідини), 2 (розчин ПАР) (мг/мл): *A. calcoaceticus* IMB В-7241 — 0,15; *R. erythropolis* IMB Ас-5017 — 0,4; *N. vaccinii* IMB В-7405 — 0,4. Кількість клітин *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 до внесення препаратів ПАР — $4,5 \times 10^5$ КУО/мл. Експозиція 1 год. При визначенні виживання клітин похибка не перевищувала 5 %.

Із даних, наведених у таблиці, видно, що більш ефективними антимікробними агентами виявилися препарати 2 (розчин ПАР). За обробки розчинами ПАР усіх досліджуваних штамів спостерігали зниження кількості клітин *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 на 61—78 %. Слід зазначити, що антимікробні властивості розчину ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241 з концентрацією 0,15 мг/мл були порівнянними з ПАР *R. erythropolis* IMB Ас-5017 та *N. vaccinii* IMB В-7405 вищої концентрації (0,4 мг/мл). Це явище можна пояснити наявністю у складі ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241 ліпопептидів, які характеризуються сильною антимікробною дією [10, 11].

На наступному етапі досліджували вплив препаратів 3 (водна фаза, що залишилася після екстракції ПАР з супернатанту культуральної рідини) на фітопатогенні бактерії (рис. 1).

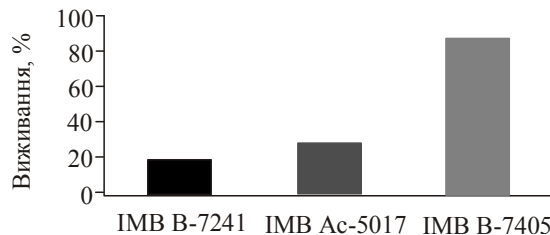


Рис. 1. Вплив препарату 3 (водна фаза) *A. calcoaceticus* IMB В-7241, *R. erythropolis* IMB Ас-5017, *N. vaccinii* IMB В-7405 на виживання *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154

Із даних, наведених на рис. 1, видно, що за обробки цим препаратом також спостерігали зниження кількості клітин *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154. Такі дані можуть свідчити про синтез усіма досліджуваними штамми інших, відмінних від ПАР метаболітів з антимікробними властивостями.

Мінімальна інгібуюча концентрація є незалежним показником, за допомогою якого можна одночасно порівнювати між собою ефективність багатьох антимікробних агентів. Порівняно з іншими методами аналізу активності відповідних препаратів, визначення МІК має низку переваг: простота і швидкість аналізу, можливість одночасного визначення для кількох тест-культур, дослідження ефективності різних препаратів чи препаратів різного ступеня очищення [9].

Значення мінімальної інгібуючої концентрації розчинів ПАР (препарати 2) досліджуваних штамів наведено на рис. 2.

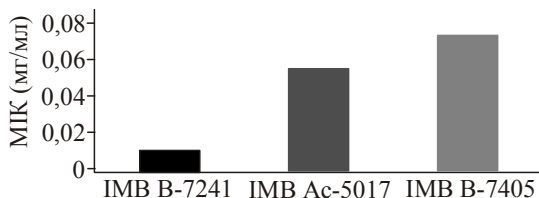


Рис. 2. Мінімальна інгібуюча концентрація розчинів ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241, *N. vaccinii* IMB В-7405, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 щодо *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 (кількість клітин *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 (добова культура) до внесення препаратів ПАР становила 105 КУО/мл, експозиція 24 год)

Наведені дані показують, що значення мінімальної інгібуючої концентрації розчинів ПАР *A. calcoaceticus* IMB В-7241, *N. vaccinii* IMB В-7405, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 суттєво відрізняється. Так, найефективнішим виявився ПАР штаму IMB В-7241: МІК становила 0,01 мг/мл, тоді як для IMB Ac-5017 і IMB В-7405 — 0,055 та 0,075 мг/мл відповідно.

У [12] показано можливість використання клітин *Bacillus subtilis* 6051, а також їхніх метаболітів (сурфактин) у боротьбі з фітопатогенними бактеріями *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, які пошкоджують коріння арабідопсіса. Мінімальна інгібуюча концентрація сурфактину становила 0,025 мг/мл. Результати, наведені у пропонованому дослідженні, свідчать, що МІК поверхнево-активних речовин *A. calcoaceticus* IMB В-7241 у 2,5 раза нижча, ніж для сурфактину *B. subtilis* 6051.

Висновки

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено, що позаклітинні метаболіти *A. calcoaceticus* IMB В-7241, *N. vaccinii* IMB В-7405, *R. erythropolis* IMB Ac-5017 (у тому числі й ПАР) проявляють антимікробну дію щодо збудника бактеріозів злакових культур *P. syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154. Найефективнішим антимікробним агентом виявився розчин ПАР штаму IMB В-7241, мінімальна інгібуюча концентрація якого становила 0,01 мг/мл.

Література

1. Харченко А.В. Бактериозы. Всё, что нужно знать // Зерно. — 2012. — Т. 15, № 3. — С. 19—25.

2. Машуцький К.Л. В Україні загинуло 8,5 % площі озимих зернових // Корреспондент. biz. — 2012. — Т. 17, № 6. — С. 5—7.
3. Сикало О.І., Білик А.Л., Савчук О.Г. Карантинні бактеріозиди зернових культур // Пропозиція. — 2012. — Т. 23, № 10. — С. 11—15.
4. Гвоздяк Р.И. Фитопатогенные бактерии. Бактериальные заболевания растений [Р.И. Гвоздяк, Л.А. Пасичник, Л.М. Яковлева и др.] // ООО «НВП «Интерсервис». — 2011. — С. 444.
5. Willems J.L., William P.H., Debra E.B., Feil E.J. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance // FEMS Microbiol. — 2011. — Vol. 35. — P. 872—900.
6. Hojgard S. Antibiotic resistance. Why is the problem so difficult to solve? // Infect. Ecol. Epidemiol. — 2012. — Vol. 7, № 14. — P. 1113—1124.
7. Laluk K., Mengiste T. Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? // Am. Soc. Plant Biol. — 2010. — Vol. 7, № 3. — P. 1—34.
8. Пирог Т.П., Конон А.Д., Софилканич А.П., Иутинська Г.А. Действие поверхностно-активных веществ *A. calcoaceticus* ИМВ В-7241, *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017 и *N. vaccinii* ИМВ К-8 на фитопатогенные бактерии // Прикладная биохимия и микробиология. — 2013. — Т. 49, № 4 — С. 364—371.
9. Andrews J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations // J. Antimicrob. Chemother. — 2001. — Vol. 48, № 1 (Suppl). — P. 5—16.
10. Tabbenel O., Kalai L., Slimene I.B., Karkouch I., Elkahoui S., Gharbi A., Cosette P., Mangoni M.L., Jouenne T., Limam F. Anti-Candida effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38 // Microbiol. Lett. — 2011. — Vol. 316. — P. 108—114.
11. Sriram M.I., Kalishwaralal K., Deepak V., Gracerosepat R., Srisakthi K., Gurunathan S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1 // Colloids Surf. B. Biointerfaces. — 2011. — Vol. 85, № 2. — P. 174—181.
12. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production // Plant. Physiol. — 2004. — V. 134, № 1. — P. 307—319.

**ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS ИМВ АС-5017,
ACINETOBACTER CALCOACETICUS ИМВ В-7241 И
NOCARDIA VACCINII ИМВ В-7405 НА
ФИТОПАТОГЕННЫЕ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS*
SYRINGAE PV. *CORONAFACIENS* УКМ В-1154**

Е.В. Панасюк, Т.П. Пирог

Национальный университет пищевых технологий

В статье исследовано влияние поверхностно-активных веществ (ПАВ) *Rhodococcus erythropolis* ИМВ Ас-5017, *Acinetobacter calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *Nocardia vaccinii* ИМВ В-7405 на *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ

*B-1154 — возбудителя бактериозов сельскохозяйственных растений. Показано, что после обработки в течение 1 ч препаратами ПАВ (0,15—0,4 мг/мл) штаммов ИМВ В-7241 и ИМВ Ас-5017 выживаемость клеток (10^6 — 10^7 КОЕ/мл) фитопатогенных бактерий составляла 40 %, в то время как в присутствии препаратов ПАВ *N. vacciniі* ИМВ В-7405 (0,4 мг/мл) — 22%. Установлено, что минимальная ингибирующая концентрация ПАВ *R. erythropolis* ИМВ Ас-5017, *A. Calcoaceticus* ИМВ В-7241 и *N. vacciniі* ИМВ В-7405 по отношению к *Pseudomonas syringae* pv. *coronafaciens* УКМ В-1154 составляла 0,056, 0,024 и 0,075 (мг/мл) соответственно. Полученные результаты показывают перспективность использования микробных ПАВ для разработки экологически безопасных препаратов для контроля количества фитопатогенных бактерий.*

Ключевые слова: антимикробное действие, поверхностно-активные вещества, фитопатогенные бактерии, минимальная ингибирующая концентрация.