

УДК 604 + 632:632.3

Reprinted from: *Naukovi Visti NTUU KPI*. 2017;3:43-8

DOI: 10.20535/1810-0546.2017.3.96283

В.В. Швець^{1*}, О.В. Карпенко¹, І.В. Карпенко¹, В.П. Новіков², В.І. Лубенець²¹Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, Львів, Україна²Національний університет “Львівська політехніка”, Львів, Україна

АНТИМІКРОБНА АКТИВНІСТЬ КОМПОЗИЦІЙ НА ОСНОВІ ТІОСУЛЬФОНАТІВ І БІОГЕННИХ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН ЩОДО ФІТОПАТОГЕНІВ

Проблематика. Розробка екологічно безпечних препаратів з антимікробною активністю та інгібувальним ефектом відносно мікроорганізмів-фітопатогенів для захисту рослин.

Мета дослідження. Визначити антимікробну активність композицій алілтіосульфанилату (АТС) і метилтіосульфанилату (МТС) з поверхнево-активним рамноліпідним біокомплексом (РБК) щодо фітопатогенів *Agrobacterium tumefaciens* та *Clavibacter michiganensis*.

Методика реалізації. Дослідження *in vitro* антимікробної дії композицій на основі похідних тіосульфокислот (АТС і МТС) і РБК щодо мікроорганізмів-фітопатогенів *A. tumefaciens* і *C. michiganensis* за їх мінімальними інгібувальними й бактерицидними концентраціями. Вивчення впливу біоПАР на проникність клітинних мембран бактерій.

Результати дослідження. Показано, що композиції МТС і АТС з РБК є більш активними та мають менші значення мінімальних інгібувальних і бактерицидних концентрацій, ніж АТС і МТС окремо – у середньому на 50 %.

Висновки. Результати доводять перспективність використання рамноліпідних біогенних поверхнево-активних речовин для створення вискоелективних комплексних агробіопрепаратів для захисту рослин.

Ключові слова: біогенні поверхнево-активні речовини; тіосульфонати; мікроорганізми-фітопатогени; мінімальна інгібувальна концентрація; мінімальна бактерицидна концентрація; проникність клітинних мембран.

Вступ

Значною проблемою сільського господарства залишаються грибові, бактеріальні та вірусні хвороби рослин (бактеріальний рак винограду, мозаїчні хвороби картоплі, сої, пшениці), які спричиняють зниження врожаїв основних сільськогосподарських культур, негативно впливають на якість продуктів харчування для людей та кормів для тварин.

Фітопатогенні ураження сільськогосподарських культур є однією з основних причин економічних втрат у агрономії. Ці економічні збитки зумовлені підвищеним гниттям, зниженням приросту біомаси рослин. У наш час у рослинництві широко використовуються різноманітні пестициди, що допомагають аграріям України і світу в боротьбі з хворобами сільськогосподарських рослин. Але, крім позитивного результату, широке застосування біоцидних речовин має значний негативний наслідок – виникнення резистентних форм мікроорганізмів-фітопатогенів [1]. Крім того, синтетичні засоби вкрай негативно впливають на екологічний стан довкілля, здоров'я людей.

Тому постійно актуальною є необхідність створення екологічно безпечних біоцидних пре-

паратів нового покоління – зручних для застосування, зокрема у формі стабільних композицій, які можуть усувати дію фітопатогенних мікроорганізмів і попереджати її, а також зводити до мінімуму процеси, що супроводжують пошкодження рослин. Разом із тим, вони мають бути нешкідливими для людей, тварин і довкілля.

У цьому аспекті досліджень особливе місце посідають тіосульфоестери, які вирізняються широким спектром біологічної активності, деякі з них запропоновані як ефективні засоби захисту рослин, рістрегулятори, біоцидні добавки, консерванти фруктів та овочів, інсектициди, радіопротектори, лікарські субстанції [2, 3]. Крім того, вони є структурними аналогами біологічно активних сполук природного походження, зокрема фітонцидів часнику (*Allium sativum* L.), цибулі (*Allium cepa* L.), глибоководного морського їжака *Echinocardium cordatum*, а також цвітної капусти, з якої виділено S-метилметантіосульфонат [4], що слугує додатковою перевагою для їх дослідження як перспективних антимікробних субстанцій [3].

Проте тіосульфонати характеризуються низькою розчинністю у воді, що ускладнює їх використання. Структура поверхні мікробної клі-

*corresponding author: volodumurshvets@gmail.com

тини забезпечує ефективний захисний бар'єр від антимікробних препаратів. Підвищення проникності клітинних мембран різними агентами допомагає подолати цей бар'єр і збільшити сприйнятливості до антибіотиків. Відомо, що поверхнево-активні речовини впливають на проникність мембран низки мікробних клітин [5].

Особливі властивості біогенних ПАР (поверхнева, емульгувальна активність, змочування поверхонь, вплив на проникність клітинних мембран) обумовлюють їх перспективи для створення комплексних препаратів із різними біологічно активними речовинами, у т.ч. слабозчинними у воді тіосульфонатами [6]. У композиціях з біоПАР можна підвищити ефективність та зменшити робочі концентрації біоцидів, що важливо з економічної та екологічної точки зору.

У попередніх працях було показано доцільність використання рамноліпідних ПАР у композиціях із антимікробними субстанціями, зокрема з тіосульфонатами (МТС та ЕТС) [7, 8].

Постановка задачі

Мета роботи – дослідити антимікробну активність композицій алілтіосульфанілату і метилтіосульфанілату з поверхнево-активним рамноліпідним біокомплексом щодо фітопатогенів *Agrobacterium tumefaciens* та *Clavibacter michiganensis*, визначити мінімальні інгібувальні та мінімальні бактерицидні концентрації препаратів.

Матеріали і методи

У роботі використано алілтіосульфанілат (АТС) та метилтіосульфанілат (МТС) – синтетичні аналоги природних фітонцидів, синтезовані на кафедрі технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології Національного університету “Львівська політехніка” [3, 9], і рамноліпідний біокомплекс (РБК) – продукт мікробного синтезу штаму *Pseudomonas* sp. PS-17, що містить поверхнево-активні рамноліпіди і полісахарид (4:1), отриманий у Відділенні фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ ім. Л.М. Литвиненка НАН України [10], а також композиції на їх основі.

Для приготування композицій АТС і МТС з РБК брали наважки тіосульфонатів, розчиняли їх у відповідному об'ємі етанолу (96 %-ного), одержаний розчин розбавляли дистильованою водою, нагрівали до 50–70 °С та доводили його рН до 3,5–4. Далі одержані розчини тіосульфонатів (АТС, МТС) змішували з відповідною кіль-

кістю розчину рамноліпідного біокомплексу при перемішуванні за температури 50 °С, доводили рН до 7. Таким чином, були виготовлені стабільні за кімнатної температури водорозчинні біоцидні композиції тіосульфонатів з РБК.

Антимікробну активність РБК, тіосульфонатів та їх композицій визначали щодо мікроорганізмів-фітопатогенів *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis* з Української колекції мікроорганізмів (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Культивування мікроорганізмів проводили в колбах Ерленмейєра (750 мл) з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв) за 30 °С на рідкому живильному середовищі (г/л): $C_6H_{12}O_6$ – 100; дріжджовий екстракт – 2; $CaCO_3$ – 30; рН 5,4–6,3 для *A. tumefaciens* та $C_6H_{12}O_6$ – 15; дріжджовий екстракт – 10; $CaCO_3$ – 5; рН 7 для *C. michiganensis*. Тривалість культивування – 5 діб.

Антимікробну активність оцінювали за показниками мінімальної інгібувальної (МІК) і бактерицидної (МБК) концентрацій препаратів [7]. Добові культури тестових мікроорганізмів розводили ізотонічним розчином натрій хлориду до 1×10^9 КУО/см³. Живильні середовища у 24-луноківих пластикових планшетах (Sarstedt, США) з об'ємом лунок 200,0 мкл засівали інокулятом тестової культури. Мінімальна концентрація препарату, яка давала повну видиму затримку росту культури, відповідала МІК цього препарату щодо тестових культур, що визначало ступінь їх чутливості. Для визначення бактерицидної дії препаратів із останніх прозорих лунок проводили висів на агаризоване живильне середовище. За МБК дослідних препаратів поклали найменшу їх концентрацію у пробірці, висів із якої після інкубації не давав росту бактерій на агарі. Вплив рамноліпідного біокомплексу на проникність клітинних мембран мікроорганізмів оцінювали за кількістю позаклітинного білка (після оброблення клітинної суспензії розчинами РБК різної концентрації) [11], чисельність життєздатних клітин мікроорганізмів – методом серійних розведень [12].

Результати і їх обговорення

Було розроблено композиції тіосульфонатів (метилтіосульфанілату й алілтіосульфанілату) з рамноліпідним біокомплексом. Антимікробний потенціал тіосульфонатів, біоПАР і композицій на їх основі вивчено щодо тестових фітопатогенів *A. tumefaciens* (збудник бактеріального раку ви-

нограду і плодових дерев) та *C. michiganensis* (бактеріальна кільцева гниль овочів).

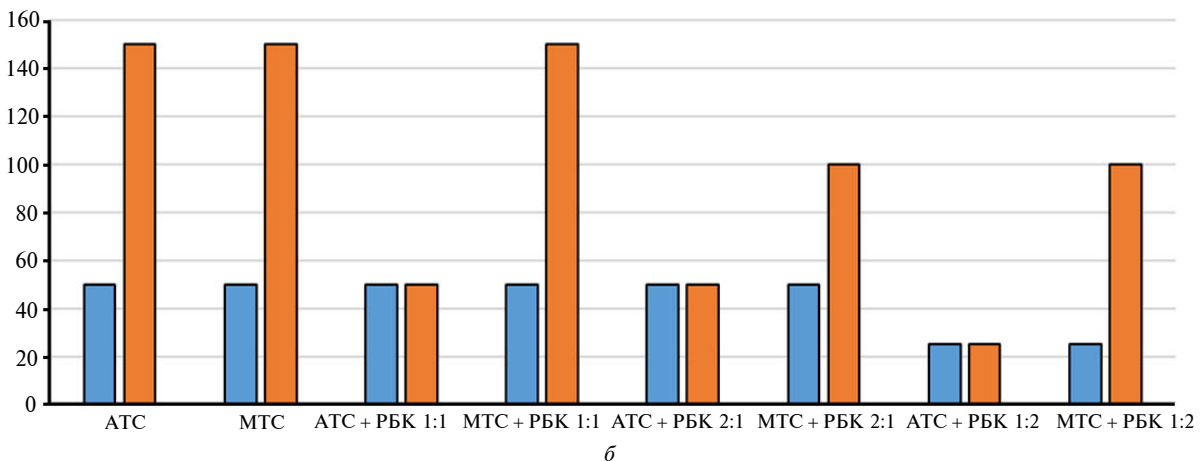
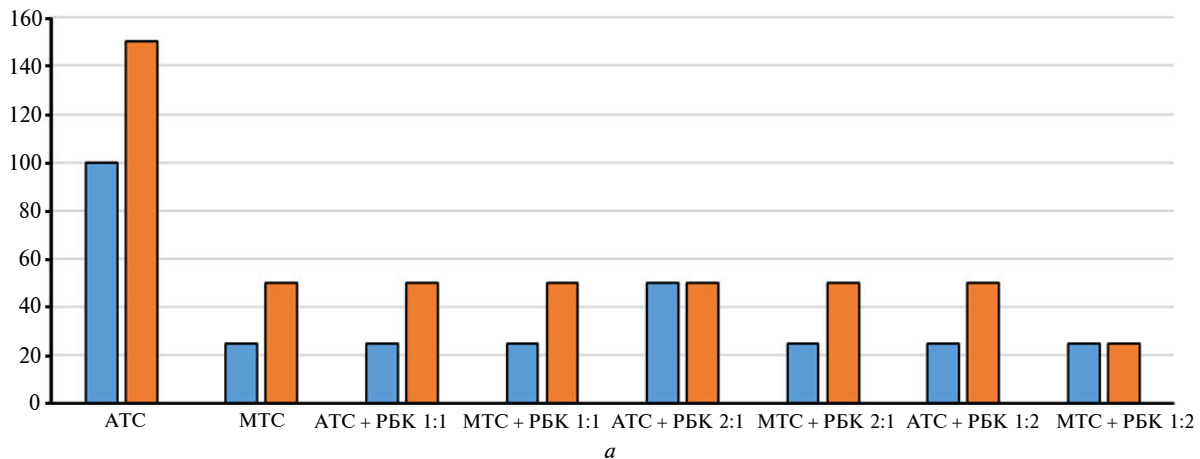
Встановлено, що у композиціях із біоПАР істотно підвищується антимікробна активність досліджених тиосульфонатів. Антимікробну дію отриманих композицій та їх складників було оцінено за мінімальними значеннями інгібувальних і бактерицидних концентрацій щодо тестових фітопатогенів (рисунок).

Як видно з рисунка, значення МІК і МБК препаратів до досліджуваних мікроорганізмів були досить різноманітними. Визначено, що МІК для алілтіосульфонату щодо *C. michiganensis* була 50 мг/мл, а МБК – 150 мг/мл, і такі ж значення були отримані для метилтіосульфанілату. Для культури *A. tumefaciens* МІК для АТС становила 100 мг/мл, а МБК – 150 мг/мл, найменшими були МІК для МТС – 25 мг/мл, та МБК – 50 мг/мл. Експериментальні дані показали, що в композиції з рамноліпідним біокомплексом (1:1) бактерицидні концентрації

АТС відносно *C. michiganensis* знижувалися до 25 мг/мл, таке ж значення було отримано для МІК.

Достатньо ефективною композиція АТС–РБК (1:1) виявилась щодо *A. tumefaciens*: МІК – 25 мг/мл, МБК – 50 мг/мл. Також результати показали, що і для композицій метилтіосульфанілату з РБК (1:2) мінімальна інгібувальна концентрація знизилась до 25 мг/мл, а МБК – також до 25 мг/мл щодо *A. tumefaciens*. У композиціях МТС–РБК мінімальна бактерицидна концентрація щодо *C. michiganensis* знижувалися до 100 мг/мл, а МІК – до 25 мг/мл.

Важливим показником, що може бути поясненням функціональної дії поверхнево-активного РБК у композиціях, є його вплив на проникність клітинних мембран мікроорганізмів, яку вивчено щодо вибраних фітопатогенів. Дослідження проводили за зміною кількості позаклітинного білка після оброблення клітинної суспензії розчинами РБК (таблиця).



Антимікробна активність тиосульфонатів, РБК, їх композицій щодо *A. tumefaciens* (а) і *C. michiganensis* (б): МІК – мінімальна інгібувальна концентрація, МБК – мінімальна бактерицидна концентрація, МТС – метилтіосульфонат, АТС – алілтіосульфонат, РБК – рамноліпідний біокомплекс

Таблиця. Вплив рамноліпідного біокомплексу на проникність клітинних мембран тестових мікроорганізмів

Культури мікроорганізмів	Концентрація РБК, г/л	Вміст позаклітинного білка, % до контролю	Чисельність життєздатних клітин після обробки розчином РБК, КУО/мл
<i>Clavibacter michiganensis</i>	0	100,0	6×10^{10}
	0,01	112,5	3×10^{10}
	0,05	136,8	9×10^9
	0,1	190,1	4×10^8
	0,5	205,2	8×10^7
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0	100,0	8×10^{10}
	0,01	109,3	6×10^{10}
	0,05	125,9	5×10^{10}
	0,1	134,4	4×10^8
	0,5	190,0	2×10^7

Результати свідчать, що після оброблення клітин розчином РБК (0,05–0,1 г/дм³) кількість позаклітинного білка зростала в середньому на 70 % (зі збереженням життєздатності бактерій), що, очевидно, пов'язано з підвищенням проникності клітинних мембран [13]. Отже, виявлене підсилення антимікробної дії досліджених тиосульфатів можна пояснити впливом РБК на проникність клітинних мембран мікроорганізмів, що підтверджується і результатами попередніх досліджень [12, 14]. Завдяки таким властивостям біогенні ПАР можна використовувати як активуючі добавки у композиціях із біоцидами або іншими препаратами для підвищення їх ефективності.

Висновки

Розроблені композиції на основі тиосульфатів та поверхнево-активного РБК проявляють високу антибактеріальну активність відносно мікроорганізмів-фітопатогенів *A. Tumefa-*

cians і *C. michiganensis*. Отримані результати показали, що в композиціях із РБК можна істотно знизити мінімальні інгібувальні та бактерицидні концентрації метил- і алілтіосульфатів – у середньому на 50 %.

Результати досліджень свідчать про практичні перспективи розроблених композицій на основі тиосульфатів і рамноліпідних біоПАР для створення високоефективних екологічно безпечних препаратів широкого спектра антимікробної дії: для захисту промислового обладнання, в сільському господарстві – для боротьби зі шкідливими фітопатогенами і для досягнення високої врожайності рослин, у ветеринарії і біомедицині та при біоремедіації забрудненого довкілля.

Подальші дослідження будуть спрямовані на створення нових біоцидних композиційних препаратів на основі тиосульфатів різної будови та біогенних рамноліпідних і трегалозоліпідних ПАР.

Список літератури

1. Hojgard S. Antibiotic resistance. Why is the problem so difficult to solve? / S. Hojgard, K. Faruk // Infect. Ecol. Epidemiol. – 2012. – Vol. 7, № 14. – P. 1113–1124.
2. Лубенець В.І. Тиосульфати: синтез і властивості / В.І. Лубенець // Укр. хім. журн. – 2003. – Т. 69, № 3. – С. 109–117.
3. Synthesis and antimicrobial properties of 4-acylamino-benzenethiosulfoacid S-esters / V. Lubenets, S. Vasylyuk, N. Monka [et al.] // Saudi Pharmaceutical J. – 2017. – Vol. 25, № 2. – P. 266–274.
4. Chemopreventive effect of S-methylmethane thiosulfonate and sulindac administered together during the promotion/progression stages of colon carcinogenesis / B. Reddy, T. Kawamori, R. Lubet [et al.] // Carcinogenesis. – 1999. – Vol. 20, № 8. – P. 1645–1648.
5. Galabova D. Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100 / D. Galabova, B. Tuleva, D. Spasova // Enzyme and Microbial Technology. – 1996. – Vol. 18. – P. 18–22.

6. Environmental applications of biosurfactants: recent advances // M. Pacwa-Плосинiczak, G.A. Пłaza, Z. Piotrowska-Seget, S.S. Cameotra / Int. J. Mol. Sci. – 2011. – Vol. 12. – P. 633–654.
7. Development of new antimicrobial compositions of thiosulfonate structure / V. Lubenets, O. Karpenko, M. Ponomarenko [et al.] // Chemistry and Chemical Technology. – 2013. – Vol. 7, № 2. – P. 119–124.
8. The importance of rhamnolipid-biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates / A. Sotirova, T. Avramova, S. Stoitsova [et al.] // Current Microbiol. – 2012. – Vol. 65. – P. 534–541.
9. The plant protection remedies of thiosulfonate type / V. Lubenets, S. Vasylyuk, D. Baranovych, V. Novikov // Chem. Agricult. Environ. – 2007. – Vol. 8. – P. 163–167.
10. Оптимальные методы выделения биогенных поверхностно-активных рамнолипидов / Е.В. Карпенко, Т.Я. Покинъ-брода, Р.Г. Макитра, Е.Я. Пальчикова // Журнал общей химии. – 2009. – Т. 12. – С. 2011–2014.
11. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги ; пер. с венг. И.Ф. Куренного. – М. : Колос, 1983. – 296 с.
12. Sachdev D.P. Biosurfactants in agriculture / D.P. Sachdev, S.S. Cameotra // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2013. – Vol. 97. – P. 1005–1016.
13. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains / A. Sotirova, D. Spasova, D. Galabova [et al.] // Current Microbiol. – 2008. – Vol. 56. – P. 639–644.
14. Antimicrobial potential of selected thiosulfonates-based biocides and biosurfactants against bacteria and fungi / A. Sotirova, T. Avramova, I. Lazarkevich [et al.] // Reports BAS. Biologie Microbiologie. – 2010. – Vol. 63, № 9. – P. 1307–1314.

References

- [1] Hojgard S, Faruk K. Antibiotic resistance. Why is the problem so difficult to solve? Infect Ecol Epidemiol. 2012 Aug;2. DOI 10.3402/iee.v2i0.18165
- [2] Lubenets VI. Thiosulfonates: synthesis and properties. Ukrayins'kyi Khimichnyy Zhurnal. 2003;69(3):109-17.
- [3] Lubenets V, Vasylyuk S, Monka N, Bolibrukh K, Komarovska-Porokhnyavets O, Baranovych D, et al. Synthesis and antimicrobial properties of 4-acylamino-benzenethiosulfoacid S-esters. Saudi Pharmaceut J. 2017;25(2):266-74. DOI 10.1016/j.jsps.2016.06.007
- [4] Reddy B, Kawamori T, Lubet R, Steele V, Kelloff G, Rao CV. Chemopreventive effect of S-methylmethane thiosulfonate and sulindac administered together during the promotion/progression stages of colon carcinogenesis. Carcinogenesis. 1999 Aug;20(8):1645-48. DOI 10.1093/carcin/20.8.1645
- [5] Galabova D, Tuleva B, Spasova D. Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100. Enzyme Microbial Technol. 1996 Jun;18:18-22. DOI 10.1016/0141-0229(96)00063-4
- [6] Pacwa-Плосинiczak M, Пłaza GA, Piotrowska-Seget Z, Cameotra SS. Environmental applications of biosurfactants: recent advances, Int J Mol Sci. 2011 Jan 18;12(1):633-54. DOI 10.3390/ijms12010633
- [7] Lubenets V, Karpenko O, Ponomarenko M, Zahoriy G, Krychkovska A, Novikov V. Development of new antimicrobial compositions of thiosulfonate structure. Chem Chem Technol. 2013;7(2):119-24.
- [8] Sotirova A, Avramova T, Stoitsova S, Lazarkevich I, Lubenets V, Karpenko E, et al. The importance of rhamnolipid-biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates. Curr Microbiol. 2012 Nov;65(5):534-41. DOI 10.1007/s00284-012-0191-7
- [9] Lubenets V, Vasylyuk S, Baranovych D, Novikov V. The plant protection remedies of thiosulfonate type. Chem Agricult Environ. 2007;8:163-7.
- [10] Karpenko EV, Pokynbroda TYa, Makytra RH, Palchykova EYa. Optimal methods for isolating biogenic surface-active rhamnolipids. Zhurnal Obshhej Himii, 2009;12:2011-14.
- [11] Segy J, Methods of soil microbiology. Moscow: Kolos; 1983. 296 p.
- [12] Sachdev DP, Cameotra SS. Biosurfactants in agriculture. Appl Microbiol Biotechnol. 2013 Feb;97(3):1005-16. DOI 10.1007/s00253-012-4641-8
- [13] Sotirova AV, Spasova DI, Galabova DN, Karpenko E, Shulga A. Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains. Curr Microbiol. 2008 Jun;56(6):639-44. DOI 10.1007/s00284-008-9139-3
- [14] Sotirova A, Avramova T, Lazarkevich I, Galabova D. Antimicrobial potential of selected thiosulfonates-based biocides and biosurfactants against bacteria and fungi. Reports BAS. Biologie Microbiologie. 2010;63(9):1307-14.

V.V. Shvets, O.V. Karpenko, I.V. Karpenko, V.P. Novikov, V.I. Lubenets

ANTIMICROBIAL ACTION OF COMPOSITIONS BASED ON THIOSULFONATES AND BIOSURFACTANTS ON PHYTOPATHOGENS

Background. The development of environmentally safe preparations with antimicrobial activity on microorganism-phytopathogens.

Objective. Determination of antimicrobial activity of compositions alilthiosulfonate (ATS) and metylthiosulfonate (MTS) with surface-active rhamnolipid biocomplex (RBC) on phytopathogens *Agrobacterium tumefaciens* and *Clavibacter michiganensis*.

Methods. Investigation *in vitro* of antimicrobial activity of compositions based on thiosulfonates and rhamnolipid biocomplex on microorganism-phytopathogens *A. tumefaciens* and *C. michiganensis* in accordance with the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentrations of developed compositions. Studies of biosurfactant effect on permeability of cell membranes.

Results. It is shown that the composition of methyl- and alilthiosulfonates with RBC are more active and have lower values of minimum inhibitory and bactericidal concentrations than ATS and MTS alone – on average by 50 %.

Conclusions. The results showed the prospects of rhamnolipid-biosurfactants use for creation of highly effective compositions with biocides for plant protection.

Keywords: rhamnolipid biocomplex; thiosulfonates; microorganism-phytopathogens; minimum inhibitory concentration; minimum bactericidal concentration; permeability of cell membrane.

В.В. Швец, А.В. Карпенко, И.В. Карпенко, В.П. Новиков, В.И. Лубенец

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ ТИОСУЛЬФОНАТОВ И БИОГЕННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ФИТОПАТОГЕНАМ

Проблематика. Разработка экологически безопасных препаратов для защиты растений с антимикробной активностью и ингибирующим эффектом на микроорганизмы-фитопатогены.

Цель исследования. Определить антимикробную активность композиций алилтиосульфанилата (АТС) и метилтиосульфанилата (МТС) с поверхностно-активным рамнолипидным биокomплексом (РБК) по отношению к фитопатогенам *Agrobacterium tumefaciens* и *Clavibacter michiganensis*.

Методика реализации. Исследования *in vitro* антимикробного действия композиций на основе производных тиосульфокислот (АТС и МТС) с биоПАВ на микроорганизмы-фитопатогены *A. tumefaciens* и *C. michiganensis* по их минимальным ингибирующим и бактерицидным концентрациям. Изучение влияния биоПАВ на проницаемость клеточных мембран бактерий.

Результаты исследования. Показано, что композиции МТС и АТС с РБК имеют большую активность и характеризуются более низкими значениями минимальных ингибирующих и бактерицидных концентраций, чем АТС и МТС отдельно – в среднем на 50 %.

Выводы. Результаты доказывают перспективность использования рамнолипидных биогенных поверхностно-активных веществ для создания высокоэффективных комплексных агробиопрепаратов для защиты растений.

Ключевые слова: рамнолипидный биокomплекс; тиосульфаты; микроорганизмы-фитопатогены; минимальная ингибирующая концентрация; минимальная бактерицидная концентрация; проницаемость клеточных мембран.