

УДК 604 + 632:632.3

DOI: 10.20535/1810-0546.2017.3.96283

В.В. Швець^{1*}, О.В. Карпенко¹, І.В. Карпенко¹, В.П. Новіков², В.І. Лубенець²

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії та вуглехімії ім. Л.М. Литвиненка НАН України, Львів, Україна

²Національний університет “Львівська політехніка”, Львів, Україна

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

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

Objective. Determination of antimicrobial activity of compositions alithiosulfonate (ATS) and methylthiosulfonate (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 alithiosulfonates 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.

Вступ

Значною проблемою сільського господарства залишаються грибові, бактеріальні та вірусні хвороби рослин (бактеріальний рак винограду, мозаїчні хвороби картоплі, сої, пшениці), які спричиняють зниження врожайів 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 підвищенням гниття, 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: volodumrshvets@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. слаблорозчинними 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).

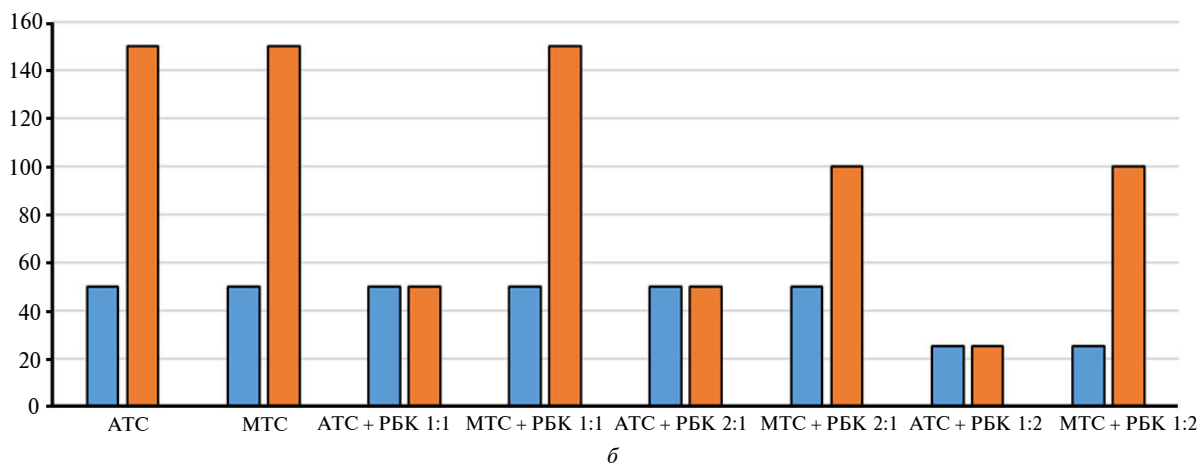
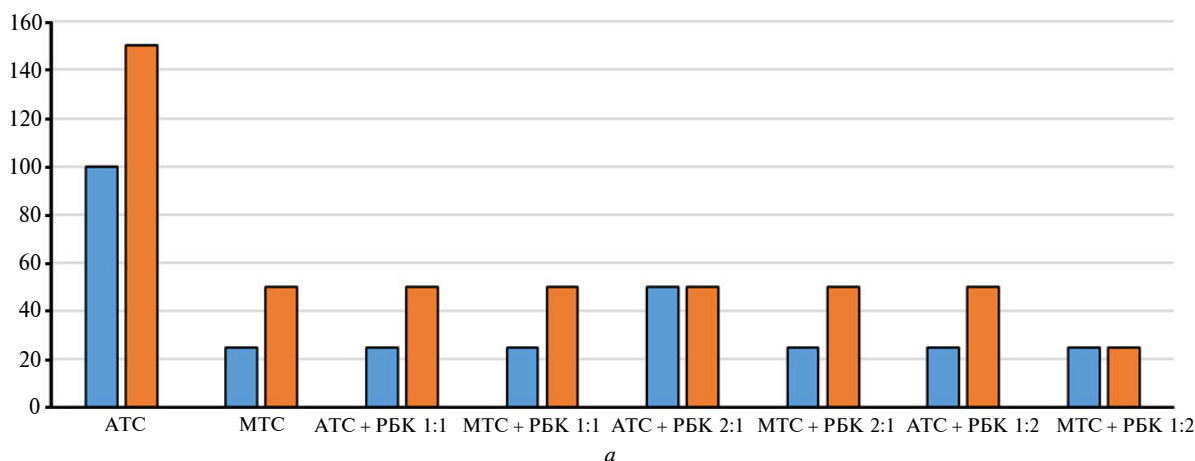
Встановлено, що у композиціях із біоПАР істотно підвищується антимікробна активність досліджених тиосульфонатів. Антимікробну дію отриманих композицій та їх складників було оцінено за мінімальними значеннями інгібувальних і бактерицидних концентрацій щодо тестових фітопатогенів (рисунок).

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. – 7, № 14. – P. 1113–1124.
2. Лубенець В.І. Тиосульфати: синтез і властивості // Укр. хім. журн. – 2003. – 69, № 3. – С. 109–117.
3. Synthesis and antimicrobial properties of 4-acylaminobenzenethiosulfoacid S-esters / V. Lubenets, S. Vasylyuk, N. Monka et al. // Saudi Pharmaceutical J. – 2017. – 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. – 20, № 8. – P. 1645–1648.
5. Galabova D., Tuleva B., Spasova D. Permeabilization of Yarrowia lipolytica cells by triton X-100 // Enzyme and Microbial Technology. – 1996. – 18. – P. 18–22.

6. *Environmental applications of biosurfactants: recent advances* // M. Pacwa-Plociniczak, G.A. Plaza, Z. Piotrowska-Seget, S.S. Cameotra / *Int. J. Mol. Sci.* – 2011. – **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. – **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. – **65**. – P. 534–541.
9. *The plant protection remedies of thiosulfonate type* / V. Lubenets, S. Vasylyuk, D. Baranovych et al. // *Chem. Agricult. Environ.* – 2007. – **8**. – P. 163–167.
10. *Оптимальные методы выделения биогенных поверхностно-активных рамнолипидов* / Е.В. Карпенко, Т.Я. Покинъ-брота, Р.Г. Макитра, Е.Я. Пальчикова // *Журнал общей химии*. – 2009. – **12**. – С. 2011–2014.
11. *Сэгу Й. Методы почвенной микробиологии* / Пер. с венг. И.Ф. Куренного. – М.: Колос, 1983. – 296 с.
12. *Sachdev D.P., Cameotra S.S. Biosurfactants in agriculture* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – **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. – **56**. – P. 639–644.
14. *Antimicrobial potential of selected thiosulfonates-based biocides and biosurfactants against bacteria and fungi* / A. Sotirova, T. Avramova, I. Lazarkevich // *Reports BAS. Biologie Microbiologie*. – 2010. – **63**, № 9. – P. 1307–1314.

References

- [1] S. Hojgard and K. Faruk, “Antibiotic resistance. Why is the problem so difficult to solve?”, *Infect. Ecol. Epidemiol.*, vol. 7, no. 14, pp. 1113–1124, 2012. doi: 10.3402/iee.v2i0.18165
- [2] V.I. Lubenets, “Thiosulfonates: synthesis and properties”, *Ukrayins'kyi Khimichnyy Zhurnal*, vol. 69, no. 3, pp. 109–117, 2003 (in Ukrainian).
- [3] V. Lubenets et al., “Synthesis and antimicrobial properties of 4-acylaminobenzenethiosulfoacid S-esters”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 25, no. 2, pp. 266–274, 2017. doi: 10.1016/j.jsps.2016.06.007
- [4] B. Reddy et al., “Chemopreventive effect of S-methylmethane thiosulfonate and sulindac administered together during the promotion/progression stages of colon carcinogenesis”, *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 8, pp. 1645–1648, 1999. doi: 10.1093/carcin/20.8.1645
- [5] D. Galabova et al., “Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by triton X-100”, *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 18, pp. 18–22, 1996. doi: 10.1016/0141-0229(96)00063-4
- [6] M. Pacwa-Plociniczak et al., “Environmental applications of biosurfactants: recent advances”, *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, pp. 633–654, 2011. doi: 10.3390/ijms12010633
- [7] V. Lubenets et al., “Development of new antimicrobial compositions of thiosulfonate structure”, *Chemistry and Chemical Technology*, vol. 7, no. 2, pp. 119–124, 2013.
- [8] A. Sotirova et al., “The importance of rhamnolipid-biosurfactant induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates”, *Current Microbiol.*, vol. 65, pp. 534–541, 2012. doi: 10.1007/s00284-012-0191-7
- [9] V. Lubenets et al., “The plant protection remedies of thiosulfonate type”, *Chem. Agricult. Environ.*, vol. 8, pp. 163–167, 2007.
- [10] E.V. Karpenko et al., “Optimal methods for isolating biogenic surface-active rhamnolipids”, *Zhurnal Obshhej Himii*, vol. 12, pp. 2011–2014, 2009 (in Russian).
- [11] J. Segy, *Methods of Soil Microbiology*. Moscow, Russia: Kolos, 1983 (in Russian).
- [12] D.P. Sachdev and S.S. Cameotra, “Biosurfactants in agriculture”, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 97, pp. 1005–1016, 2013. doi: 10.1007/s00253-012-4641-8
- [13] A. Sotirova et al., “Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on Gram-positive and Gram-negative bacterial strains”, *Current Microbiol.*, vol. 56, pp. 639–644, 2008. doi: 10.1007/s00284-008-9139-3
- [14] A. Sotirova et al., “Antimicrobial potential of selected thiosulfonates-based biocides and biosurfactants against bacteria and fungi”, *Reports BAS. Biologie Microbiologie*, vol. 63, no. 9, pp. 1307–1314, 2010.

В.В. Швець, О.В. Карпенко, І.В. Карпенко, В.П. Новіков, В.І. Лубенець

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 алілтїосульфанилату (АТС) і метилтїосульфанилату (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 тїосульфокислот (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 високоєфективних комплексних агробіопрепаратів для захисту рослин.

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

В.В. Швець, А.В. Карпенко, І.В. Карпенко, В.П. Новиков, В.І. Лубенець

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 биокомплексом (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 агробиопрепаратив для защиты растений.

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

Рекомендована Радою факультету
біотехнології і біотехніки
КПІ ім. Ігоря Сікорського

Надійшла до редакції
06 березня 2017 року