

УДК 579.841.11 : 577.114.083 : 578.865.1

ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

Pseudomonas chlororaphis subsp. *aureofaciens*

Е. А. Киприанова¹
Л. Д. Варбанец¹
В. В. Шепелевич²
С. И. Войчук¹

¹Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Получено 08.01.2013

Из штаммов *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 — компонентов инсектофунгицидного биопрепарата гаупсин — получены липополисахариды и их фракции, исследована их активность в отношении вируса табачной мозаики. Липополисахариды из клеток штаммов В-111 и В-306 оказались высокоактивными противовирусными агентами и угнетали инфекционность ВТМ на модели трех видов растений-индикаторов в концентрации от 0,001 до 10 мг/мл. Первая фракция липополисахаридов (О-специфические боковые цепи) обоих штаммов не ингибировала вирус табачной мозаики, а часто и стимулировала его репродукцию. В то же время олигосахариды кора (вторая и третья фракции липополисахаридов) в различной степени тормозили развитие вирусной инфекции. По данным электронной микроскопии, при непосредственном контакте липополисахаридов с вирусом *in vitro* вирионы «склеивались», образуя «связки», в то время как в контроле наблюдали отдельные свободные вирусные частицы, что свидетельствует о прямом взаимодействии между липополисахаридами штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* и вирусом табачной мозаики.

Ключевые слова: липополисахариды *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, вирус табачной мозаики, снижение инфекционности, электронная микроскопия.

Активный метаболизм, способность к синтезу разнообразных низкомолекулярных соединений и биополимеров позволяют рассматривать обширный род *Pseudomonas* как один из потенциально наиболее перспективных для использования в биотехнологии, медицине, экологии, сельском хозяйстве. Биопрепараты на основе штаммов *P. putida*, *P. fluorescens* и *P. chlororaphis* широко представлены на современном рынке продуктов биотехнологии и с успехом применяются в качестве средства биологической защиты растений. К числу последних принадлежит и биопрепарат гаупсин, созданный на основе двух штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, который защищен патентом Украины [1] и обладает антифунгальной, антибактериальной и энтомопатогенной активностью.

В последние годы нашими исследованиями был расширен спектр биологической активности гаупсина и показано наличие у него антифитовирусных свойств, связанных с синтезом бактериями термостабиль-

ных экзополимеров [2]. Представляло интерес выяснить, не вносят ли свой вклад в биологическую активность *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* липополисахариды (ЛПС) этих микроорганизмов, поскольку исследованиями последних лет установлено, что они играют важную роль во взаимоотношениях растений с бактериями рода *Pseudomonas* — возбудителями заболеваний, с одной стороны, и с ростстимулирующими штаммами псевдомонад — с другой [3].

Целью работы была оценка противовирусных свойств липополисахаридов штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 — компонентов биопрепарата гаупсин на модели вируса табачной мозаики (ВТМ).

Материалы и методы

Объектом исследования были ЛПС, полученные из клеток *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306.

Микроорганизмы выращивали в условиях аэрации на качалках (220 об/мин) на среде Кинг А следующего состава (г/л): пептон — 20, K₂SO₄ — 20, глицерол — 20, MgCl₂ — 7, дистиллированная вода (до 1 л) [4]. Культивирование проводили в течение 72 ч при температуре 27 °С.

ЛПС получали экстракцией из высушенных ацетоном и эфиром клеток 45%-м водным раствором фенола при 65–68 °С. Водные фракции диализовали против водопроводной, а затем дистиллированной воды для удаления фенола с последующим удалением нуклеиновых кислот осаждением трихлоруксусной кислотой, а также ультрацентрифугированием (104 000 g, 4 ч). Очищенные от нуклеиновых кислот ЛПС лиофилизировали.

Для выделения отдельных структурных компонентов молекулы ЛПС расщепляли 3%-й уксусной кислотой (100 °С, 6 ч), осадок липида А получали ультрацентрифугированием (25 000 g, 40 мин), а супернатант концентрировали до объема 10 мл и фракционировали на колонке (70×3 см) с сефадексом G-50 в 0,025 М пиридинацетатном буфере, pH 4,5. В результате были получены фракции О-специфического полисахарида (ОПС) и олигосахаридов кора (ОГ-кора) [5].

Антивирусную активность оценивали по влиянию препаратов на вирус табачной мозаики (ВТМ) (штамм U₁). Суспензию ВТМ (4 мг/мл), очищенную методом дифференциального центрифугирования, сохраняли при 4 °С в ампулах в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,4) и использовали по мере необходимости. В опытах на растениях-индикаторах по определению антивирусной активности ЛПС использовали ВТМ в конечной концентрации 5 мкг/мл; в электронно-микроскопических исследованиях для изучения взаимодействия вируса и ЛПС применяли ВТМ в концентрации 2 мг/мл.

Способность ЛПС тормозить развитие вирусной инфекции изучали методом половинки на сверхчувствительных к ВТМ растениях дурмана (*Datura stramonium* L.) и табака (*Nicotiana tabacum* L., сорт Иммунный 580 и *Nicotiana sanderae* Н.). При этом исследуемые ЛПС в конечных концентрациях 10, 1, 0,1, 0,01, 0,001 мг/мл добавляли к ВТМ (5 мкг/мл) за 30 мин до инокуляции растений (в контроле к ВТМ добавляли дистиллированную воду). Все препараты, кроме липида А, растворяли в дистиллированной воде. Липид А растворяли в 1%-м диметилсульфоксиде (ДМСО).

Степень угнетения вирусной инфекции (I) рассчитывали по формуле:

$$I = (1 - O/K) \cdot 100, \%,$$

где O — среднее количество некрозов в опыте, K — среднее количество некрозов в контроле. Полученные результаты обрабатывали статистически с применением метода парных сравнений. Статистические результаты представляли в виде доверительных интервалов либо $X_{ср.} \pm Sx_{ср.}$

В электронно-микроскопических исследованиях 0,4 мл смеси ВТМ и ЛПС, содержащей 2 мг/мл ВТМ и 5 мг/мл ЛПС, инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин (контролем служил ВТМ в той же концентрации, разведенный водой), затем готовили препараты для исследований в электронном микроскопе. Использовали медные сеточки (Sigma, США) с пленкой-подложкой из формвара (Serva, Германия), которые помещали на каплю исследуемого материала, выдерживали 1,5 мин и проводили негативное контрастирование 2%-м водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (ФВК). Анализ сеточек осуществляли с помощью трансмиссионного электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и инструментальном увеличении 10 000–30 000.

Результаты и обсуждение

Для выделения отдельных структурных компонентов макромолекулы ЛПС (О-специфический полисахарид — ОПС, олигосахарид кора) использовали мягкий кислотный гидролиз, при котором разрушается кетозидная связь между остатком дезоксиоктоновой кислоты (КДО), компонентом олигосахаридов кора и гидроксильной группой при С6-остатке глюкозамина II, входящего в состав липида А. Выпавший при этом осадок липида А отделяли ультрацентрифугированием. Водорастворимые продукты гидролиза ЛПС разделяли гель-хроматографией на сефадексе G-50. Было показано, что нативные ЛПС представляют собой смесь S- и R-типов молекул, о чем свидетельствует присутствие высокомолекулярной фракции ОПС (фракция I) и низкомолекулярных фракций олигосахаридов кора (фракции II и III) (рис. 1).

Для сравнения кроме ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306 были также использованы ЛПС, выделенные из других видов бактерий — *Rahnella aquatilis* и *Ralstonia solanacearum*.

ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 и В-306 оказались высокоактивными противовирусными агентами и неизменно

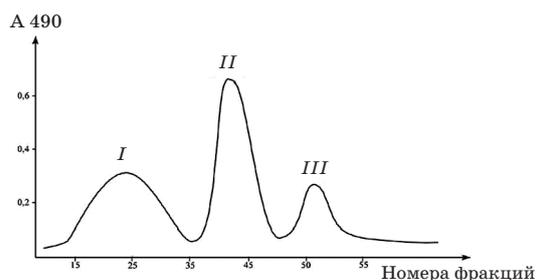


Рис. 1. Профиль элюции на сефадексе G-50 деградированных ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306: I — фракции О-специфического полисахарида; II и III — фракции олигосахарида кора

демонстрировали эффект в отношении ВТМ на растениях семейства *Solanaceae*. При концентрации ЛПС 1–10 мг/мл угнетение инфекционности вируса составляло 98–100%, при 0,1 мг/мл — 57–69%, при 0,01 мг/мл — 43–44%. В концентрации 1 мкг/мл снижение инфекционности вируса составляло в различных экспериментах и на различных растениях-индикаторах от 10,2 до 46,0%. Активность обоих ЛПС была приблизительно одинаковой. В табл. 1 приведены результаты одного из экспериментов на растениях дурмана (*Datura stramonium* L.) и табака (*Nicotiana sanderae* H., *Nicotiana tabacum* L.).

Установлено, что ЛПС, полученные из микроорганизмов, принадлежащих к другим родам и видам (*Rahnella aquatilis* и *Ralstonia solanacearum*), не были активны в отношении ВТМ, а иногда даже стимулировали образование некрозов (табл. 2).

Известно, что ЛПС фитопатогенных видов псевдомонад принадлежат к особой группе молекулярных структур, так называемых РАМР (Pathogen-Associated Molecular Patterns), подавляющих защитный ответ растения на бактериальную инфекцию [6]. В то же время имеются сообщения о том, что ЛПС ростстимулирующих штаммов бактерий рода *Pseudomonas* (т. е. штаммов, используемых для биоконтроля) действуют противоположным образом: инициируют синтез растениями антимикробных агентов, этилена, гиперчувствительную реакцию, т. е. системную экспрессию защитных механизмов растения [3, 6]. В этой связи представляют интерес данные о защищенном патентом Японии штамме бактерий рода *Pseudomonas*, ЛПС которого является индуктором устойчивости однодольных растений Monocotyledonae к заболеваниям, действуя на общие механизмы устойчивости растений к патогенам [7].

В доступной нам литературе мы не встретили данных о противовирусном действии ЛПС бактерий рода *Pseudomonas*, однако исходя из приведенных выше данных можно предположить, что обнаруженная нами активность штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* может быть связана с неспецифической стимуляцией защитных сил растений, инфицированных ВТМ. Выясняя, какой структурный компонент молекулы ЛПС (липид А, олигосахарид кора или О-специфический полисахарид)

Таблица 1. Угнетение ВТМ-инфекции препаратами липополисахаридов из штаммов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 и В-306 на растениях *Datura stramonium* L., *Nicotiana tabacum* и *Nicotiana sanderae* H.

Штамм	ЛПС, мг/мл	<i>Datura stramonium</i> L.			<i>N. tabacum</i>			<i>Nicotiana sanderae</i> H.		
		Количество некрозов		I, %	Количество некрозов		I, %	Количество некрозов		I, %
		опыт	контроль		опыт	контроль		опыт	контроль	
В-111	10	0,0	9,6	100 ^b	–	–	–	0	68,8	100 ^b
	1	0,5	3,0	83 ^b	0,6	11,8	95 ^b	1,8	54,6	97 ^b
	0,1	2,3	11,2	79 ^b	–	–	–	13,2	33,6	61 ^b
	0,01	7,0	8,8	21 ^a	12,4	31,6	61 ^a	12,0	21,0	43 ^a
	0,001	9,4	11,1	15 ^a	5,0	9,2	46 ^a	19,0	22,0	14 ^a
В-306	10	0,0	4,6	100 ^b	0,0	12,3	100 ^b	0,2	41,4	100 ^b
	1	1,4	15,8	91 ^b	4,6	21,3	78 ^b	0,85	13,57	94 ^b
	0,1	1,8	7,8	77 ^b	7,2	16,6	57 ^b	6,0	10,4	43 ^b
	0,01	3,4	7,2	53 ^a	29,4	35,4	17 ^a	3,5	6,0	42 ^a
	0,001	5,4	7,6	29 ^a	28,8	28,2	10,2 ^a	11,0	9,6	11,4 ^a

I, % — снижение инфекционности ВТМ; а — 0,1% < P ≤ 1%, b — P ≤ 0,1%;
– результат отсутствует.

Таблиця 2. Влияние ЛПС *Rahnella aquatilis* и *Ralstonia solanacearum* в концентрации 10 мг/мл на ВТМ-инфекцию

Микроорганизм	Снижение инфекционности ВТМ (I, %) на растениях	
	<i>Datura stramonium</i> L.	<i>Nicotiana sanderae</i> H.
<i>Rahnella aquatilis</i>	3 ^a	30 ^a
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Стимуляция 74% ^a	Стимуляция 11% ^a

проявляет максимальную противовирусную активность, установили, что О-специфические полисахариды обоих штаммов не ингибировали ВТМ, а иногда и стимулировали его развитие на 10–26% на всех испытанных моделях растений-индикаторов. В то же время фракции олигосахаридов кора (фракции II и III, рис. 2 и 3) в различной степени тормозили развитие вирусной инфекции. Исследовать противовирусную активность липида А нам не удалось. Эта фракция оказалась токсичной для растений-индикаторов и вызывала увядание листьев табака и дурмана. Вместе с тем, согласно данным литературы [3], защитный эффект ЛПС обусловлен частью молекулы, содержащей как липид А, так и связанный с ним олигосахарид кора. Возможно, это объясняет и более низкую по сравнению с нативной молекулой ЛПС активность отдельных фракций олигосахаридов кора. В то же время наши данные о влиянии фракций олигосахаридов кора на ВТМ в целом укладываются в представления о том, что во взаимоотношениях ЛПС с растениями именно олигосахарид кора является активным компонентом, а его роль сводится к угнетению или активации защитных реакций растений.

Можно предположить, что и в наших исследованиях олигосахарид кора стимулировал защитные механизмы растений-индикаторов и препятствовал развитию вирусной инфекции.

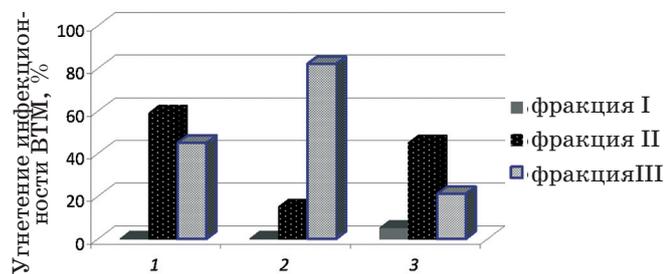


Рис. 2. Противовирусная активность О-специфического полисахарида (фракция I) и олигосахаридов кора (фракции II и III) ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* B-111 в концентрации 1 мг/мл на растениях *Nicotiana tabacum* (1), *Nicotiana sanderae* (2) и *Datura stramonium* (3)

С другой стороны, нас интересовало, влияют ли исследуемые ЛПС на ВТМ при их непосредственном контакте *in vitro* в отсутствие растения. Электронно-микроскопические исследования показали, что под влиянием ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* B-111 и B-306 свободно расположенные вирионы «склеиваются», образуя плотные скопления, комплексы, «связки» вируса (рис. 4, Б, В), в то время как в контроле наблюдаются отдельные свободные вирусные частицы (рис. 4, А). Эти данные свидетельствуют о прямом взаимодействии липополисахаридов псевдомонад с ВТМ.

Проведенные нами электронно-микроскопические исследования показали высокую интенсивность образования комплексов ВТМ под влиянием ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*.

Аналогичные эффекты наблюдала Е. Н. Полищук при изучении взаимодействия глюкана *Ganoderma adspersum* с ВТМ [8]. Полученные результаты позволили сделать вывод, что глюкан образовывал комплексы с вирионами. Это взаимодействие существенно не влияло на структуру вириона, поскольку образуемый комплекс диссоциировал при разведении смеси, и инфекционная активность ВТМ при этом сохранялась. Автор рассматривает образование комплекса полисахарида с вирусом как один из возможных механизмов антивирусного действия и высказывает предположение,

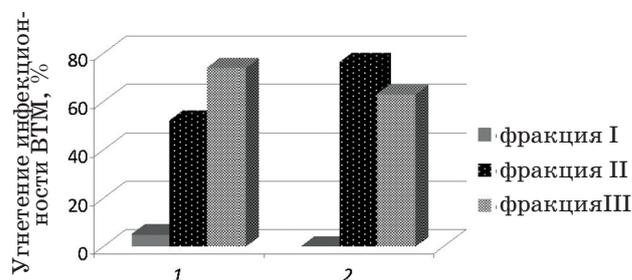


Рис. 3. Противовирусная активность О-специфического полисахарида (фракция I) и олигосахаридов кора (фракции II и III) ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* B-306 в концентрации 1 мг/мл на растениях *Nicotiana tabacum* (1) и *Nicotiana sanderae* (2)

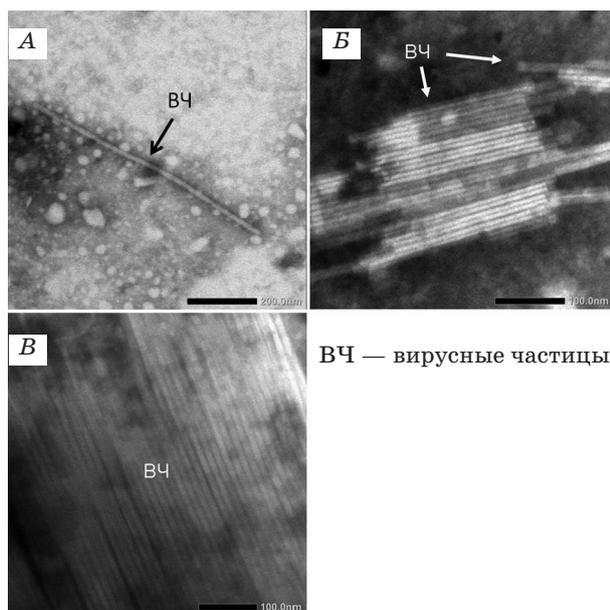


Рис. 4. Электронная микроскопия вируса табачной мозаики, контрастированного фосфорно-вольфрамовой кислотой:

А — вирус разведен водой в конечной концентрации 2 мг/мл (контроль);
Б — смесь ВТМ (2 мг/мл) и ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-306 (5 мг/мл) после их совместного инкубирования в течение 30 мин;
В — смесь ВТМ (2 мг/мл) и ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-111 (5 мг/мл) после их совместного инкубирования в течение 30 мин.
 Шкала на **А** — 200 нм, **Б** и **В** — 100 нм

ЛИТЕРАТУРА

1. Пат. 73682 UA, АО 1N 63/00, С 12 N 1/20. Инсектофунгіцидний препарат гаупсин для боротьби із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / О. А. Кіпріанова, С. В. Гораль. — Заявл. 10.03.2004; Опубл. 15.08.2005, Бюл. № 8.
2. Балко О. І., Кіпріанова О. А., Коваленко О. Г. та ін. Антифiтовiрусна активнiсть бiопрепарату гаупсин // Мiкробiол. бiотехнол. — 2010. — № 2. — С. 51–57.
3. Miller S. H., Mark G. L., Franks A., O'Gara F. Pseudomonas–Plant Interactions in: Bernd H. A. Rehm Ed. Pseudomonas. Model Organism, Pathogen, Cell Factory. — Darmstadt: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008. — P. 331–369.
4. King E. O., Ward M. K., Raney D. E. Two simple media for the demonstration of pruscyanin and fluorescein // J. Lab. Clin. Med. — 1954. — V. 44. — P. 301–307.

что в процессе образования комплексов имело место ионное взаимодействие *in vitro* между карбоксильными группами остатков глюконовой кислоты полисахарида и NH₂-группами капсидного протеина оболочки ВТМ. Возможно, нечто подобное происходит и при действии на вирус ЛПС исследованных нами псевдомонад, хотя механизмы наблюдаемого эффекта требуют специальных исследований.

Таким образом, установлена высокая активность ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* в отношении ВТМ в традиционных опытах на растениях-индикаторах; показана связь этой активности с полисахаридами кора. Электронно-микроскопическими исследованиями продемонстрировано взаимодействие между ЛПС и ВТМ при непосредственном контакте *in vitro*. Полученные данные позволяют предположить, что существуют по крайней мере два пути воздействия липополисахаридов *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* на инфекцию, вызванную ВТМ: прямое влияние исследованных ЛПС на вирус при контакте и влияние их на процессы клеточного метаболизма в целом, состоящее в активации защитных механизмов растения.

5. Варбанец Л. Д., Здоровенко Г. М., Книрель Ю. А. Методы исследования эндотоксинов. — К.: Наук. думка, 2006. — 236 с.
6. Dow M., Newman M. A., Roepenak E. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides // Ann. Rev. Phytopathol. — 2000. — V. 38 — P. 241–261.
7. JPN 2007077065 (A), АО1N63/00, АО1N63/02. Resistance-inducing agent for disease of monocotyledonae / Shibuya Naoto, Kaku Hanae, Desaki Yoshitake. — 2007-03-29.
8. Полищук Е., Коваленко А., Антипов И., Оверченко В. Ингибирование инфекционности вируса табачной мозаики в присутствии глюкана *Ganoderma adspersum* (Scholar Donk) в изолированных протопластах табака // Вісн. КНУ, Серія «Біологія». — 2012. — Вип. 62. — С. 69–72.

**ПРОТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ
ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ
Pseudomonas chlororaphis
subsp. *aureofaciens***

О. А. Кіпріанова¹
Л. Д. Варбанець¹
В. В. Шепелевич²
С. І. Войчук¹

¹Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

²Київський національний університет
імені Тараса Шевченка

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

**ANTIVIRAL ACTIVITY
OF LIPOPOLYSACCHARIDES
OF *Pseudomonas chlororaphis*
subsp. *aureofaciens***

E. A. Kiprianova¹
L. D. Varbanets¹
V. V. Shepelevich²
S. I. Voichuk¹

¹Zabolotny Institute of Microbiology
and Virology of National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Taras Shevchenko

Kyiv National University

E-mail: varbanets@serv.imv.kiev.ua

Зі штамів *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111 і В-306 — компонентів інсектофунгіцидного біопрепарату гаупсин — одержано ліпополісахариди та їхні фракції і досліджено їхню активність щодо вірусу тютюнової мозаїки. Ліпополісахариди із клітин штамів В-111 і В-306 виявились високоактивними противірусними агентами і пригнічували інфекційність вірусу тютюнової мозаїки на трьох видах рослин-індикаторів у концентрації від 0,001 до 10 мг/мл. Перша фракція ліпополісахаридів (О-специфічні бічні ланцюги) обох штамів не пригнічувала вірус тютюнової мозаїки, а часто й стимулювала його репродукцію. Водночас олігосахариди кору (друга і третя фракції ліпополісахаридів) різною мірою гальмували розвиток вірусної інфекції. За даними електронної мікроскопії, за безпосереднього контакту ліпополісахаридів із вірусом *in vitro* віріони «склеювалися», утворюючи «зв'язки», тимчасом як у контролі спостерігали окремі вільні вірусні частинки, що свідчить про пряму взаємодію між ліпополісахаридами штамів *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* та вірусом тютюнової мозаїки.

Ключові слова: ліпополісахариди *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, вірус тютюнової мозаїки, зниження інфекційності, електронна мікроскопія.

Lipopolysaccharides and their fractions were obtained from strains *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* UCM B-111 and UCM B-306 — components of insectofungicidal gaupsin biopreparation; their activity against tobacco mosaic virus has been studied. Lipopolysaccharides of strains B-111 and B-306 proved to be highly active antiviral agents and inhibited tobacco mosaic virus infectivity for three species of indicating plants in concentrations 0,001–10 mg/ml. First lipopolysaccharides fraction (O-specific side chains) did not inhibit and often stimulated the virus reproduction. At the same time the core oligosaccharides (the second and the third lipopolysaccharides fractions) decreased to different extent the virus infection development. According to electron microscopy data the virions stucked together forming the sneafs at the direct lipopolysaccharides-virus contact *in vitro* whereas the single free virus particles were observed in the control. Evidence of direct interaction between lipopolysaccharides of *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* strains and tobacco mosaic virus is provided.

Key words: *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* lipopolysaccharides, tobacco mosaic virus, infectivity inhibition, electron microscopy.