

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ МСП, Д03143, Україна

ВПЛИВ ЕКЗОПОЛІСАХАРИДІВ *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* НА ПУХЛИНОУТВОРЕННЯ, СПРИЧИНЕНЕ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Встановлено здатність екзополісахаридів штамів *Pseudomonas aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306, компонентів інсектофунгіцидного препарату «Гаупсин», впливати на пухлиноутворення, спричинене *Agrobacterium tumefaciens*. Бактеріальні полісахариди, одержані на середовищі Козера із глюкозою (ймовірно альгінати) на 29–49 % блокували адсорбцію клітин агробактерій. Одержані на середовищі із сахарозою полісахариди (очевидно левани) на 30–75 % гальмували пізні етапи пухлиноутворення.

Ключові слова: екзополісахариди *Pseudomonas aureofaciens*, пухлиноутворення, *Agrobacterium tumefaciens*.

Бактеріальний рак уражує велику кількість плодкових та декоративних рослин, призводить до значного зменшення врожайності винограду [2]. Для успішної боротьби із цим широко розповсюдженим захворюванням рослин необхідний пошук нових ефективних препаратів [4]. Нещодавно було показано, що альгінати водоростей здатні інтенсивно пригнічувати пухлиноутворення, спричинене збудником бактеріального раку рослин – *Agrobacterium tumefaciens* [7]. Відомо, що полісахариди даного класу синтезуються представниками групи флюоресціюючих псевдомонад, до яких належать зокрема штами *Pseudomonas aureofaciens* [5, 9, 10]. Іншою характерною особливістю цього виду бактерій є утворення на середовищах із сахарозою нейтрального екзополісахариду левану [5]. Штами *P. aureofaciens* широко застосовуються для боротьби із захворюваннями рослин різної етіології як антибактеріальні й антифунгальні агенти [3, 8], проте протипухлинні властивості їх полісахаридів досі залишаються невивченими.

Метою даної роботи було дослідження протипухлинної активності екзополісахаридів *P. aureofaciens*.

Матеріали і методи. Як продуценти екзополісахаридів в роботі використовували штами *Pseudomonas aureofaciens* УКМ В-111 і УКМ В-306, які входять до складу інсектофунгіцидного препарату «Гаупсин» [3]. Культури вирощували на рідкому синтетичному середовищі Козера наступного складу: хлорид натрію – 5 г; сульфат магнію – 0,2 г; фосфат амонію однозаміщений – 1 г; фосфат калію двозаміщений – 1 г; дистильована вода – 1000 мл [5]. Для одержання екзополісахаридів типу леванів у зазначене середовище вносили 0,1 % сахарози, тоді як для альгінатів – аналогічну кількість глюкози [9, 10]. Культивування бактерій проводили на качалці при 200 об/хв і температурі 28°C протягом однієї доби. З метою звільнення культуральної рідини від бактеріальних клітин проводили центрифугування при 10 тис. об/хв протягом 20 хв. Одержаний супернатант змішували із аналогічним об'ємом ізопропилового спирту, суміш центрифугували при 6 тис. об/хв протягом 5 хв, одержаний осад ліофілізували [6]. Для випробувань біологічної активності одержані препарати розчиняли у стерильній дистильованій воді.

Противухлинні властивості одержаних препаратів досліджували на експлантатах картоплі. Останні являли собою диски діаметром 1 см і товщиною близько 2-3 мм. Як індуктор пухлиноутворення застосовували суспензію трьохдобової культури *A. tumefaciens* із титром 10^9 кл/мл, яку наносили по 0,1 мл на поверхню кожного експлантата. Встановлення здатності екзополісахаридів блокувати прикріплення агробактерій проводили шляхом обробки зразків 0,1 мл досліджуваного розчину за 20 хв до інокуляції *A. tumefaciens*. Для вивчення впливу полісахаридів на пізні етапи пухлиноутворення досліджувані розчини наносили на експлантати картоплі через 20 хв після їх зараження агробактеріями [1]. При цьому як позитивний контроль використовували

© Балко О.І., Авдєєва Л.В., 2009

зразки, які були інокульовані культурою агробактерій і не оброблялись розчинами полісахаридів. Інкубацію експлантатів проводили у чашках Петрі із 0,8 % голонним агаром при температурі 20 °С протягом 21 доби. Наявність на експлантатах до 10 горбиків пухлин оцінювали як слабкий розвиток пухлиноутворення; від 10 до 30 – як середній; 30 і більше – як інтенсивний розвиток пухлиноутворення.

Результати та їх обговорення. Відомо, що *A. tumefaciens* спричиняє ураження рослин бактеріальним раком у декілька етапів. На першій стадії інфікування відбувається прикріплення агробактерій до клітинних рецепторів. На другому етапі агробактерії вводять у клітини рослин Ті- плазміди. Надалі відбувається експресія генів даних плазмід, що призводить до пухлинної трансформації клітини і, як наслідок, розвитку корончастих галів [4]. У нашій роботі проводилось дослідження впливу одержаних полісахаридів на обидва зазначені етапи пухлиноутворення.

Після 21 доби інкубування в дослідних варіантах спостерігалось зменшення кількості утворюваних агробактеріями пухлин порівняно із контрольними зразками. При цьому інтенсивність пригнічення пухлиноутворення залежала від штаму-продуценту полісахаридів, внесеного до складу живильного середовища вуглеводу, а також від концентрації та моменту нанесення полісахаридів. Обробка зразків полісахаридами штаму *P. aureofaciens* УКМ В-306, отриманими на середовищі Козера із глюкозою, у концентрації 0,1 мг/мл за 20 хв до інокуляції *A. tumefaciens* призводила до зменшення кількості утворюваних пухлин на 30 % (табл. 1). Підвищення концентрації полісахариду до 10 мг/мл спричиняло зниження інтенсивності пухлиноутворення до 49 %. Нанесення даного полісахариду через 20 хв після інокуляції агробактеріями також зумовлювало зниження кількості утворених пухлин, проте в даному випадку інтенсивність пригнічення пухлиноутворення була дещо нижчою. Нашарування екзополісахариду у концентрації 0,1 мг/мл зменшувало кількість пухлин на 21 %, а в концентрації 10 мг/мл – на 34 %.

Таблиця 1

Вплив одержаних при культивуванні на середовищі Козера із глюкозою екзополісахаридів штамів *P. aureofaciens* УКМ В-306 та УКМ В-111 на інтенсивність пухлиноутворення, спричиненого *A. tumefaciens*

№ штаму	Момент нанесення полісахариду	Концентрація нанесеного полісахариду, мг/мл	Середня кількість утворених пухлин/експлантат	Інтенсивність пригнічення пухлиноутворення, %
УКМ В-306	20 хв до інокуляції	0 (позитивний контроль)	40,88 ± 2,46	0
		0,1	28,45 ± 2,24	30
		1,0	28,62 ± 2,28	30
		10,0	20,85 ± 3,25	49
	20 хв після інокуляції	0 (позитивний контроль)	24,90 ± 2,16	0
		0,1	19,60 ± 1,98	21
		1,0	19,29 ± 2,19	23
		10,0	18,82 ± 1,61	34
УКМ В-111	20 хв до інокуляції	0 (позитивний контроль)	32,95 ± 1,70	0
		0,1	23,55 ± 2,00	29
		1,0	23,45 ± 1,41	29
		10,0	22,14 ± 2,74	33
	20 хв після інокуляції	0 (позитивний контроль)	23,64 ± 3,36	0
		0,1	19,88 ± 2,63	16
		1,0	19,37 ± 2,36	18
		10,0	19,42 ± 1,57	18

Таким чином, одержані на середовищі Козера із глюкозою полісахариди штаму *P. aureofaciens* УКМ В-306 здатні впливати на обидві стадії бактеріальної інфекції. Ці речовини, які за нашим припущенням належать до альгінатів, значно інтенсивніше блокують прикріплення *A. tumefaciens* до клітинних рецепторів. Натомість, їх дія на подальші етапи пухлиноутворення є менш вираженою і, ймовірно, носить залишковий ефект. Слід зазначити, що застосування одержаних на середовищі із глюкозою екзополісахаридів іншого штаму-продуцента *P. aureofaciens* УКМ В-111 підтвердило наведену закономірність. Так, нашарування полісахаридів зазначеного штаму у концентрації 10 мг/мл за 20 хв до інокуляції призводило до зниження рівня пухлиноутворення на 33 %, тоді як нанесення після інокуляції – лише на 18 %.

Відмічено, що вплив на пухлиноутворення екзополісахаридів, отриманих при культивуванні досліджуваних бактерій на середовищі Козера із сахарозою (ймовірно леванів) характеризувався дещо іншим ефектом. Так, нашарування максимальної концентрації полісахаридів штаму *P. aureofaciens* УКМ В-111 до інокуляції експлантатів агробактеріями спричиняло зменшення кількості утворюваних пухлин лише на 12 % (табл. 2). Беручи до уваги статистичну похибку дослідних та контрольних зразків, можна констатувати відсутність суттєвого впливу леванів на прикріплення *A. tumefaciens* до клітинних рецепторів. У той же час нанесення мінімальної концентрації досліджуваних речовин через 20 хв після інокуляції призводило до зменшення кількості утворюваних пухлин на 30 %. Підвищення концентрації полісахаридів до 10 мг/мл спричиняло зростання гальмуючого ефекту до 75 %. Було встановлено, що отримані на середовищі із сахарозою екзополісахариди іншого досліджуваного штаму *P. aureofaciens* УКМ В-306 також характеризувались більш інтенсивним впливом на пізні етапи інфекції. Проте, у даному випадку рівень максимального пригнічення пухлиноутворення був дещо нижчим (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив одержаних при культивуванні на середовищі Козера із сахарозою екзополісахаридів штамів *P. aureofaciens* УКМ В-111 та УКМ В-306 на інтенсивність пухлиноутворення, спричиненого *A. tumefaciens*

№ штаму	Момент нанесення полісахариду	Концентрація нанесеного полісахариду, мг/мл	Середня кількість утворених пухлин/експлантат	Інтенсивність пригнічення пухлиноутворення, %
УКМ В-111	20 хв до інокуляції	0 (позитивний контроль)	21,55±2,44	0
		0,1	19,60±2,37	9
		1,0	19,10±2,84	11
		10,0	18,95±1,42	12
	20 хв після інокуляції	0 (позитивний контроль)	35,90±1,99	0
		0,1	27,80±1,89	30
		1,0	22,34±2,07	44
		10,0	9,73±1,09	75
УКМ В-306	20 хв до інокуляції	0 (позитивний контроль)	28,29±2,72	0
		0,1	26,90±1,84	5
		1,0	24,15±1,24	15
		10,0	24,10±1,53	15
	20 хв після інокуляції	0 (позитивний контроль)	29,23±3,00	0
		0,1	20,10±1,13	32
		1,0	19,75±1,44	33
		10,0	15,63±1,68	47

Відмічено, що застосування леванів на пізніх стадіях інфікування не лише знижувало інтенсивність пухлиноутворення, але й змінювало його характер (рис. 1). Так, обробка полісахаридом у концентрації 0,1 мг/мл призводила до зменшення кількості експлантатів із високим та підвищення кількості зразків із середнім рівнем пухлиноутворення у 2,5

та 3,9 рази відповідно. При застосуванні максимальної концентрації леванів у дослідних варіантах переважали експлантати із низькою інтенсивністю пухлиноутворення. Таким чином, одержані дані свідчать, що синтезовані на середовищі Козера із сахарозою екзополісахариди не впливали на адсорбцію агробактерій, а діяли виключно на пізні етапи інфікування.

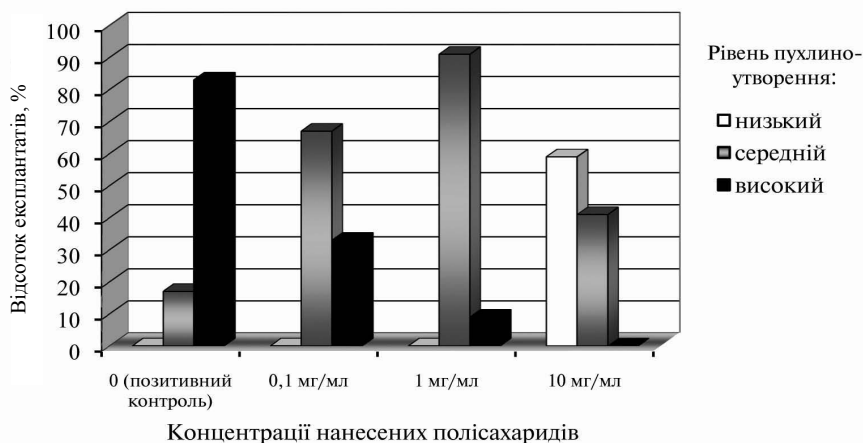


Рис 1. Вплив різних концентрацій екзополісахаридів штаму *P. aureofaciens* УКМ В-111, одержаних на середовищі Козера із сахарозою, на рівень пухлиноутворення, спричинений *A. tumefaciens*

Отже, одержані нами результати свідчать про те, що полісахариди двох штамів-компонентів препарату «Гаупсин» ефективно впливають на обидва етапи пухлиноутворення, спричиненого *A. tumefaciens*. При цьому дія альгінатів була, очевидно, спрямована на блокування рецепторів для прикріплення агробактерій, тоді як левани впливали на пізні стадії інфікування. Для остаточного підтвердження висловленого припущення необхідно провести концентрування та ретельну очистку одержаних полісахаридів, а також дослідити їх хімічну структуру. Подальші експерименти дадуть можливість встановити ймовірні механізми впливу леванів та альгінатів на відповідні етапи пухлиноутворення. Разом із тим, виявлені на даному етапі досліджень закономірності характеризують із нового боку біологічну активність препарату «Гаупсин» і створюють перспективи для його використання з метою профілактики бактеріального раку рослин.

Балко О.И., Авдеева Л.В.

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

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS* НА ПРОЦЕСС ОПУХОЛЕОБРАЗОВАНИЯ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Резюме

Показано способность экзополисахаридов штаммов *Pseudomonas aureofaciens* УКМ В-111 и УКМ В-306, компонентов инсектофунгицидного препарата «Гаупсин», влиять на процесс опухолеобразования, вызванный *Agrobacterium tumefaciens*. Бактериальные полисахариды, полученные на среде Козера с глюкозой (вероятно альгинаты) на 29–49 % блокировали адсорбцию клеток агробактерий. Полученные на среде с сахарозой полисахариды (возможно леваны) на 30–75 % угнетали поздние этапы опухолеобразования.

Ключевые слова: экзополисахариды *Pseudomonas aureofaciens*, опухолеобразование, *Agrobacterium tumefaciens*.

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

INFLUENCE OF *PSEUDOMONAS AUREOFACIENS*
OXYPOLYSACCHARIDES ON TUMOUR FORMATION
CAUSED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Summary

The ability of exopolysaccharides of *Pseudomonas aureofaciens* strains UKM B-111 and UKM B-306, components of insectofungicidal preparation Gaupsin, to influence the process of tumour formation caused by *Agrobacterium tumefaciens*. Bacterial polysaccharides, obtained on Kozer medium with glucose (possible alginates) blocked agrobacterium cell adhesion by 29-49 %. Those obtained on the medium with sucrose polysaccharides (possible levans) by 30-75 % inhibit later stages of tumour formation.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: exopolysaccharides of *Pseudomonas aureofaciens*, tumour formation, *Agrobacterium tumefaciens*.

The author's address: Balko O.I. Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Zabolotny St., Kyiv. MSP, D03143, Ukraine.

1. Гвоздяк Р.І., Пасічник Л.А., Ващенко Л.М. Вплив ліпополісахарид-білкового комплексу *Pseudomonas syringae* рв. *atropfaciens* на процес пухлиноутворення, спричинений *Agrobacterium tumefaciens* // Мікроб. журн. – 2003. – **65**, № 3. – С. 5–13.
2. Коноп Л.А., Гайдай А.Е., Милкус Б.Н. Бактериальный рак винограда на Украине // Вісник Одеського національного університету – 2001. – **6**, № 4. – С. 181–183.
3. Пат. 73682. Инсектофунгицидный биопрепарат для борьбы із шкідниками і хворобами сільськогосподарських культур / О.А. Кіпріанова, С.В. Гораль. – Опубл. 15.08.05, Бюл. № 8.
4. Пирог Т.П., Коваленко М.А., Кузьминская Ю.В. Образование экзополисахаридов на углеводных субстратах штаммом *Acinetobacter* sp. и особенности его метаболизма // Микробиология. – 2002. – **72**, № 2. – С. 215–221.
5. Сарнацкая В.В. Физиологические аспекты опухолевого роста растений. – Киев: Наук. думка, 1993. – С. 3–24.
6. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – Киев: Наук. думка, 1990. – С. 58–61.
7. Hisham El-Masry N., Mostafa H. Mostafa, A. Mohamed Ibrahim, Manal M.A. El-Naggar marine algae that display anti-tumorigenic activity against *Agrobacterium tumefaciens* // FEMS Microbiol. Letters – 1995. – **128** – P. 151–156.
8. Morello J.E., Pierson E.A. and Pierson L.S. Negative cross-communication among wheat rhizosphere bacteria: effect on antibiotic production by the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30–84 // Appl. and Environ. Microbiol. – 2004. – **70**, N 5. – P. 3103–3109.
9. Osman S.F., Fett W.F. and Fishman M.L. Exopolysaccharides of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* рв. *glycinea* // J. of Bacteriol. – 1986. – **166**, N 1. – P. 66–71.
10. Singh S., Fett W.F. Stimulation of exopolysaccharide production by fluorescent pseudomonads in sucrose media due to dehydration and increased osmolarity // FEMS Microbiol. Letters – 1995. – **130**. – P. 301–306.

Отримано 10.02.2008