

**ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ВЫРАЩИВАНИЯ  
*PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP.  
*CHLORORAPHIS* УКМ В-106 НА  
СОСТАВ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ**

**О.С. Броварская, Л.Д. Варбанец**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина  
e-mail: varbanets\_imv@ukr.net*

**Цель.** Провести сравнительное изучение химического состава липополисахаридов (ЛПС) *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106, выделенных из бактерий, выращенных при разных температурных режимах (10, 28, 37 °С). **Методы:** водно-фенольная экстракция ЛПС, электрофорез в полиакриламидном геле, хромато-масс-спектрометрическое определение моносахаридного и жирнокислотного составов, изучение антигенной структуры методом иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони. **Результаты.** Выход ЛПС из «холодового» варианта почти в 5 раз превышал таковой из клеток, культивируемых при 37°С. Одной из причин низкого выхода ЛПС-37 (2.3 %) по сравнению с 11.3 % выхода ЛПС-10 может быть присутствие во внешней мембране бактерий «теплого» варианта ЛПС с короткими О-полисахаридными цепями, которые в силу своей гидрофобности плохо извлекаются при фенол-водной экстракции. По качественному моносахаридному составу ЛПС сходны между собой. Вместе с тем при повышении температуры выращивания клеток наблюдалось увеличение процентного содержания гептозы, характерного компонента олигосахарида кора. Качественный состав жирных кислот исследуемых ЛПС очень близок, их же количественное содержание разнится существенно. Доминирующими во всех ЛПС были 3-ОН-С<sub>14:0</sub> а также С<sub>14:0</sub> содержание которой при повышении температуры выращивания увеличивается. Из ненасыщенных кислот С<sub>16:1</sub> обнаружена только в ЛПС-10. Изучение токсичности показало, что значения ЛД<sub>50</sub> снижалось в ряду ЛПС-10, ЛПС-20 и ЛПС-37. Таким образом, наибольшую токсичность проявил ЛПС «холодового» варианта, а менее токсичным был «тепловой». При изучении антигенной структуры было показано наличие в составе исследуемых ЛПС общих антигенных детерминант. **Выводы.** Повышение температуры культивирования клеток вызывает изменения биохимических, иммунохимических и биологических свойств ЛПС.

*Ключевые слова:* *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106, температура выращивания, липополисахарид, моносахаридный, жирнокислотный состав, биологическая активность.

Представители рода *Pseudomonas* чрезвычайно широко распространены в природе. Они встречаются в почве, морских и пресноводных водоемах, воздухе, в теле теплокровных животных, растениях, в частности их ризосфере. Такое распространение основано на способности бактерий этого рода усваивать самые разнообразные по природе соединения и обитать в различных экологических условиях. Это обусловлено их необычай-

ной изменчивостью и способностью быстрой адаптации к изменяющимся условиям среды обитания. Одним из важнейших факторов, определяющих характер метаболизма бактерий, является температура окружающей среды. При ее изменении происходит перестройка метаболизма бактерий, адекватная условиям их временного пребывания. В первую очередь изменение температуры влияет на агрегатное состояние гидрофобной части клеточных мембран, для сохранения нормального функционирования которых у бактерий существует ряд адаптивных механизмов. В этих процессах участвуют липополисахариды (ЛПС) – основные компоненты внешней мембраны грамотрицательных бактерий [1]. В ответ на изменение температуры роста заметные модификации претерпевают как липидные, так и полисахаридные компоненты молекулы ЛПС, что, в свою очередь, приводит к изменению их биологических и функциональных свойств.

В связи с этим целью работы было изучить, как выращивание *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106 при разных температурах влияет на состав, а также функциональные и биологические свойства ЛПС.

**Материалы и методы.** В работе использовали штамм *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106 (АТСС 9446 – типовой штамм), любезно предоставленный для исследований д.б.н. Киприяновой Е.А.

Культуру выращивали на плотной питательной среде – мясопептонном агаре (МПА) при разных температурах 10°C, 28°C, 37°C. Препараты ЛПС выделяли методом экстракции 45%-ным водным фенолом бактериальной суспензии при ее интенсивном механическом перемешивании при 65-68°C в течение 30 минут [2]. Затем охлажденную до 10-15°C суспензию подвергали центрифугированию в течение 20 минут при 5000 g, верхний водный слой отделяли и диализировали против водопроводной, а затем дистиллированной воды, нерастворимый осадок отделяли центрифугированием при 5000 g. ЛПС анализировали на наличие углеводов фенол-серным методом Dubois [3], белка – Lowry [4], нуклеиновых кислот – Спирина [5], гептоз – реакцией с цистеином и серной кислотой [6], 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) – реакцией с тиобарбитуровой кислотой [6].

Для идентификации нейтральных моносахаридов препараты гидролизуют 2 N HCl в течение 5 ч при 100°C, а затем анализировали методом хромато-масс-спектрометрии по методу Albershein с соавт [7].

При изучении жирнокислотного состава (ЖК) навеску препарата (10 мг) растворяли в 3 мл 1.5 % раствора хлористого ацетила в метаноле (предварительно охлажденном) и гидролизуют при температуре 100 °C в запаянных ампулах в течение 4 час [6]. Анализ метиловых эфиров жирных кислот проводили на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973 inert.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-электрофорез) проводили согласно Лэммли [8] (5% центрирующий и 12% разделяющий гель, сила тока 30 мА). ЛПС, разделенные в геле, окрашивали солями серебра по методу С. Tsai [9].

Токсические свойства ЛПС проверяли на беспородных мышах (20 г), сенсibilизированных D-галактозамином [10]. Растворы солянокислого D-галактозамина (15 мг/0.2 мл на животное) и различные количества ЛПС (от 4 до 400 мг/0.2 мл) в физиологическом растворе вводили группам из четырех животных. Контрольной группе вводили раствор D-галактозамина в физиологическом растворе (0.2 мл). Выживаемость мышей в группах определяли в течение 48 часов. Летальную дозу LD<sub>50</sub> рассчитывали по методу Новотного [11]:

$$\log LD_{50} = \log(\text{наивысшая тестируемая доза}) + (\log D)[1/2 - SR/N],$$

где -SR – общее число умерших животных, N – число животных на дозу, D – кратность разведения тестируемых препаратов.

Пирогенность ЛПС изучали на кроликах весом 2.0-3.5 кг путем внутривенного введения установленной минимальной пирогенной дозы ЛПС с последующей термометрией животных в течение 3 часов [6].

Антисыворотку к прогретой (2.5 ч, 100°C) культуре *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106 получали путем двух внутримышечных и трех внутривенных инъекций возрастающими дозами суспензии микробных тел (от 500 тыс. до 2 млн. клеток/мл) с интервалом между инъекциями 5 суток. Забор крови проводили на 5 сутки после последней инъекции.

Антигенную активность ЛПС изучали реакцией двойной иммунодиффузии в агаре по методу Оухтерлони [12].

**Результаты.** Из сухой бактериальной массы *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106, полученной при выращивании клеток при различных температурных режимах, получены препараты ЛПС-10, ЛПС-28, ЛПС-37, которые содержали значительные количества (40.6, 28.2, 13.8% соответственно) нуклеиновых кислот. Очистку проводили методом осаждения последних трихлоруксусной кислотой с дальнейшим центрифугированием и диализом.

Выход очищенного ЛПС составил 11.3, 10.0, 2.3 % от массы сухого ацетонового порошка. Как видно из табл. 1, выход ЛПС из «холодового» варианта почти в 5 раз больше, чем из клеток, культивируемых при 37°C.

Одной из причин низкого выхода ЛПС-37 может быть присутствие во внешней мембране бактерий «теплого» варианта ЛПС с короткими О-полисахаридными цепями, которые в силу своей гидрофобности плохо извлекаются при фенол-водной экстракции. Действительно, имеют-

**Таблица 1**  
**Характеристика ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106**

Компоненты (% к сухому весу препарата)	температура выращивания клеток		
	10°C	28°C	37°C
Углеводы	18.0	22.0	17.0
Белок	1.0	1.75	сл.
Нуклеиновые кислоты	сл.	сл.	сл.
2-кето-3-дезоксиктоновая кислота	0.02	0.31	1.15
Гептозы	13.4	14.6	15.0
Гексозамин	2.5	0.5	0.3
Общий фосфор	0.65	0.45	0.25
Выход ЛПС к сухому весу клеток	11.3	10.0	2.3

ся данные о том, что выход ЛПС уменьшается с переходом бактерий от S-формы к R-форме [13]. Низкое содержание белка и нуклеиновых кислот свидетельствует о высокой степени очистки препаратов ЛПС (табл. 1). При исследовании компонентного состава ЛПС специфическими реакциями показано, что содержание углеводов в препаратах, полученных при разных температурных режимах выращивания, отличались: ЛПС-10 – 18.0 %, ЛПС-28 – 22.0 %, ЛПС-37 – 17.0 %. Выявленное низкое содержание углеводов в препаратах ЛПС при определении их реакцией с фенолом и серной кислотой может объясняться содержанием в составе молекулы ЛПС моносахаридов, в частности аminosахаров, дающих низкую, по сравнению с глюкозой, специфическую окраску при этой реакции. Обнаружены также следовые количества фосфора (0.65-0.25 %). Содержание гептозы, входящей в состав олигосахарида кора, незначительно увеличивается (от 13.4 до 15.1 %, табл. 1) с повышением температуры выращивания (от 10 до 37°C), в то время как количество гексозаминов при повышении температуры культивирования уменьшается (от 2.5 до 0.3 %). Что касается КДО, характерного компонента всех известных ЛПС, то, как видно из приведенных в табл. 1 данных, в недеградированных ЛПС она присутствует в незначительных количествах – 0.02-1.15 %. Известно [14], что относительная молярная доля КДО в молекуле ЛПС уменьшается с удлинением внешнего кора и O-специфического полисахарида. В связи с этим для более детального уточнения строения ЛПС, выделенных при выращивании бактерий при разных температурных режимах, был проведен анализ КДО на основании спектров поглощения продуктов ее реакции с тиобарбитуровой кислотой (рис.1).

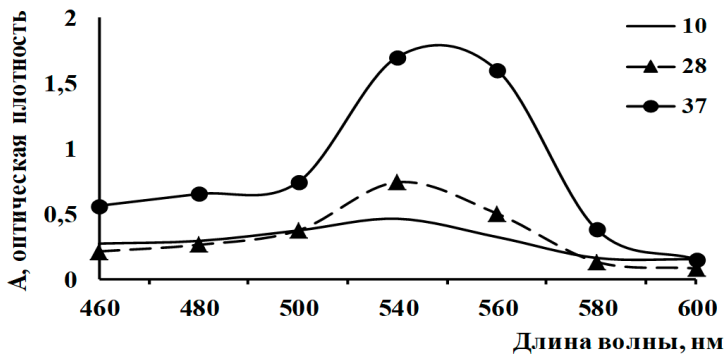


Рис.1. Спектры поглощения продуктов реакции тиобарбитуровой кислоты с КДО ЛПС-10, ЛПС-28 и ЛПС-37 *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106

Из представленных результатов видно, что в препарате ЛПС-10 содержание КДО в несколько раз меньше, чем в ЛПС-37. Эти данные дают возможность предположить доминирование в структуре ЛПС-37 олигосахарида кора по сравнению с O-специфическим полисахаридом.

Анализ моносахаридного состава очищенных от нуклеиновых кислот ЛПС показал (табл. 2), что препараты сходны между собой по качественному составу.

Таблица 2

**Моносахаридный и жирнокислотный состав ЛПС  
*P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106**

Моносахариды	Температурные режимы культивирования		
	10°C	28°C	37°C
	% к общей сумме площадей пиков		
X <sub>1</sub>	-	0.95	1.49
Фукоза	-	-	0.89
Рибоза	0.93	0.38	-
X <sub>2</sub>	3.8	1.57	3.18
Галактоза	13.04	14.86	12.35
Глюкоза	16.15	16.26	16.82
X <sub>3</sub>	9.86	5.78	6.14
X <sub>4</sub>	8.77	7.75	6.28
Гептоза	47.45	52.45	52.85
<b>Жирные кислоты</b>			
C <sub>12:0</sub>	15.9	11.0	20.23
C <sub>14:0</sub>	31.6	34.38	42.12
3-ОН-C <sub>14:0</sub>	35.9	47.2	32.39
cis -9-C <sub>16:1</sub>	12.1	-	-
C <sub>16:0</sub>	4.5	6.95	5.26

Примечание: X<sub>1</sub>-X<sub>4</sub> – неидентифицированный моносахарид

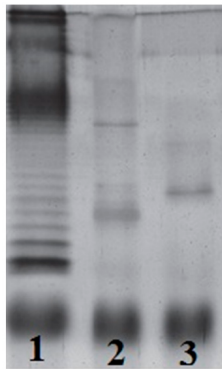
Вместе с тем при повышении температуры выращивания клеток увеличивалось процентное содержание гептозы – характерного компонента олигосахарида кора (47.5, 52.5, 52.9% для ЛПС-10, ЛПС-28, ЛПС-37 соответственно), что подтверждает полученные выше данные по изучению содержания КДО. Кроме галактозы (12-14%) и глюкозы (в пределах 16% для всех препаратов ЛПС) выявлено значительное количество (22.4, 16.1, 17.9% для ЛПС-10, ЛПС-28, ЛПС-37 соответственно) неидентифицированных моносахаридов.

Результаты определения жирнокислотного состава исследуемых препаратов ЛПС показали, что качественный состав жирных кислот очень близок, их же количественное содержание различается существенно. Доминирующими были 3-ОН-C<sub>14:0</sub> (35.5, 47.2, 32.4 %), а также C<sub>14:0</sub> (31.6, 34.4, 42.1% соответственно для ЛПС-10, ЛПС-28, ЛПС-37) (табл.2), содержание последней при повышении температуры выращивания увеличивается. Из ненасыщенных кислот только C<sub>16:1</sub> (12.0 %) была обнаружена в ЛПС-10. Нужно отметить, что ненасыщенные жирные кислоты в составе липида А встречаются редко. Подобное увеличение степени ненасыщенности липидов клеточной стенки у микроорганизмов, выращенных на холоде, характерно для многих грамотрицательных бактерий и имеет важное функциональное значение, поскольку позволяет бактериям сохранять постоянной текучесть мембраны при изменении условий роста. Изменения в составе жирных кислот липида А можно рассматривать как один из механизмов, при помощи которого грамотрицательные бактерии приспосабливаются к изменениям окружающей среды.

Полученные в ходе исследования представления о составе жирных кислот липидов А позволяют выдвинуть обоснованное предположение о причинах существенных различий в выходах ЛПС у бактерий, выращен-

ных при разных температурах. Очевидно, что увеличение количества ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов А, делает мембраны менее прочными и более текучими, что приводит к упрощению извлечения ЛПС из мембраны и, таким образом, увеличению его выхода (ЛПС-10 – 11.3%, ЛПС-28 – 10.0%, ЛПС-37 – 2.3%).

Характерной особенностью препаратов ЛПС является то, что по своим физико-химическим свойствам они всегда гетерогенны, что обусловлено как наличием трех его структурных компонентов: О-специфического полисахарида, олигосахарида кора и липида А, так и присутствием молекул с различной длиной О-полисахаридной цепи, а также гетерогенностью липида А, характеризующегося различной степенью ацилирования молекул глюкозамина. Для оценки степени гетерогенности препаратов ЛПС мы применили метод электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS с последующим окрашиванием гелей солями серебра (рис. 2).



**Рис.2. Электрофорез ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106 в полиакриламидном геле в присутствии SDS, окрашивание солями серебра: (1 – ЛПС-10, 2 – ЛПС-28, 3 – ЛПС-37)**

Подобно ЛПС из других грамотрицательных бактерий, ЛПС *P. aureofaciens* subsp. *chlororaphis* представляет собой гетерогенную по длине углеводной цепи популяцию молекул, обусловленную различной стадией биосинтеза. В последние годы показано [15], что длина цепи зачастую зависит от условий культивирования, в частности, температуры роста. “Холодовые” варианты бактерий *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* продуцируют ЛПС, имеющие более длинную цепь О-специфического полисахарида, чем ЛПС из клеток, выращенных при 37°C. Высокое содержание молекул ЛПС с короткими О-цепями в клетках *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, выращенных при высоких температурах, может быть одной из причин довольно низкого (2.3%) (табл.1) выхода ЛПС-37.

У бактерий с выраженной гетерогенностью длины цепи ОПС формируется характерная “лестница” из отдельных полос, где каждая “ступенька” есть результат увеличения молекулярной массы, обусловленной присоединением одного олигосахаридного звена. Кроме того, во всех трех препаратах присутствует низкомолекулярная фракция, которая, вероятно, представляет собой олигосахарид кора, незамещенный О-полисахаридной цепью.



Таким образом, ЛПС не являются индивидуальными химическими соединениями, а представляют собой семейство молекул, различающихся по своему строению и молекулярной массе.

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что рост *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* на холоде (10°C) приводит к модификации молекулы ЛПС в сторону увеличения длины О-полисахаридной цепи, а клетка в целом, вероятно, становится более устойчивой к действию защитных факторов макроорганизма.

Роль эндотоксически активного фрагмента ЛПС выполняет липид А, для проявления максимального токсического эффекта которого необходимо присутствие в молекуле липида А дисахаридной основы с двумя фосфатными группами, а также 6 остатков жирных кислот, в основном оксикислот [16]. Действительно, в исследованных нами ЛПС-10, ЛПС-28 и ЛПС-37 *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* 3-ОН-С<sub>14:0</sub> кислота была доминирующей и составляла 35.89; 47.2 и 32.39% соответственно.

Определение токсичности трех препаратов ЛПС в различных дозах от 4.0 мкг до 400 мкг с шагом 10 (табл. 3) показало, что наблюдается выраженная зависимость эффекта от используемой дозы препарата ЛПС. При сравнении влияния одинаковых доз на проявление токсичности наблюдалось ее снижение в ряду ЛПС-10, ЛПС-28 и ЛПС-37. Так, значения ЛД<sub>50</sub> для указанных препаратов составили 2.0, 20.0 и 35.56 мг/кг веса животных соответственно. Таким образом, наибольшую токсичность проявил ЛПС «холодового» варианта (ЛПС-10), а наименьшую – «теплового» (ЛПС-37). Поскольку ЛПС имели практически одинаковый жирнокислотный состав, который играет важную роль в проявлении ЛПС токсических свойств, можно сделать вывод о том, что увеличение длины цепи О-полисахарида способствует созданию конформации молекулы ЛПС, способствующей усилению ее токсичности.

**Таблица 3**

**Определение острой токсичности ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106**

ЛПС (клетки выращены при разных температурах)	d, мкг ЛПС на одну мышь			LD <sub>50</sub>	
	d=4	d=40	d=400	мкг на одну мышь	мг/кг веса
ЛПС-10	1/4	1/4	4/4	40	2.0
ЛПС-28	0/4	0/4	4/4	400	20.0
ЛПС-37	0/4	0/4	1/4	711.31	35.56

Примечание. 1/4 – число погибших (числитель) и общее число (знаменатель) животных при введении различных доз ЛПС

Для сравнительной оценки пирогенных свойств ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* была установлена минимальная пирогенная доза, которая составляла  $7.5 \times 10^{-3}$  мкг/мл апирогенного изотонического раствора. Результаты термометрии показали, что повышение температуры у экспериментальных животных при введении внутривенно препаратов ЛПС-10, 28, 37 наблюдалось при использовании ЛПС-28 и ЛПС-37 (рис. 3). Максимальный прирост температуры наблюдался через 2 часа

после инъекции ЛПС, затем температура несколько снижалась, а через 3 часа ее значения становились даже ниже порога пирогенности. Что касается ЛПС-10, то при его введении в организм экспериментальным животным повышения температуры не наблюдали, а, наоборот, температура их тела снижалась и становилась ниже первоначальной.

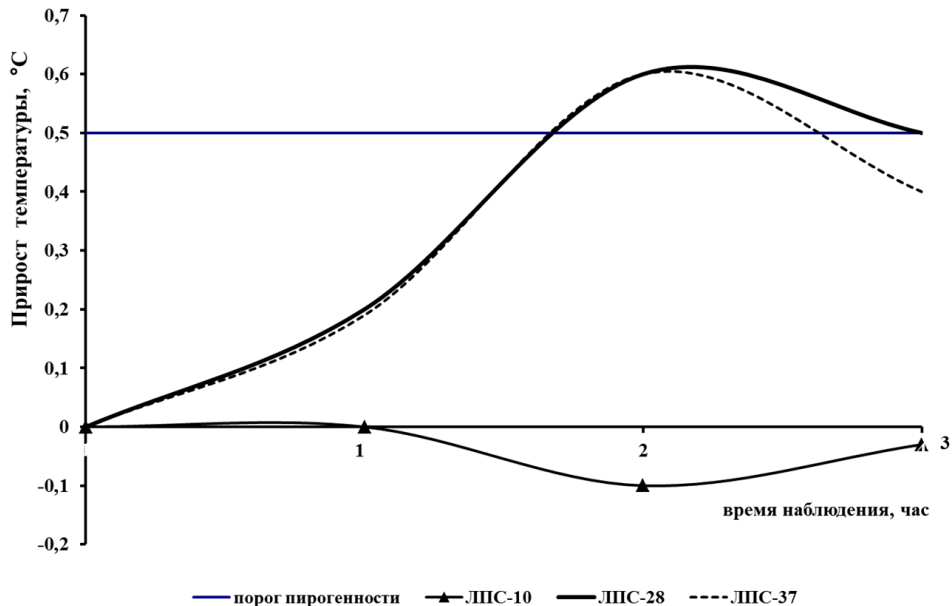


Рис.3. Пирогенная активность ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106

ЛПС являются основными термостабильными антигенами грамотрицательных бактерий и определяют ее серологическую специфичность. При проведении серологических исследований в качестве антител была использована кроличья поликлональная антисыворотка, полученная к прогретой культуре *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, выращенной при 28°C. Антигеном служили ЛПС-10, ЛПС-28 и ЛПС-37. В реакциях кольцепреципитации и агглютинации установлены титры исследуемой сыворотки, которые составляли 1:50000 и 1:6400 соответственно. При изучении антигенной структуры методом иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони были обнаружены две полосы преципитации (рис. 4).

Результаты иммунодиффузии демонстрируют полное слияние внутренних полос преципитации, что свидетельствует о наличии в составе этих антигенов общих детерминант. Внешняя преципитационная полоса не полностью сливается, образуя шпору, что указывает на наличие и индивидуальных детерминант в составе ЛПС. Сравнительный иммунодиффузионный анализ препаратов ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* не выявил перекрестных реакций антисыворотки к *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106 с ЛПС близкородственных штаммов (рис. 4).



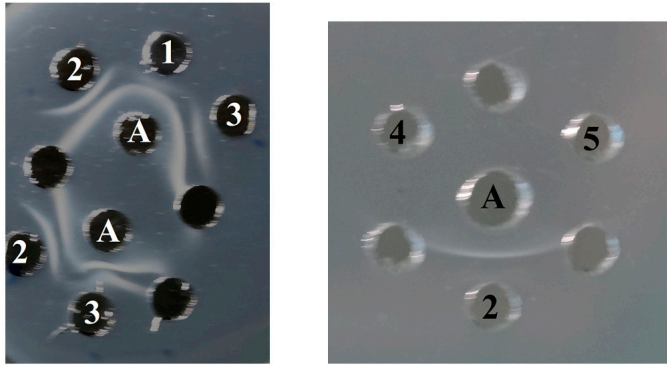


Рис.4. Реакция двойной иммунодиффузии в агаре по Оухтерлони ЛПС штамма *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106 (1-ЛПС-10, 2-ЛПС-28, 3-ЛПС-37), 4 – ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-111, 5 – ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-306 с О-антисывороткой (центр А) к штамму *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106, выращенному при 28° С

**Обсуждение.** Важную роль в приспособлении бактерий к смене температуры окружающей среды играют компоненты наружной мембраны грамотрицательных бактерий – ЛПС, в частности, количественное содержание жирных кислот их липидов А, которое с понижением температуры изменяется в сторону повышения уровня ненасыщенных жирных кислот. Такие изменения связаны с необходимостью поддерживать степень текучести клеточных мембран на уровне, способном обеспечить функционирование бактериальной клетки на холоде. Известно, что, например, бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*, выращенные при низкой температуре, в отличие от бактерий, выращенных при 37°С, характеризуются более высоким индексом ненасыщенности жирных кислот, а также повышением доли молекул ЛПС с длинной углеводной цепью, обладающих высокой острой токсичностью [13]. Как показано, аналогичная закономерность установлена нами также для ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106. Так, ЛПС-10 характеризовался более высоким по сравнению с ЛПС-37 выходом, наличием ненасыщенной кислоты, более высоким содержанием О-специфических полисахаридных цепей, а также большей токсичностью. Аналогичные результаты получены исследователями при изучении ЛПС *Aeromonas hydrophila* [17]. Электрофореграмма ЛПС *Aeromonas hydrophila*, выращенных при 37°С, имела типичный для R-форм характер распределения электрофоретических полос, тогда как при 28° С бактерии характеризовались присутствием ЛПС гладкого типа.

Температура среды выращивания может влиять и на антигенные свойства О-специфического полисахарида. В ЛПС *P. aeruginosa*, которые выращивали в диапазоне температур 15-45°С, у бактерий, культивированных на холоде, доля длинных молекул О-полисахарида была выше по сравнению с ЛПС, полученными при более высокой температуре. Одновременно наблюдается уменьшение содержания S-форм ЛПС вдвое при понижении температуры в пределах указанного диапазона [18]. В другой работе была показана доступность для взаимодействий с антителами группового антигена при выращивании *P. aeruginosa* при порого-

во високої температурі. Клетки, вирощені в оптимальних умовах, аглютинувалися тільки серотипоспецифічною антисывороткою [19].

При вирощуванні при низьких температурах для представителів сімейства ентеробактерій характерним являється появлення гексадеценної кислоти. У сальмонелл вона заміщає додеканову кислоту, приєднуючись до гідроксигрупи амідосвязанної 3-ОН-С<sub>14:0</sub> [20]. Як було показано, даний процес здійснюється трансферазою гексадеценної кислоти *lpxP* [21], відповідний ген якої активується при температурі 12 °С і нижче [22].

Вместе с тем указанные механизмы не носят характер абсолютной закономерности, что свидетельствует о сложности и индивидуальности процессов формирования ЛПС для каждого вида микроорганизмов.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о существенных различиях в биохимическом, иммунохимическом составех и биологических свойствах препаратов ЛПС, полученных из культуры *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106, выращенной при разных температурных режимах. Высказано предположение о том, что различия определяются изменением структуры ЛПС. Способность «холодовых» вариантов синтезировать ЛПС, различающиеся по длине цепи и степени гидрофобности, имеет большое биологическое значение, обеспечивая более плотную упаковку ЛПС на клеточной поверхности. С другой стороны, присутствие в клетках *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106, выращенных на холоде, ЛПС с длинными О-полисахаридными цепями характеризуется более высокой токсичностью их ЛПС по сравнению с ЛПС бактерий, выращенных при 37° С.

## ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРИ ВИРОЩУВАННЯ *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *CHLORORAPHIS* УКМ В-106 НА СКЛАД ТА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ

О.С. Броварська, Л.Д. Варбанець

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

### Резюме

**Мета.** Провести порівняльне вивчення хімічного складу ліпополісахаридів (ЛПС) *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106, виділених із бактерій, що були вирощені при різних температурних режимах (10, 28 і 37 °С). **Методи.** Воднофенольна екстракція ЛПС, електрофорез у поліакриламідному гелі, хромато-мас-спектрометричне визначення моносахаридного і жирнокислотного складів, вивчення антигенної структури методом імунодифузії в агарі за Оухтерлоні. **Результати.** Вихід ЛПС з «холодового» варіанту майже в 5 разів перевищував такий з клітин, що культивувалися при 37°С. Однією із причин низького виходу ЛПС-37 (2.3 %) в порівнянні з 11.3 % виходу ЛПС-10 може бути присутність у зовнішній мембрані бактерій «теплого» варіанту ЛПС з короткими О-полісахаридними ланцюгами, які завдяки своїй гідрофобності погано виділяються при фенол-водній екстракції. За якісним

моносахаридним складом ЛПС схожі між собою. Разом з тим при підвищенні температури вирощування клітин збільшувався відсотковий вміст гептози, яка є характерним компонентом олігосахариду кора. Якісний склад жирних кислот досліджуваних ЛПС подібний, їх же кількісний вміст різниться суттєво. Домінуючими у всіх ЛПС були 3-ОН-С<sub>14:0</sub>, а також С<sub>14:0</sub>, вміст якої при підвищенні температури культивування збільшувався. Із ненасичених кислот С<sub>16:1</sub> була виявлена тільки в ЛПС-10. Вивчення токсичності показало, що значення ЛД<sub>50</sub> знижувалось в порядку ЛПС-10, ЛПС-20 і ЛПС-37. Таким чином, найбільшу токсичність проявив ЛПС «холодового» варіанту, а менш токсичним був «тепловий». При вивченні антигенної структури було показано наявність в складі досліджуваних ЛПС загальних антигенних детермінант. **Висновки.** Підвищення температури культивування клітин викликає зміни біохімічних, імунохімічних і біологічних властивостей ЛПС.

*Ключові слова:* *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* УКМ В-106, температура культивування, ліпополісахарид, моносахаридний, жирнокислотний склад, біологічна активність.

## THE INFLUENCE OF *PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS* SUBSP. *CHLORORAPHIS* UCM B-106 CULTIVATION TEMPERATURE ON COMPOSITION AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF LIPOPOLYSACCHARIDES

O.S. Brovarskaya, L.D. Varbanets

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,  
154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, 03143, Ukraine*

### Summary

**The purpose** of this work was to conduct a comparative study of the chemical composition of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* UCM B-106 lipopolysaccharides (LPS), isolated from bacteria grown at different temperature regimes (10, 28 and 37 °C). **Methods.** Phenol-water extraction of LPS, electrophoresis in polyacrylamide gels, chromatographic-mass spectrometric determination of monosaccharide and fatty acid compositions, study of the antigenic structure by immunodiffusion in agar by Ouchterlony. **Results and conclusions.** It is shown that an increase in the temperature of cultivation causes changes in the biochemical, immunochemical and biological properties of LPS obtained from cells growing at different temperatures (LPS-10, LPS-28 and LPS-37). The yield of LPS from the “cold” variant was almost 5 times higher than that of cells cultivated at 37°C. One of the reasons for the low yield of LPS-37 (2.3%), as compared to 11.3% of LPS-10 yield, may be the presence of the “thermal” variant of LPS with short O-polysaccharide chains (as we showed by PAGE) and which because of their hydrophobicity poorly extracted by phenol-water procedure. Analysis of monosaccharide composition of LPS showed that the preparations are similar in quality composition. At the same time, with increasing cell growth temperature, the percentage of heptose, a characteristic component of core oligosaccharide, increased (47.5, 52.5, 52.9% for LPS-10, LPS-28, LPS-37, respectively). The results of the determination of the fatty acid composition of the studied LPS showed that the qualitative composition of fatty acids is very

close, and their quantitative content varies significantly. The dominant were 3-OH-C14: 0 (35.5, 47.2, 32.4%), and also C14: 0 (31.6, 34.4, 42.1%, respectively for LPS-10, LPS-28, LPS-37) the content of which increases with an increase in the growing temperature. Of unsaturated acids, C16: 1 (12.0%) was detected only in LPS-10. The toxicity study showed that the LD<sub>50</sub> values decreased in the range of LPS-10, LPS-20 and LPS-37 (2.0, 20.0 and 35.56 mg / kg animals, respectively). That is, the greatest toxicity was shown by LPS “cold variant”, and the least toxic - “thermal” (LPS-37). When studying the antigenic structure by immunodiffusion in Ouchterlony agar, the presence of common antigenic determinants in the composition of the LPS studied was shown. **Summary.** The increasing of cultivation temperature of cells growing causes the changes in biochemical, immunochemical and biological properties of LPS.

*Keywords:* *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *chlororaphis* YKM B-106, different temperatures of cultivation, lipopolysaccharide, monosaccharide, fatty acid composition, biological activity.

1. Westphal O, Luderitz O, Rietschel E, Galanos C. Bacterial lipopolysaccharide and its lipid A component: some historical and some chemical aspects. *Biochem. Soc. Trans.* 1981; 9(3): 191-195.
2. Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides – extraction with phenol. *Methods Carbohydr. Chem.* 1965; 5: 83-91.
3. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 1956; 28(3): 350-356.
4. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr LA, Randal RJ. Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(5): 265-275.
5. Spirin AS. [Spectrophotometric determination of total nucleic acids]. *Biochemistry.* 1958; 23(5): 656-662. Russian.
6. Varbanets LD, Zdorovenko GM, Knirel YuA. [Methods of endotoxin investigations]. K: Naukova Dumka, 2006; 237. Russian.
7. Albersheim P, Nevis DJ, English PD, Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carboh. Res.* 1976; 5(3): 340-345.
8. Laemmli UK. Cleavage of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-685.
9. Tsai CM, Frash CE. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1982; 119: 115-119.
10. Galanos C, Freudenberg MA, Reuter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76:5939-5943.
11. Nowotny A. *Basic Exercises in Immunochemistry. A laboratory Manual.* Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag. 1979; 303-305.
12. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy.* 1962; 6:3-15
13. Bakholdina SI, Krasikova IN, and Solov'eva TF. [The Effect of the culturing method and the growth phase on the lipopolysaccharide composition of *Versinia pseudotuberculosis*]. *Journal of Bioorganic Chemistry.* 2001; 27(2): 151-155. Russian.

14. Zubova SV. [Effect of lipopolysaccharide composition on bacterial cell wall characteristics]. Abstract dis. cand. Biol. Sciences: 03.00.04 Pushchino, 2006; 95. Russian.
15. Dentovskaya SV, Bakhteeva IV, Titareva GM, Shaikhutdinova RZ, Anisimov AP, Kondakova AN, Bystrova OV, Knirel YA, Lindner B. [Structural diversity and endotoxic activity of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*]. Biochemistry. 2008; 73(2): 237-246. Russian.
16. Knirel YA, Kochetkov NK. [The structure of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. I. General characteristics of lipopolysaccharides and lipid A structure] Biochemistry. 1993; 58(2): 166-188. Russian.
17. Pieretti G, Carillo S, Lanzetta R, Parrilli M, Merino S, Tomás JM, Corsaro MM. Structural determination of the O-specific polysaccharide from *Aeromonas hydrophila* strain A19 (serogroup O:14) with S-layer. Carbohydr. Res. 2011; 346: 2519-2522.
18. Kropinski AM, Lewis V, Berry D. Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins, and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. J. Bacteriol. 1987; 69: 1960-1966.
19. Makin SA, Beveridge TJ. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ceases to express serotype-specific lipopolysaccharide at 45 degrees C. J. Bacteriol. 1996; 178: 3350-3352.
20. Carty SM, Sreekumar KR, Raetz CR. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction At 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. J. Biol. Chem. 1999; 274: 9677-9685.
21. Burtnick MN, Woods DE. Isolation of polymyxin B-susceptible mutants of *Burkholderia pseudomallei* and molecular characterization of genetic loci involved in polymyxin B resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43: 2648-2656.
22. Rebeil R, Ernst RK, Jarrett CO, Adams KN, Miller SI, Hinnebusch BJ. Characterization of late acyltransferase genes of *Yersinia pestis* and their role in temperature-dependent lipid A variation. J. Bacteriol. 2006; 188(4): 1381-1388.

Отримано 26.02. 2018