

**АНТИВІРУСНА АКТИВНІСТЬ БІОСУРФАКТАНТУ
КУЛЬТУРИ *GORDONIA RUBRIPERTINCTA* УКМ АС-122**

**¹Карпенко О.В., ²Бова Т.О., ¹Пристай М.В.,
²Дерев'янюк С.В.**

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин ІнФОВ
ім. Л.М. Литвиненка НАН України,
вул. Наукова, 3 а, м. Львів, 79053

²Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН України,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027

E-mail: e.v.karpenko@gmail.com

*У роботі наведено результати досліджень антивірусної активності клітино-зв'язаного біосурфактанту, який синтезується культурою *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122, та його окремих складників (трегалозоліпідів, жирних кислот і каротиноїдів). Показано, що максимальний антивірусний ефект спостерігали при додаванні 100 мг/см³ біосурфактанту в підтримуюче середовище: інфекційний титр штаму «Дніпровський-34» тешовірусу свиней 1-го серотипу знижувався на 3,25 lg ТЦД₅₀/см³.*

Ключові слова: біосурфактант, тешовірус, антивірусна активність.

Актуальною проблемою сьогодення є підвищення продуктивності свійських тварин. Поширення вірусних хвороб спричиняє значні втрати продукції сільського господарства. Одним із резервів збереження агроекологічного потенціалу є розробка безпечних низькотоксичних засобів захисту тварин від вірусних хвороб. Основними противірусними заходами залишається вакцинопрофілактика, яка, незважаючи на ефективність і тривалість дії, має вузьку спрямованість. З огляду на різноманітність типів вірусів тварин, вакцинопрофілактика часто виявляється неефективною. Лікарські препарати з антивірусною дією містять такі синтетичні сполуки, як неприродні нуклеозиди, похідні бензімідазолу, циклічні аміни, похідні адамантину, тіосемікарбазони тощо, які є токсичними для макроорганізму [1-3]. Даних про ефективну хіміотерапію при лікуванні тешовірусних інфекцій свиней до цього часу немає.

Перспективними для розробки антивірусних препаратів для тварин є речовини мікробного походження, зокрема біосурфактанти, які є малотоксичними, володіють широким спектром біологічної

активності. Біосурфактанти мають значний потенціал для захисту тварин від хвороб у зв'язку з їх унікальними властивостями: здатністю впливати на ріст клітин, ензимну активність, проникність клітинних мембран, тобто регулювати трансмембранні процеси [4]. Вони активні у широкому діапазоні температури, рН і за високих концентрацій солей. Крім того, було показано можливість синтезу біосурфактантів за використання дешевих субстратів [5], що є важливим економічним фактором при впровадженні агропрепаратів.

Відомо, що біосурфактанти можуть діяти як антибіотики, противірусні і протипухлинні агенти, специфічні токсини і ферментні інгібітори, пригнічуючи розвиток цілих клітин і окремих метаболічних процесів. Так, дослідження біологічної активності рамноліпідів *Pseudomonas* sp. PS-17 та сурфактину *Bacillus subtilis* виявили їх противірусні властивості [6, 7]. В літературі також описано біологічну активність гліколіпідних біосурфактантів (трегалозоліпідів), що синтезуються представниками роду *Rhodococcus* та *Gordonia*. Наприклад, відмічається інгібування процесу проростання конідій гриба *Glomerella cingulata* під дією трегалозоліпіда з *R. erythropolis* DSMZ 43215 [8] та інгібування вірусів герпесу та грипу за дії сукцинолтрегалозоліпідів з *R. erythropolis* SD-74 [9]. Sudo та ін. [10] показали, що три гомологи сукцинолтрегалозоліпіду (STL-3) за критичної концентрації міцелоутворення інгібували ріст і індукували диференціацію людських промієлітичних клітин лейкемії HL60. Показано [11], що трегалозоліпіди пригнічували ріст бактерій, зв'язуючись із їх зовнішньою мембраною, проникали всередину клітини і руйнували цитоплазматичну мембрану. У досліджуваних штамів грибів вони спричиняли чіткі деформації і видиме стискання (зморщування) клітин. Вплив гліколіпідних біосурфактантів, які синтезуються бактеріями родів *Rhodococcus* та *Gordonia*, на віруси тварин не досліджувався.

Метою роботи було дослідження антивірусної дії біосурфактантів бактеріального штаму *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 на прикладі штаму «Дніпровський-34» тешовірусу свиней 1-го серотипу.

Матеріали і методи. Біосурфактанти отримували шляхом культивування штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 на рідкому поживному середовищі Гудвіна в нашій модифікації (г/л): NaNO_3 –

3,0; K_2HPO_4 – 2,0; KH_2PO_4 – 2,0; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $Na_3C_6H_5O_7 \times 2H_2O$ – 1,0; дріжджовий екстракт – 1,0; гексадекан – 20,0 (ротаційна качалка, 200 об/хв, 28-30 °С, 5 діб). Після центрифугування отриманої культуральної рідини сумарний біосурфактант виділяли методом екстракції з клітинної маси сумішшю хлороформ-метанол (2:1) з подальшим випарованням у вакуумі до постійної маси. Отриманий екстракт біосурфактанту розділяли на фракції методом адсорбційної хроматографії (колонка з силікагелем G 60, 0.063-0.20 мм), елювання фракцій проводили із застосуванням систем хлороформ-метанол у градієнті полярності: 98:2, 9:1, 5:1, 2:1, 1:1, метанол. Склад фракцій контролювали за допомогою тонкошарової хроматографії із застосуванням специфічних барвників. Поверхневий натяг розчинів біосурфактантів визначали методом Вільгельмі за використання платинової пластинки [12]. Індекс емульгування визначали у системі розчин біосурфактанту-вазелинова олія за методом Gutnick [13].

Вивчення токсичності біосурфактанту штаму *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 (БС), а також його фракцій (трегалозоліпиду (ТЛ), жирних кислот (ЖК), каротиноїдів (К)) проводили в перещеплюваній лінії культури клітин нирки новонародженого хом'яка (ВНК-21). У дослідах використовували 3-4-денну культуру клітин ВНК-21, яку вирощували в пробірках з живильними середовищами 199 та 0,5 % гідролізат лактальбуміну у співвідношенні 1:1 з додаванням 10 % сироватки крові великої рогатої худоби. Сформований моношар клітин тричі відмивали розчином Хенкса і вносили розчини досліджуваних сполук у середовищі 199 з концентраціями від 1 до 1×10^{-8} мг/см³. Інкубували при 37 °С упродовж 7 діб. Мікроскопічно контролювали появу дегенеративних змін у моношарі ВНК-21.

Антивірусну активність досліджуваних сполук визначали до штаму «Дніпровський-34» тешовірусу свиней 1-го серотипу, який зберігається в колекції штамів тешо- ентеровірусів свиней Інституту сільськогосподарської мікробіології НААН, в культури клітин ВНК-21.

Сформований моношар культури клітин ВНК-21, що вирощували в пробірках, відмивали розчином Хенкса і вносили досліджувані речовини в концентраціях 100, 10, 1 мкг/см³. Після інкубації при 37 °С упродовж 1 доби вносили вірус з розрахунку 100 ТЦД₅₀/см³. Через 24 години інкубації при 37 °С зразки переглядали під оптичним мікроскопом, тричі заморожували

і розморожували. Інфекційну активність зразків визначали в моношарі культури клітин СНЕВ або ВНК-21 за методом Ріда Л. й Менча Х. [14].

Результати та їх обговорення. Встановлено, що штам *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 синтезує клітино-зв'язаний біосурфактант, який знижує поверхневий натяг води до 33,1 мН/м. Методом тонкошарової хроматографії було досліджено якісний склад біосурфактанту та встановлено, що його основними компонентами є трегалозоліпіди, жирні кислоти та каротиноїди. Найефективніше знижували поверхневий натяг води ТЛ – до 32,8 мН/м, для фракцій ЖК та К цей показник становив відповідно 51,5 та 49,2 мН/м. ТЛ, на відміну від ЖК та К, виявляли емульгувальну активність: індекс емульгування у системі розчин сурфактанту- вазелінова олія становив 44,6 %.

Встановлено, що біосурфактант культури *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 та його складові не впливали на морфологію клітин. Через тиждень дегенеративні зміни моношару культури клітин лінії ВНК-21 не спостерігалися.

Титр тешовірусу штам «Дніпровський-34» у культурі клітин ВНК-21 без внесення досліджуваних речовин становив $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Встановлено, що максимальний антивірусний ефект спостерігався при додаванні $100 \text{ мкг}/\text{см}^3$ біосурфактанту в підтримуюче середовище. Інфекційний титр тешовірусу знижувався на $3,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. За концентрацій 1 та $10 \text{ мкг}/\text{см}^3$ репродуктивна активність тешовірусу зменшувалася на 3,0 та $1,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, відповідно (рис. 1).

Досліджено також антивірусні властивості фракцій біосурфактанту *G. rubripertincta* УКМ Ас-122, виділених із застосуванням колонкової хроматографії. Показано, що фракція трегалозоліпідів мала дещо меншу антивірусну активність, ніж біосурфактант: порівняно з контролем інфекційність тешовірусу при додаванні в середовище 100 та $1 \text{ мкг}/\text{см}^3$ ТЛ знижувалася на 3 та $2,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, відповідно. За концентрації ТЛ до $10 \text{ мкг}/\text{см}^3$ інфекційність зменшувалася на $1,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Для фракції жирних кислот найвища антивірусна активність проявлялася за концентрації $100 \text{ мкг}/\text{см}^3$. Інфекційний титр тешовірусу знижувався на $2,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Вплив жирних кислот на репродуктивність тешовірусу в культурі клітин

ВНК-21 за їх концентрацій у підтримуючому середовищі на рівні 10 та 1 мкг/см³ був меншим: інфекційність знижувалася лише на 2,25 та 1,75 lg ТЦД₅₀/см³, відповідно.

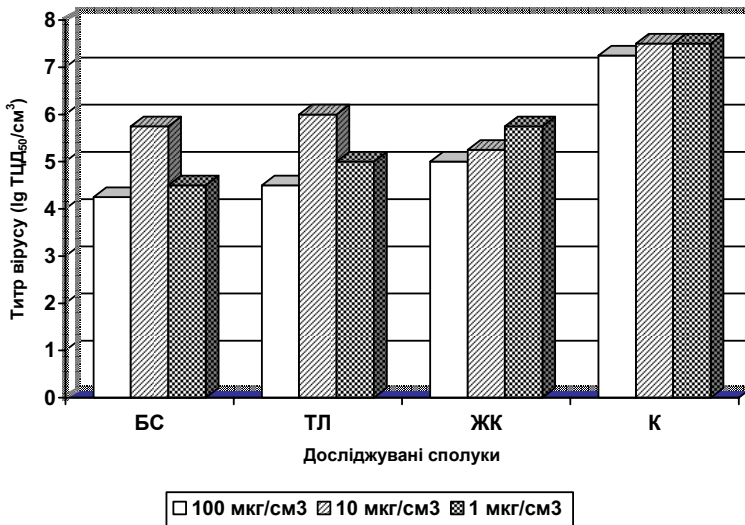


Рис. 1. Вплив біосурфактанту штаму *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122 (БС) та його складових (ТЛ, ЖК та К) на інфекційну активність тешовірусу в культурі клітин ВНК-21

Додавання фракції каротиноїдів у підтримуюче середовище суттєво не вплинуло на репродукцію тешовірусу у культурі клітин ВНК-21. Лише за концентрації каротиноїдів 100 мкг/см³ в підтримуючому середовищі інфекційний титр знижувався на 0,25 lg ТЦД₅₀/см³.

Отже, результати дослідження антивірусної активності клітино-зв'язаного біосурфактанту *G. rubripertincta* УКМ Ас-122 та його окремих складників (трегалозоліпідів, жирних кислот і каротиноїдів) показали, що максимальний вплив спричиняв лише біосурфактант. На нашу думку, це можна пояснити синергетичним ефектом його компонентів.

1. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты: справочник. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – С. 192-225.

2. Собко А.И. Поиск химических соединений с противовирусной активностью /А.И. Собко, В.Н. Тацкая, Л.Н. Решотко, А.Э. Яворский

//Матер. науч. конф. «Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии». – Покров, 1992. – Часть II. – С. 303.

3. Санин А.В. Применение иммуномодуляторов при вирусных заболеваниях мелких домашних животных /Санин А.В. //Рос. журн. вет. медицины. – 2005. – № 1. – С. 38-42.

4. Sotirova A. Rhamnolipid–biosurfactant permeabilizing effects on gram–positive and gram–negative bacterial strains /[A. Sotirova, D. Spasova, D. Galabova et. al.] //Curr Microbiol. – 2008. – Vol. 56, N 6. – P. 639-644.

5. Banat I.M. Potential commercial applications of microbial surfactants /I.M. Banat, R.S. Makkar, S.S. Cameotra //Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2000. – Vol. 53. – P. 495-508.

6. Remichkova M. Anti-herpesvirus activities of *Pseudomonas sp.* S-17 rhamnolipid and its complex with alginate/[M. Remichkova, D. Galabova, I. Roeva et al.] //Z. Naturforsch. – 2008. – Vol. 63. – P. 75-81.

7. Kracht M. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives /[M. Kracht, H. Rokos, M. Ozel et al.] //J. Antibiot. – 1999. – Vol. 52. – P. 613-619.

8. Lang S. Biological activities of biosurfactants /S. Lang, F. Wagner //Biosurfactants – Production, Properties and Application. Surfactant Science Series; Ed. N. Kosaric. – New York: Marcel Dekker Inc, 1993. – Vol. 48.

9. Desai J.D. Microbial production of surfactans and their commercial potential /J.D. Desai, I. Banat //Microbiol. Molecul. Biol. Rev. – 1997. – Vol. 61, N 1. – P. 47-64.

10. Sudo T. Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids /[T. Sudo, X. Zhao, Y. Wakamatsu et. al.] //Cytotechnology. – 2000. – Vol. 33. – P. 259-264.

11. Abdel-Megeed A. Biochemical characterization of anti-microbial activity of glycolipids produced by *Rhodococcus erythropolis* /[A. Abdel-Megeed, A.N. Al-Rahma, A.A. Mostafa et. al.] //Pak. J. Bot. – 2011. – Vol. 43, N 2. – P. 1323-1334.

12. Абрамзон А.А. Поверхностно-активные вещества. Синтез, анализ, свойства, применение /А.А. Абрамзон, Л.П. Зайченко, С.И. Файнгольд. – Л.: Химия, 1988. – 200 с.

13. Gutnick D.L. Perspectives on microbial surfactants /D.L. Gutnick, W.A. Minas //Biochemical Society Transactions. – 1987. – Vol. 15. – P. 228-356.

14. Reed L.J. A simple method of estimating fifty per cent endpoints /Reed L.J., Muench H. //Amer. J. Hyg. – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.

АНТИВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ БИОСУРФАКТАНТОВ КУЛЬТУРЫ *GORDONIA RUBRIPERTINCTA* УКМ АС-122

**¹Карпенко Е.В., ²Бова Т.А., ¹Пристай М.В,
²Деревянко С.В.**

¹Отделение физико-химии горючих ископаемых ИнФОВ
им. Л.М. Литвиненко НАН Украины, г. Львов

²Институт сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины,
г. Чернигов

*В работе представлены результаты исследований анти-вирусной активности клеточно-связанного биосурфактанта, который синтезируется культурой *Gordonia rubripertincta* УКМ Ас-122, и его отдельных частей (трегалозолипидов, жирных кислот и каротиноидов). Показано, что максимальный антивирусный эффект наблюдали при добавлении 100 мкг/см³ биосурфактанта в поддерживающую среду. Инфекционный титр штамма «Днепровский-34» тешовируса свиней 1-го серотипа снижался на 3,25 lg ТЦД₅₀/см³.*

Ключевые слова: биосурфактант, тешовирус, антивирусная активность.

ANTIVIRAL ACTIVITY OF BIOSURFAKTANTS OF *GORDONIA RUBRIPERTINCTA* UKM AS-122 CULTURE

**¹Karpenko O.V., ²Bova T.O., ¹Pristay M.V.,
²Derev'yanko S.V.**

¹Department of physics and chemistry of fuel minerals InFOV
named Litvinenko L.M. NAS of Ukraine, L'viv

²Institute of Agricultural Microbiology NAAS of Ukraine, Chernihiv

*The paper presents the results of antiviral activity study of cell-bound biosurfaktant that is synthesized by the *Gordonia rubripertincta* UKM Ac-122 and its individual components (trehalozolipids, fatty acids and carotenoids). It was shown that maximal antiviral effect was observed at adding of 100 mkh/sm³ of biosurfaktant in supportive medium. Infectious titer of strain «Dniprovskiy-34» of porcine teshovirus-1 was decreased on 3,25 lg ICID₅₀/sm³.*

Key words: biosurfaktant, teshovirus, antiviral activity.