



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76689** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
C12N 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 08212	(72) Винахідник(и): Кіпріанова Олена Андріївна (UA), Варбанець Людмила Дмитрівна (UA), Рибалко Світлана Леонтіївна (UA), Шепелевич Вікторія Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.07.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.01.2013	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д.К. ЗАБОЛОТНОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Заболотного, 154, МСП, м. Київ, Д 03680 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2013, Бюл.№ 1	

(54) ШТАМ PSEUDOMONAS CHLORORAPHIS SUBSP. AUREOFACIENS - ПРОДУЦЕНТ ЛІПОПОЛІСАХАРИДУ З ПРОТИВІРУСНОЮ АКТИВНІСТЮ

(57) Реферат:

Штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* - продуцент ліпополісахариду з противірусною активністю.

UA 76689 U

Корисна модель належить до біотехнології, а саме: до одержання противірусних препаратів за допомогою мікробного синтезу.

Вірусні хвороби рослин відзначаються широким розповсюдженням в агро- та біоценозах і викликають значні економічні збитки в рослинництві [1]. За шкодочинністю віруси рослин часто виходять на перше місце, випереджаючи інших збудників, в тому числі й фітопатогенні гриби. В той же час перелік ефективних і екологічно безпечних противірусних засобів вкрай обмежений. Хімічні речовини, ефективні проти збудників вірусних захворювань, як правило, відзначаються значною фітотоксичністю [2], до того ж ускладнюють проблеми екологічної рівноваги в довкіллі.

Поодинокі повідомлення стосуються природних речовин, які містяться в рослинних екстрактах [3], але їх ефективність не перевищує 40-50 %. Нечисленні повідомлення свідчать про те, що бактеріям та дріжджам властива противірусна активність [4, 5], але розробка перспективних для практики біопрепаратів, які б гальмували віруси рослин, знаходиться ще на початковій стадії.

Задачею корисної моделі є отримання штаму-продуцента ліпополісахариду з високою противірусною активністю.

В останні роки було встановлено, що ліпополісахариди деяких мікроорганізмів зокрема бактерій роду *Pseudomonas* відіграють істотну роль у взаємодії рослин із збудниками захворювань [6]. Показано, що ліпополісахариди деяких штамів бактерій роду *Pseudomonas* активують і запускають експресію захисних механізмів рослин у відповідь на інфекцію, спричинену грибами або бактеріями. У світлі цих даних нами були досліджені і вперше встановлені противірусні властивості ліпополісахаридів *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* - виду, що широко використовується для біологічного захисту сільськогосподарських культур від шкідників і патогенів.

Запропонований штам-продуцент ліпополісахариду *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* УКМ В-7096 дозволяє отримати ліпополісахарид (ЛПС), високо ефективний щодо вірусу тютюнової мозаїки (91-100 % зниження інфекційності ВТМ в концентраціях 1-10 мг/мл) і вірусу герпесу (зниження інфекційного титру на 3,0 lg ID₅₀).

Найбільш близьким до корисної моделі є захищений патентом Японії штам бактерій роду *Pseudomonas*, ліпополісахарид якого є індуктором стійкості однодольних рослин (Monocotyledonae) до захворювань [7]. Названий патент стосується впливу ЛПС на загальні механізми резистентності рослин до патогенів. Його противірусна дія, зокрема ефективність щодо вірусу тютюнової мозаїки (а тим більше - щодо вірусу герпесу) не були об'єктом досліджень.

Досліджений нами штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* ізолювано з ризосфери капусти у відділі антибіотиків 1МВ НАНУ в 1980 р. і депоновано в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером 1МВ В-7096.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості продуцента.

Грамнегативна рухома паличка, лопотрих. Не утворює включень полі-β-оксимаєляної кислоти. На м'ясопептонному агарі колонії гладкі, блискучі, пастоподібні, на м'ясопептонному бульйоні - рівномірна муть. Виділяють у середовище жовто-зелений флюоресціюючий пігмент, характерний для багатьох видів псевдомонад, та червоно-оранжевий пігмент, який вилучається хлороформом і являє собою комплекс похідних феназину. Аероб, що використовує глюкозу тільки окислювальним шляхом. Оксидазопозитивні за Ковачем. Оптимальна для росту температура 27 °С. При 42 °С не ростуть. Анаеробно розщеплюють аргінін, не здатні до денітрифікації, не мають лізин декарбоксилази, не гідролізують крохмаль та ескулін. Гідролізують желатин, окислюють глюконат, утворюють леван із сахарози. Як єдине джерело вуглецю використовують більше 60 органічних сполук різної хімічної будови, в тому числі триптофан, антранілат, феніл ацетат.

Штам зберігається в ліофілізованому стані або у високому (8-10 мл) стовпчику з 0,5 % м'ясопептонного агару (МЛА) під шаром стерильного вазелінового масла при кімнатній температурі. Пересів 1 раз на рік. Добре росте на м'ясопептонному агарі при 25-30 °С. Ідентифікація проведена за визначником: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2 ed.), Volume 3. 2008 та публікацією, присвяченою таксономічній структурі виду [8].

Штам-продуцент *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* В-7096 не вірулентний, не токсигенний і не токсичний для теплокровних організмів, не проникає і не розмножується в клітинах організму, не спричиняє запальної дії на слизові оболонки та шкіру, відноситься до 4-го класу небезпеки.

Температурні умови теплокровного організму не є сприятливими для життєдіяльності цих бактерій, оптимальна температура росту яких складає 26-28 °С.

Спосіб одержання ліпополісахариду (ЛПС) включає вирощування штама-продуцента в умовах аерації на середовищі Кінг А (г/л): пептон - 20, K₂SO₄-20, гліцерин - 20, MgCl₂·7 протягом 72 год. при 27 °С.

Ліпополісахарид одержували з клітин штаму В-7096 водно-фенольним методом за Вестфалем-Янном. Як тест-об'єкт використовували ВТМ (штам Ui). Суспензію препарату ВТМ (2 мг/мл), очищеного методом диференціального центрифугування, зберігали при 4 °С в ампулах у 0,01 М фосфатному буфері рН 7,4 та використовували за необхідністю.

Здатність ЛПС гальмувати розвиток вірусної інфекції вивчали на трьох надчутливих до ВТМ тест-рослинах: дурмані (*Datura stramonium* L.) та тютюні (*Nicotiana tabacum* L. і *Nicotiana sanderae* L.). Випробування водних розчинів ЛПС різних концентрацій проводили загальноприйнятою методом "половинок". Через 7 діб після інокуляції рослин ВТМ підраховували кількість локальних некрозів у досліді та контролі.

Встановлено, що ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 1MB В-7096 є високоактивним противірусним агентом. Він пригнічував інфекційність вірусу тютюнової мозаїки на моделі трьох видів рослин-індикаторів в концентраціях до 1 мкг/мл.

Таблиця 1

Пригнічення ВТМ-інфекції ліпополісахаридом *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 1MB В-7096 на рослинах *Datura stramonium*

Концентрація ЛПС, мг/мл	Кількість некрозів в ДОСЛІДІ	Кількість некрозів в контролі	Пригнічення інфекційності, %
10	0,0	4,6	100
1	1,4	15,8	91
0,1	1,8	7,8	77
0,01	3,4	7,2	53
0,001	5,4	7,6	29

Поряд з високою активністю щодо вірусу тютюнової мозаїки досліджений ліпополісахарид гальмував репродукцію вірусу герпесу, тобто виявився ефективним агентом щодо деяких вірусів людини і тварин. Ці експерименти проведені в культурі тканин нирки хом'яка, інфікованих вірусом герпесу 2 типу. ЛПС не виявляв цитопатичної дії на культуру тканин в концентраціях 3,125-100 мкг/мл; в той же час його мінімально активна концентрація (МАК), тобто мінімальна кількість препарату, яка гальмувала розвиток віруспецифічного ЦПД на 50 %, складала 0,75 мкг/мл. Хіміотерапевтичний індекс дослідженого ЛПС складав 1333, що дозволяє розглядати його як активний противірусний препарат.

Таблиця 2

Мінімально активна концентрація ЛПС *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 1MB В-7096, яка гальмує на 50 % цитопатичну дію вірусу герпесу в культурі тканини

Концентрація ЛПС, мкг/мл	Титр вірусу в Ig ТЦД ₅₀
6,25	0
3,125	0
1,55	2,0
0,75	3,0
Контроль	5,0

Джерела інформації:

1. Власов Ю.И. Вирусные и микоплазменные болезни растений. - М.: Колос, 1992. - 208 с.
2. Hansen A.F. Antiviral chemicals for plant disease control // Critical Reviews in Plant Sciences.- 1989. - № 8. - Р. 45-88.
3. Yucheng Yao, Xueshun Yu, Zhide Yu. Plant antiviral agent, preparation method and application thereof. WO 2007/1090014 A01N65/08.
4. Шустер Г., Клуге З., Коваленко А.Г. Средство борьбы с вирусами растений. Патент РФ № 2036583 от 9.06.1995. A01N 63/00.

5. Daiju Yuki, Akira Kiso Method and agent for controlling plant disease using bacteria of genus *Bacillus*. United States Patent N US 2009/0175837 C12N1/20, A01N63/00.

6. Miller S.H., Mark G.L., Franks A., O'Gara F. *Pseudomonas*-Plant Interactions. In: *Pseudomonas. Model Organism, Pathogen, Cell Factory*. 2008. - Wiley-VCH Verlag GmbH, p.353-370.

7. Shibuya Naoto, Kaku Hanae, Desaki Yoshitake. Resistance-inducing agent for disease of monocotyledonae // JP 2007-03-29 N 2007077065 (A), A01N63/00, A01N63/02.

8. Peix A., Valverde A., Rivas R., Igual J., Ramirez-Bahena M., Mateos P., Santa-Regina I., Rodrigues-Barrueco C, Martinez-Molina E., Velazquez E. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P.chlororaphis* subsp.*chlororaphis* subsp. nov., *P.chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P.chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov. // Intern. J. Syst. Evol. Microbiol., 2007, 57, 1286-1290.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Штам *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* - продуцент ліпополісахариду з протівірусною активністю, зареєстрований в Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під номером 1МВ В-7096.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601