

УДК 579.841.11.22

**Л.Б. Скоклюк<sup>1</sup>, Л.Д. Варбанець<sup>1</sup>, С.І. Похил<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,  
вул. Заболотного, 154, Київ МСП, Д03680, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології і імунології ім. І.І. Мечнікова АМН України,  
вул. Пушкінська, 14/16, 61057, Харків

## **ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *RAHNELLA AQUATILIS*\***

Виділено та вивчено ліпополісахариди (ЛПС) восьми штамів *Rahnella aquatilis*, ізольованих із різних джерел. Вивчення складу нейтральних моносахаридів свідчить, що всі досліджувані ЛПС містять галактозу (13,4–68,5 %), глюкозу (5,7–29,8 %) і гептози (2,6–8,3 %) (залежно від штаму). В складі ЛПС деяких штамів *R. aquatilis* відсутні моносахариди: рибоза (95U007), рамноза (95U011, 95U012, 96U036), фукоза (95U003, 95U004, 95U007), маноза (95U012, 96U035, 96U036, 96U037). Арабіноза була присутня в складі ЛПС тільки двох штамів – 95U003 і 95U007. Аналіз даних свідчить, що за моносахаридним складом ЛПС всіх досліджуваних штамів можна віднести до шести груп. Подвійною імунодифізією в агарі показано, що всі досліджувані ЛПС *R. aquatilis* у гомологічних системах проявляли антигенну активність. Результати перехресних серологічних реакцій свідчать про імунохімічну гетерогенність виду *R. aquatilis*.

*Ключові слова:* ліпополісахарид, *Rahnella aquatilis*, моносахариди, серологічні реакції.

\*Робота виконана за часткового фінансування грантом Ф-28.4/039 ДФФД-РФФД-2009

© Л.Б. Скоклюк, Л.Д. Варбанець, С.І. Похил, 2009

Незважаючи на значний прогрес у дослідженнях ліпополісахаридів (ЛПС) патогенних грамнегативних бактерій, ЛПС сапрофітних і опортуністичних мікроорганізмів досліджуються недостатньо. Разом із тим, їх роль у патогенезі інфекційних захворювань підвищується в останні роки як результат процесу еволюційної адаптації мікроорганізмів, який був інтенсифікований широким і неконтрольованим використанням антибіотиків та погіршенням екологічних умов [1]. До цієї групи мікроорганізмів відноситься і новий вид *Enterobacteriaceae* – *Rahnella aquatilis*. Середовищем існування його представників є ґрунт та вода [9]. Іноді ці бактерії виділяють із клінічного матеріалу, але медичне значення їх не доведено. Вид *R. aquatilis* є гетерогенним, в систематиці його існує декілька невирішених питань. Відомо, що склад та структура ЛПС – головного компонента зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій – є одним із визнаних в останні роки хемотаксономічних критеріїв при створенні класифікаційних схем мікроорганізмів. Тому метою даної роботи було вивчення складу і серологічної активності ЛПС ряду штамів *R. aquatilis*.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень були вісім штамів *R. aquatilis*, виділених із різних джерел (табл. 1).

Таблиця 1

Джерела виділення штамів *R. aquatilis*

Штамп <i>Rahnella aquatilis</i> , ЛЕПМД	Джерело виділення
95U003	випорожнення людей, хворих на діарею
95U004	-/-
95U007	-/-
95U011	ризосфера рослин
95U012	-/-
96U035	вода відкритих водойм
96U036	-/-
96U037	-/-

**Примітка:** ЛЕПМД – лабораторія експериментально прикладної молекулярної діагностики

Вирощування бактерій здійснювали методом періодичного культивування на кругових качалках із використанням синтетичного середовища N [14].

Виділення та очищення ЛПС із сухої бактеріальної маси проводили за водно-фенольним методом Вестфала і Янна [4]. ЛПС очищали від нуклеїнових кислот шляхом їх осадження 50 % розчином трихлороцтової кислоти (ТХО). Нуклеїнові кислоти визначали за методом Спіріна [5], білок за методом Lowry з співавт. [11], вуглеводи – за методом Dubois [8], використовуючи фенол та сірчану кислоту, гептози – з цистеїном та сірчаною кислотою, 2-кетозидоксиоктонову кислоту – тіобарбітуровим методом [2].

Ідентифікацію нейтральних моносахаридів проводили після гідролізу препаратів у 2 N розчині HCl протягом 5 год при температурі 100 °C. Обробку зразків здійснювали за методом Albersheim з співавт. [6]: після гідролізу проби висушували (під вакуумом) та тричі промивали дистильованою водою, до проби вносили боргідрид натрію та залишали на 10 год при кімнатній температурі (в захищеному від світла місці). Нейтралізували за допомогою іонообмінної смоли КУ-2 в Н<sup>+</sup> формі, фільтрували, висушували і тричі обробляли метанолом (по 1 мл), випаровуючи. До проби додавали 0,5 мл піридину (перегнаного) та 0,5 мл оцтовокислого ангідриду і гідролізували протягом 15 хв при температурі 100 °C. Висушували, додавали 2–3 мл перегнаного хлороформу, центрифугували в скляних пробірках при 2500 г, 20 хв. Після чого супернатант, який містив суміш нейтральних моносахаридів у вигляді ацетатів поліолів, розділяли на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert, колонка DB-225 mS 30м × 0,25мм × 0,25мкм, газ носій – гелій, потік через колонку 1 мл/хв. Температура випаровування – 250 °C, інтерфейсу – 280 °C, термостата – 220 °C (режим ізотермічний). Пробу вводили з діленням потоку 1:100. Ідентифікацію моносахаридів проводили шляхом порівняння часу утримання ацетатів поліолів стандартних і досліджуваних зразків, а також із використанням комп'ютерної бази даних ChemStation. Кількісне співвідношення окремих моносахаридів визначали у відсотках від суми площ піків моносахаридів [2].

Антисироватки до грітих (2,5 год, 100°C) культур *R. aquatilis* одержували внаслідок чотирьох внутрішньовенних імунізацій кролів зростаючими дозами суспензії мікробних клітин

(від  $2 \times 10^6$  до  $50 \times 10^6$  клітин/мл) з інтервалами між ін'єкціями 5 діб. Кров у тварин відбирали на 7 добу після останньої ін'єкції.

Антигенну активність ЛПС вивчали за допомогою реакції подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні [12].

**Результати та їх обговорення.** Дослідження ЛПС, ізольованих водно-фенольним методом з восьми штамів *R. aquatilis*, виділених із різних джерел, свідчить, що його вихід складає від 10,1 до 20,0 %, що вище ніж у інших представників грамнегативних бактерій, зокрема *Escherichia coli* (близько 5 %) (табл. 2). Але він знаходиться в тих же межах, що і в ЛПС раніше вивчених представників *R. aquatilis* [3], вихід яких складав від 5,2 до 19,8 %.

ЛПС-вмісні комплекси, виділені з досліджуваних штамів *R. aquatilis*, характеризувались доволі високим вмістом нуклеїнових кислот (до 30 %), що можна пояснити особливостями методу виділення. В очищених від нуклеїнових кислот ЛПС виявлено високий вміст вуглеводів (35,0–85,5 %, залежно від штаму), незначну кількість нуклеїнових кислот (0,4–5,9 %, залежно від штаму), слідові кількості білка (табл. 2).

Таблиця 2

Вихід та вміст основних компонентів ЛПС штамів *R. aquatilis*

Штам	Кількість сухих клітин, г	Вихід ЛПС		Вміст (у відсотках від сухої маси речовини):			
		г	%	вуглеводи	білок	нуклеїнові кислоти	КДО
95U003	12,0	1,9	15,8	64,0	сл	0,4	0,1
95U004	15,4	1,8	11,7	85,5	сл	0,7	0,0
95U007	5,5	0,8	14,2	37,0	сл	5,7	0,03
95U011	6,0	0,7	12,0	47,5	сл	3,5	0,1
95U012	9,0	1,4	15,6	45,0	сл	5,3	0,34
96U035	10,0	2,0	20,0	35,0	сл	5,9	0,0
96U036	12,0	2,0	16,6	48,5	сл	5,2	0,0
96U037	7,0	0,7	10,1	36,5	сл	5,3	0,1

Вивчення складу нейтральних моносахаридів свідчить, що всі досліджувані ЛПС містять галактозу (13,4–68,5 %), глюкозу (5,7–29,8 %) і гептози (2,6–8,3 %) (залежно від штаму) (табл. 3). У складі ЛПС деяких штамів *R. aquatilis* відсутні моносахариди: рибоза (95U007), рамноза (95U011, 95U012, 96U036), фукоза (95U003, 95U004, 95U007), маноза (95U012, 96U035, 96U036, 96U037). Арабіноза була присутня в складі ЛПС тільки двох штамів – 95U003 і 95U007. Аналіз даних свідчить, що за моносахаридним складом ЛПС всіх досліджуваних штамів можна віднести до шести груп. КДО, які, як і гептози, вважаються характерними компонентами ЛПС, в недеградованих ЛПС виявлені в незначній кількості (0,03–0,34), а в ЛПС трьох штамів зовсім не виявлені. Нездатність виявити КДО в недеградованих ЛПС може бути обумовлена типом і ступенем заміщення молекули КДО. Встановлено [7], що заміщення КДО в положенні 4 (чи 5) фосфатною групою, а в положенні 5 (чи 7) – вуглеводним ланцюгом унеможливує утворення її фрагменту (ОНС-CH<sub>2</sub>-CO-COOH), який дає позитивну реакцію з тіобарбітуровою кислотою.

Таблиця 3

Моносахаридний склад ЛПС *R. aquatilis*

Штам	Моносахариди, % до загальної суми площин піків							
	рамноза	фукоза	рибоза	арабіноза	маноза	галактоза	глюкоза	гептози
95U003	19,8	-	11,0	2,7	36,7	13,8	7,7	8,3
95U004	31,0	-	12,8	-	23,7	13,4	11,5	7,6
95U007	9,9	-	-	0,7	27,2	35,9	23,7	2,6
95U011	-	15,1	2,4	-	2,9	64,0	10,9	4,7
95U012	-	12,2	8,1	-	-	68,5	5,7	5,5
96U035	1,6	24,1	3,2	-	-	57,2	7,3	6,6
96U036	-	17,3	3,3	-	-	43,6	29,8	6,0
96U037	1,2	24,5	4,5	-	-	53,5	9,5	6,8

Примітка: «-» - відсутні.

Порівняльний аналіз моносахаридного складу ЛПС досліджуваних штамів *R. aquatilis* із раніше вивченими [3] свідчить, що вони містять один і той же спектр моносахаридів, кількісний склад яких варіює залежно від штаму.

ЛПС є основним термостабільним антигеном мікробної клітини, серологічну специфічність якої визначають склад та структура ЛПС. При проведенні серологічних досліджень як антитіла були використані кролячі поліклональні антисироватки, одержані до прогрітих культур *R. aquatilis*. Антигеном слугували ЛПС, виділені з цих штамів. У реакціях кільцеприципітації та аглютинації були визначені титри антисироваток досліджуваних штамів, які становили від 1:800 до 1:3200 та від 1:6400 до 1:25600 відповідно (залежно від штаму). Реакцією подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні виявлено, що в гомологічних системах ЛПС всіх досліджуваних штамів *R. aquatilis* проявляють активність антигену (рисунок).

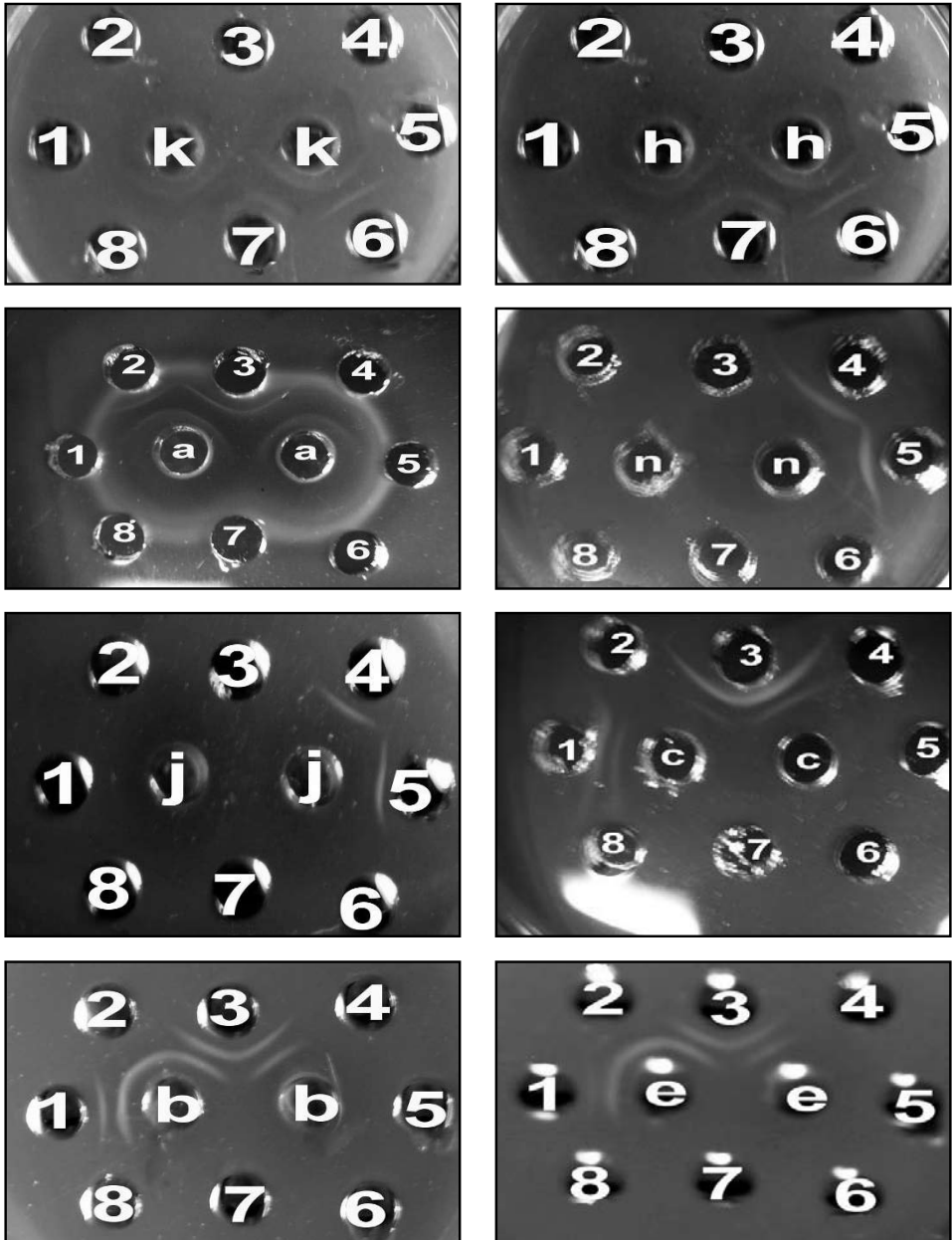


Рисунок. Реакція подвійної дифузії в агарі за Оухтерлоні ЛПС *R. aquatilis*:

1 – 33071, 2 – 95U004, 3 – 95U007, 4 – 95U011, 5 – 95U012, 6 – 96U035, 7 – 96U036,  
8 – 96U037 з О-антисироваткою до штамів: е – 95U003, б – 95U004, с – 95U007, j – 95U011, н – 95U012,  
а – 96U035, h – 96U036, k – 96U037

Відомо, що перехресні серологічні реакції, які засновані на філогенетичній спорідненості, можуть бути використані, як один із підходів у класифікації різних видів, додатково із загальноприйнятими методами таксономії. Результати перехресних реакцій за Оухтерло-ні свідчать про серологічну різноманітність досліджуваних штамів *R. aquatilis*. На основі О-антигенності ЛПС досліджувані штами можна віднести до трьох серогруп. До першої віднесені штами 95U003, 95U004, 95U007; до другої – 95U011, 95U012; до третьої – 96U035, 96U036, 96U037 (рис.). ЛПС, ізольовані з штамів-представників першої серогрупи, реагували з типовим штамом *R. aquatilis* 33071. Порівняльний аналіз моносахаридного складу ЛПС штамів 95U003, 95U004, 95U007 і типового штаму 33071 подібні. Більш того встановлено, що структури О-специфічних полісахаридів (О-ПС) *R. aquatilis* 95U003 і 33071 – аналогічні [13]. Тобто належність цих чотирьох штамів до однієї серогрупи обумовлена однаковою структурою О-ПС, яка і відповідальна за серологічну специфічність бактерій.

Таким чином, порівняльний аналіз ЛПС восьми досліджуваних штамів *R. aquatilis*, наведених у даній роботі, з ЛПС, раніше описаних штамів, свідчить, що вид *R. aquatilis* є гетерогенним як за моносахаридним складом ЛПС, так і за їх серологічною специфічністю.

*Л.Б. Скоклюк<sup>1</sup>, Л.Д. Варбанец<sup>1</sup>, С.И. Похил<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины, Харьков

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ШТАММОВ *RAHNELLA AQUATILIS*

### Резюме

Выделены и изучены липополисахариды (ЛПС) восьми штаммов *Rahnella aquatilis*, выделенных из разных источников. Изучение состава нейтральных моносахаридов свидетельствует о том, что в ЛПС всех исследуемых штаммов присутствуют галактоза (13,4–68,5 %), глюкоза (5,7–29,8 %) и гептозы (2,6–8,3 %) (в зависимости от штамма). В составе ЛПС некоторых штаммов *R. aquatilis* отсутствуют моносахариды: рибоза (95U007), рамноза (95U011, 95U012, 96U036), фукоза (95U003, 95U004, 95U007), манноза (95U012, 96U035, 96U036, 96U037). Арабиноза входила в состав ЛПС только двух штаммов – 95U003 и 95U007. Анализ данных свидетельствует о том, что по моносахаридному составу ЛПС всех исследованных штаммов можно разделить на шесть групп. Двойной иммунодифузией в агаре показано, что все ЛПС *R. aquatilis* в гомологичных системах проявляли антигенную активность. Результаты перекрестных серологических реакций свидетельствуют о иммунохимической гетерогенности вида *R. aquatilis*.

Ключевые слова: липополисахариды, *Rahnella aquatilis*, моносахариды, серологические реакции.

*L. B. Skoklyuk<sup>1</sup>, L. D. Varbanets<sup>1</sup>, S. I. Pokhyl<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

<sup>2</sup>Institute of Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

## COMPARATIVE CHARACTERISATION OF LIPOPOLYSACCHARIDES OF *RAHNELLA AQUATILLS*

### Summary

Lipopolysaccharides (LPS) of eight strains of *R. aquatilis* isolated from different sources have been studied. The studies of neutral monosaccharide composition evidence that all of LPS contain galactose (13,4–68,5 %), glucose (5,7–29,8 %) and heptose (2,6–8,3 %) (depending on strains). Some monosaccharides, such as ribose (95U007), rhamnose (95U011, 95U012, 96U036), fucose (95U003, 95U004, 95U007) and mannose (95U012, 96U035, 96U036, 96U037) were absent in LPS. Arabinose was present in two strains — 95U003 and 95U007. On the basis of monosaccharide composition all investigated LPS can be divided into six groups. It was shown by double immunodiffusion in agar that all *R. aquatilis* LPS displayed antigenic activity in homological systems. The results of serological cross reactions indicate the immunochemical heterogeneity of *R. aquatilis* species.

The paper is presented in Ukrainian.

К е y o r d: lipopolysaccharides, *Rahnella aquatilis*, monosaccharides, serological activity.

The author's address: *L.B.Skoklyuk*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Блохина И.Н., Соколова К.Я., Леванова Г.Ф. Новое в классификации и идентификации энтеробактерий // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1992. – № 1. – С. 49–52.
2. Варбанец Л.Д., Здорovenko Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. – К.: Наук. думка, 2006. – 237 с.
3. Варбанец Л.Д., Остапчук А.Н., Винарская Н.В. Выделение и характеристика липополисахаридов *R. aquatilis* // Микробиол. журн. – 2004. – **66**, № 2. – С. 25–34.
4. Вестфаль О., Янн К. Бактериальные липополисахариды // Методы исследования углеводов. – М.: Мир, 1975. – С. 325–333.
5. Спирин А.С. Определение нуклеиновых кислот // Биохимия. – 1958. – **23**, № 5. – С. 562–662.
6. Albershein P., Nevis D.J., English P.D., Karr A. A method for analysis of sugars in plant cell wall polysaccharides by gasliquid chromatography // Carboh. Res. – 1976. – **5**, N 3. – P. 340–345
7. Caroff M., Lebbar S., Szabo L. Do endotoxins devoid of 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid exist. // Biochem and Biophys. Res. Commun. – 1987. – **143**, N 3. – P. 845–847.
8. Dubois M., Gilles K., Hamilton J., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. // Anal. Chem. – 1956. – **28**, N 2. – P. 350–356.
9. Gavini, F; Ferragut, C; Lefebvre, B; Leclerc, H. Etude taxonomique d'entérobactéries appartenant ou apparentées au genre *Enterobacter*. Ann Microbiol (Paris). L – 1976. – 127B, N3. – P. 317–335.
10. Izard, D; Gavini, F; Trinel, PA; Leclere, H. *Rahnella aquatilis*, nouveau membre de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ann Microbiol (Paris). 1979. – 130, N2. – P. 163–177.
11. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // J.Biol.Chem. – 1951. – **193**, N 1. – P. 265–275.
12. Ouchterlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis // Prog. Allergy. – 1962. – **6**. – P. 3–15.
13. Zdorovenko E., Varbanets L., Zatonsky G., Zdorovenko G., Knirel Yu. Structures of the O-specific polysaccharides from different strains of *Rahnella aquatilis*. // 14<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, Lübeck, Germany. – Septembr 2-7, 2007. – Book of Abstracts. 2007. – P. 380.
14. Yidaver A. Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescens and phytopathogenic pseudomonas: effect of carbon source // Appl. Microbiol. – 1967. – **15**, N 6. – P. 15123–1524.

Отримано 10.05.2008