

**ХАРАКТЕРИСТИКА ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ *BUDVICIA AQUATICA***

Вперше з 6 штамів *Budvicia aquatica* – представників нового виду *Enterobacteriaceae*, виділено ліпополісахариди (ЛПС). Показано, що їх вихід становить 0,9-7,0 % сухої маси клітин. На основі моносахаридного складу ЛПС досліджуваних штамів можна розподілити на три групи. Серологічними дослідженнями виявлена імунохімічна гетерогенність виду *B. aquatica*: ЛПС взаємодіяли лише в гомологічній системі і не давали перехресних серологічних реакцій з гетерологічними антисироватками.

**Ключові слова:** *Budvicia aquatica*, ліпополісахарид, моносахаридний склад, серологічна активність.

*Budvicia aquatica* є одним із нових видів ентеробактерій, відкриття якого є результатом великої дослідницької роботи щодо вивчення штамів бактерій, виділених із різних джерел, і прогресом в методах, які на сьогодні застосовуються для таксономії мікроорганізмів.

В 1983 р. E. Aldova із спіавт. [8] описали нову групу сірководеньутворюючих ентеробактерій, виділених із питної води в різних регіонах Чехії, і запропонували віднести їх до нового виду *Budvicia aquatica*. Одночасно С. Richard із спіавт. [9], досліджуючи штами аналогічних мікроорганізмів, ізольованих із річної води в Швейцарії та Іспанії, віднесли їх до "*Citrobacter atypical*". Наступний обмін біохімічними характеристиками штамів та самими культурами дозволив дослідникам прийти до висновку, що вони працюють з однією і тією ж групою бактерій. Висновки авторів про відкриття нового роду (виду) бактерій були підтверджені дослідженнями їх геному (нуклеотидного складу, даними ДНК-ДНК гібридизації) [1].

Ліпополісахариди (ЛПС) разом із білками забезпечують цілісність і стабільність мембрани, селективну проникливість, а також міжклітинні взаємодії з іншими біосистемами. Однак хімічна структура ЛПС будвїції зовсім не вивчена. Оскільки дані щодо біохімічних, структурно-функціональних особливостей ЛПС, як одного з визнаних хемотаксономічних критеріїв можуть бути використані для встановлення систематичного положення представників гетерогенного виду *B. aquatica*, встановлення його взаємозв'язків з іншими новими видами *Enterobacteriaceae*, а також вирішення питань внутрішньовидової класифікації, метою даного дослідження було провести хімічну ідентифікацію ліпополісахаридів *B. aquatica*.

**Матеріали і методи.** Об'єктом досліджень були шість штамів *B. aquatica*, виділених з різних джерел (табл. 1). Вирощування бактерій здійснювали методом періодичного культивування на кругових качалках з використанням синтетичного середовища N [13].

Виділення ЛПС із сухої бактеріальної маси проводили за водно-фенольним методом Вестфала і Янна [4]. ЛПС очищали від нуклеїнових кислот шляхом ультрацентрифугування (105 тис g, 4 год, 3 рази).

Нуклеїнові кислоти визначали за методом Спіріна [5], білок – Lowry з спіавт. [11], вуглеводи – Dubois [10], використовуючи фенол та сірчану кислоту, 2-кетто-3-дезоксикетоннову кислоту – тіобарбітуровим методом [2].

Ідентифікацію нейтральних моносахаридів проводили після гідролізу препаратів у 2 N розчині HCl протягом 5 год при 100°C. Обробку зразків здійснювали за методом Albershein із спіавт. [7]: після гідролізу проби висушували (під вакуумом) та тричі промивали дистильованою водою, до проби вносили боргідрід натрію (5-10 мг) 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 30 хв при 100°C. Висушували, додавали 2-3 мл перегнаного хлороформу, центрифугували в скляних пробірках при 2500 g, 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 30m × 0,25mm × 0,25μm, газ носій – гелій, потік через колонку 1 мл/хв. Температура випарувача – 250 °C, інтерфейса – 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 з використанням комп'ютерної бази даних ChemStation. Кількісне співвідношення окремих моносахаридів визначали у відсотках від суми площ піків моносахаридів [2].

О-антисироватку до грітих впродовж 2,5 год при 100 °C клітин *B. aquatica* отримували шляхом імунізації внутрішньовенно кролів зростаючими дозами суспензії мікробних клітин (2 млрд/мл, від 0,1 до 1 мл), з інтервалом між ін'єкціями 4 доби. Кров у тварин відбирали на п'ятий день після останньої імунізації.

Антигенну активність ЛПС досліджували подвійною дифузією в агарі за методом Оухтерлоні [12].

**Результати та їх обговорення.** 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.

Дослідження ЛПС, ізольованих водно-фенольним методом із шести штамів *B. aquatica*, виділених із різних джерел, свідчить, що вони характеризувались достатньо високим вмістом нуклеїнових кислот (від 14,9 до 47,2 %, залежно від штаму), що досить логічно, якщо зважати особливості методу їх виділення. Очищення ЛПС від нуклеїнових кислот здійснювали, використовуючи 3 цикли ультрацентрифугування, внаслідок якого вміст нуклеїнових кислот було зменшено до 2,2–9,4 %, залежно від штаму (табл. 2). Вихід ЛПС після очистки від нуклеїнових кислот складав від 0,9 до 7,0 % залежно від штаму. Одержані результати свідчать, по-перше, що досліджувані штами відрізняються між собою за виходом ЛПС, а по-друге, вихід ЛПС у штамів *B. aquatica* значно менший, ніж у інших представників грамнегативних бактерій, зокрема *Escherichia coli* (близько 5 %), а також нових видів ентеробактерій, зокрема раніше вивчених представників *Rahnella aquatilis* [3] і *Pragia fontium* [6], вихід ЛПС у яких складав 21,7 і 19,8 % (відповідно).

При вивченні біополімерного складу ЛПС специфічними реакціями на кожний компонент встановлено, що вміст вуглеводів був порівняно невисоким і становив 16,0–38,0 %, білок – від слідових кількостей до 7,5 %, залежно від штаму. Незначна кількість вуглеводів може бути обумовлена присутністю гексозамінів, які в реакції з фенолом і сірчаною кислотою, яка використовується для визначення загальної кількості вуглеводів, не дають позитивної реакції.

Аналіз моносахаридного складу ЛПС (табл. 3) свідчить, що домінуючим моносахаридом ЛПС чотирьох штамів: DRL 23270, 24833, ЛНМІЗ 96U101 і 97U124 є глюкоза, в той час як в ЛПС ЛНМІЗ 96U126 – галактоза, яка в значній кількості була присутня також в ЛПС *B. aquatica* DRL 23270 і ЛНМІЗ 96U101. Глюкозамін (від 0,7 до 10,0 % залежно від штаму) був виявлений в ЛПС усіх досліджуваних штамів. Характерними компонентами ЛПС є гептози (0,1–23,4 %), а також 2-кето-3-дезоксиктонова кислота (КДО) – від слідових кількостей (штами DRL 23270, ЛНМІЗ 96U101, 97U124) до 0,09–0,25 % (штами DRL 20186, 24833; ЛНМІЗ 97U126), залежно від штаму (табл. 3). Згідно з сучасними уявленнями, всі бактеріальні ЛПС, незалежно від походження, містять хоча б один залишок КДО, що є зв'язковою ланкою між гідрофільною і гідрофобною частинами молекули ЛПС. Бактерії з дефектом в біосинтезі КДО не є життєздатними. За домінуючими моносахаридами досліджувані штами можна віднести до трьох груп. До першої відноситься типовий штаб DRL 20186, ЛПС якого містив рамнозу галактозу, глюкозу, до другої – штами DRL 24833, ЛНМІЗ 97U124 і 97U126, в ЛПС яких, на відміну від ЛПС першої групи, відсутня рамноза, до третьої – штами DRL 23270, ЛНМІЗ 96U101, в ЛПС яких виявлені тільки галактоза і глюкоза. В ЛПС всіх досліджуваних штамів присутні КДО, гептоза і глюкозамін.

Таким чином, клітинна оболонка досліджуваних штамів *B. aquatica* побудована, як і в інших грамнегативних бактерій, і містить у своєму складі ЛПС як структурний компонент, а він, в свою чергу, містить всі характерні для цих біополімерів компоненти.

ЛПС є головним термостабільним антигеном мікробної клітини, серологічну специфічність якої визначає склад і структура ЛПС. При проведенні серологічних досліджень як антитіла використовували кролячі поліклональні антисироватки, одержані до прогрітій культури *B. aquatica*. Як антиген використовували ЛПС, виділені з цих штамів. В реакції кільцепреципітації був визначений титр антисироватки, який склав 1:20000. В реакціях подвійної імунодифузії за Оухтерлоні було встановлено, що досліджувані ЛПС *B. aquatica* в гомологічних системах проявляють активність антигену. У двох випадках (штами DRL 20186 і ЛНМІЗ 97U124) спостерігалось утворення не однієї, а двох ліній преципітації, що свідчить про утворення двох комплексів антиген-антитіло, та відповідно про наявність двох класів різних за молекулярною масою антигенів або антитіл, або тих і інших.

При проведенні перехресних серологічних реакцій з ЛПС колекційних штамів *B. aquatica* DRL 20186, DRL 23270 і DRL 24833 і штамів з колекції ЛНМІЗ 96U101, 97U124, 97U126 антисироватка до *B. aquatica* досліджуваних штамів не взаємодіяла ні з одним з ЛПС, що може свідчити про відсутність у них загальних антигенних детермінант і про належність досліджуваних штамів до різних серогруп (рисунок). Отже серологічні дослідження свідчать про імунохімічну гетерогенність виду *B. aquatica*.

Таблиця 1

Джерела виділення штамів *B. aquatica*

Штами <i>B. aquatica</i> , колекція	Джерело виділення
DRL 20186 (типовий)	колодязна вода, Чехія, Празький інститут гігієни та епідеміології
DRL 23270	питна вода, Чехія, Празький інститут гігієни та епідеміології
DRL 24833	питна вода, Чехія, Празький інститут гігієни та епідеміології
ЛНМІЗ 96U101	вода р. Уди, Харківська обл.
ЛНМІЗ 97U124	випорожнення клінічно здорової людини
ЛНМІЗ 97U126	випорожнення клінічно здорової людини

**Примітки:** DRL – Diagnostical and Research Laboratory, Budapest, Hungary;

ЛНМІЗ – лабораторія нових і маловивчених інфекційних захворювань Харківського науково-дослідного інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова

Таблиця 2

Характеристика ЛПС *B. aquatica*

Препарат	Маса препарату		Вміст у % до сухої маси препарату		
	мг	%	Вуглеводи	Білок	Нуклеїнові кислоти
<i>B. aquatica</i> DRL 20186					
ЛПС комплекс	500	10,0	26,0	0	32,5
ЛПС очищений	200	4,0	28,0	0	9,4
<i>B. aquatica</i> DRL 23270					
ЛПС комплекс	600	9,2	21,0	19,7	14,9
ЛПС очищений	280	7,0	21,0	7,5	5,7
<i>B. aquatica</i> DRL 24833					
ЛПС комплекс	1500	13,3	26,0	0	47,2
ЛПС очищений	121	1,1	26,0	0	8,7
<i>B. aquatica</i> ЛНМІЗ 96 U 101					
ЛПС комплекс	390	5,0	30,0	13,5	23,0
ЛПС очищений	68	0,9	16,0	2,0	7,3
<i>B. aquatica</i> ЛНМІЗ 97 U 124					
ЛПС комплекс	2000	20,6	17,0	27,0	19,5
ЛПС очищений	330	3,4	38,0	3,5	2,2
<i>B. aquatica</i> ЛНМІЗ 97 U 126					
ЛПС комплекс	-	-	-	-	8,7
ЛПС очищений	242	4,0	25,0	1,8	5,9

**Примітка:** «-» не вивчали

Таблиця 3

Моносахаридний склад ЛПС *B. aquatica*

Моносахариди	DRL			ЛНМІЗ		
	20186	23270	24833	96U101	97U124	97U126
% до загальної суми площ піків						
Рамноза	18,0	-	-	1,5	1,1	1,5
Рибоза	0,9	1,9	-	1,0	-	-
Галактоза	39,8	35,9	21,1	14,5	5,3	66,0
Глюкоза	25,0	62,1	57,0	81,5	86,9	9,1
Гептоза	16,3	0,1	21,9	1,5	6,7	23,4
% до сухої маси ЛПС						
КДО	0,09	сл.	0,12	сл.	0,03	0,25
Глюкозамін	1,35	0,7	3,2	0,85	2,5	10,0

Примітка: «-» не виявлено

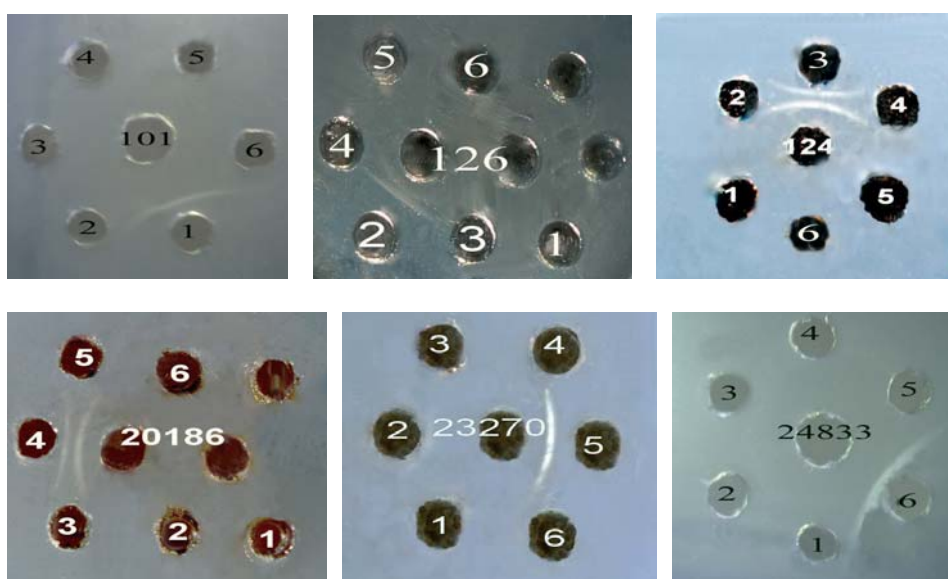


Рисунок. Реакція подвійної імунодифузії в агарі за Оухтерлоні ЛПС *B. aquatica* ЛНМІЗ 96U101 (1); *B. aquatica* ЛНМІЗ 97U126 (2); *B. aquatica* ЛНМІЗ 97U124 (3); *B. aquatica* DRL 20186 (4); *B. aquatica* DRL 23270 (5); *B. aquatica* DRL 24833 (6) з O-антисироваткою до штамів *B. aquatica*: 101, 126, 124, 20186, 23270, 24833.

Л.Д. Варбанец<sup>1</sup>, О.С. Броварская<sup>1</sup>, С.И. Похил<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України,  
ул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна

<sup>2</sup>Інститут мікробіології та іммунології ім. І.І. Мечникова АМН України

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *BUDVICIA AQUATICA*

## Резюме

Вперше із 6 штамів *Budvicia aquatica* – представителів нового виду *Enterobacteriaceae*, виділено ліпополісахариди (ЛПС). Показано, що їх вихід становить 0,9-7,0 % сухої маси кліток. На основі моносахаридного складу ЛПС досліджуваних штамів можна віднести до трьох груп. Серологічними дослідженнями виявлена іммунохімічна гетерогенність виду *B. aquatica*: ЛПС взаємодіяли тільки в гомологічній системі і не давали перекрестних серологічних реакцій з гетерологічними антисыворотками.

**Ключові слова:** *Budvicia aquatica*, ліпополісахарид, моносахаридний склад, серологічна активність.

**L.D.Varbanets<sup>1</sup>, O.S.Brovarska<sup>1</sup>, S.I.Pokhi<sup>2</sup>**

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

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

## **CHARACTERIZATION OF *BUDVICIA AQUATICA* LIPOPOLYSACCHARIDES**

### **S u m m a r y**

For the first time lipopolysaccharides (LPS) of 6 *Budvicia aquatica* strains – representatives of new Enterobacteriaceae species have been isolated. It was shown that the yield of LPS ranged from 0.9 to 7.0 % of cells dry weight. On the basis of monosaccharide composition LPS of tested strains may be referred to 3 groups. The serological studies indicated the immunochemical heterogeneity of *B.aquatica* species: LPS interacted only in homological system and showed no cross-reactivity with heterological antisera.

The paper is presented in Ukrainian.

**К е y w o r d s:** *Budvicia aquatica*, lipopolysaccharide, monosaccharide composition, serological activity.

**Т h e a u t h o r ' s a d d r e s s:** *Varbanets L.D.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, 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., Здоровенко Г.М., Книрель Ю.А. Методы исследования эндотоксинов. – К.: Наукова 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. Шубчинський В.В., Варбанец Л.Д. Хімічна характеристика структурних компонентів ліпополісахаридів *Pragia fontium*. // Микробиол. журн. – 2008. – 70, №5. – С.13–22.
7. 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, №3. – P. 340-345.
8. Aldova E., Hausner O., Gabrhelova M. A hydrogen sulfide producing gram-negative rod from water// Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyd. Abt. 1 Orig. Reihe A. – 1983. – N254. – P.95-108.
9. Bouvet O., Grimont P., Richard C. *Budvicia aquatica* gen. nov.: a hydrogen sulfide-producing member of the Enterobacteriaceae//Intern. J. Syst. Bacteriol. – 1995. – 3. – P. 208-218.
10. Dubois M., Gilles K., Hamilton J. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substranses. // Anal. Chem. – 1956. – 28, №2. – P. 350-356
11. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin reagent // J.Biol.Chem. – 1951. – 193, №1. – P. 265-275.
12. Uchertlony O. Diffusion in gel methods for immunological analysis // Prog. Allergy. – 1962. – №6. –P. 3-15.
13. Vidaver A. Synthetic and complex media for the rapid detection of fluorescence of phytopathogenic pseudomonas: effect of the carbon source //Appl. Microbiol. – 1967. – 15, №16. – P. 1523-1524.

Отримано 12.10.2010