

УДК 579.871.1:234+8.097

ХІМІЧНІ ТА ГЕМАГЛЮТИНУЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ БІОПОЛІМЕРІВ КЛІТИННОЇ СТІНКИ НЕПАТОГЕННИХ КОРИНЕБАКТЕРІЙ

Сашук О.В., Фуртат І.М., Ногіна Т.М., Коваленко Е.О., Михальський Л.О.

Коринебактерії, на відміну від інших грампозитивних бактерій, характеризуються значно складнішою будовою поверхні клітин. Внутрішній шар, що розташований безпосередньо над цитоплазматичною мембраною, є основним каркасом клітинної стінки коринебактерій і являє собою гігантську макромолекулу, яка повністю покриває бактеріальну клітину. До його складу входить комплекс: пептидоглікан, арабіногалактан та ковалентно зв'язані з ним міколові кислоти, що визначає унікальність цієї ліофільної структури серед інших прокаріотичних мікроорганізмів. Наступний шар включає, в основному, полісахариди – глікани і арабіноманани, та гліколіпіди й ліпіди. Саму зовнішню поверхню клітини формують білки, які у деяких видів коринебактерій, зокрема *Corynebacterium glutamicum*, входять до складу S-шарів [1].

У продовження наших досліджень по визначенню хімічної природи поверхневих структур деяких патогенних видів роду *Corynebacterium* [2], у даній роботі вивчали склад та гемаглютинуючі властивості поверхневих біополімерів клітин непатогенних коринебактерій.

Об'єктами досліджень були колекційні та свіжоізолювані штами *Corynebacterium*, які підтримуються в Українській колекції мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології НАН України – *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732; *C. glutamicum* 22Л, ВНИИГенетика 90, Е531, УКМ Ас-714, УКМ Ас-715 УКМ Ас-733; *C. flavescens* УКМ Ас-611, *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610; *C. variabile* УКМ Ас-716, УКМ Ас-717; *C. vitaeruminis* УКМ Ас-718, *Corynebacterium sp. (B. stationis)* УКМ Ас-719 та *Corynebacterium sp.* ІМВ 14, ІМВ 53 та ІМВ 92.

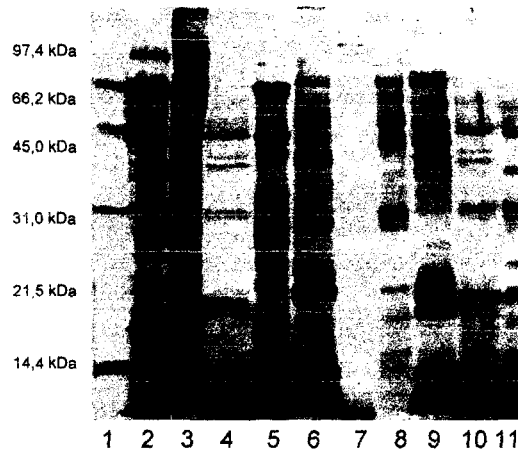
Бактерії вирощували при 28° С в колбах на качалках на середовищі для культивування коринебактерій [3]. Поверхневі біополімери одержували екстракцію буферним розчином з 1% додецилсульфату натрію (DS-Na) ("Serva", Німеччина) з інтактних клітин в кінці експоненціальної фази розвитку культури (24 г), як описано раніше [4]. Після центрифугування (8 тис. об/хв., 20 хв), одержаного під час екстракції гомогенату, отримували два препарати,

умовно названі нами як DS-Na-екстракти і DS-Na- клітини. DS-Na-екстракти містили екстраговані з клітин поверхневі біополімери, а DS-Na-клітини представляли собою залишки клітин після екстрагування. Електрофорез DS-Na-екстрактів проводили у системі ПААГ-DS-Na ("Sigma", США) за Laemmli із застосуванням 14% гелів [4]. Для візуалізації електрофореграм використовували фарбування гелей кумасі блакитним R-250 ("Serva", Німеччина). Для визначення молекулярних мас (M_m) використовували комерційний набір маркерних білків LMW ("Bio-Rad", США): фосфорилаза В (97,4 кДа), альбумін (66,2 кДа), овальбумін (45,0 кДа), карбонатгідраза (31,0 кДа), інгібітор трипсину (21,5 кДа), лізоцим (14,4 кДа). DS-Na-клітини висівали на поживне середовище для контролю життєздатності та фарбували за Грамом. Наявність діамінопімелінової кислоти та моносахаридний склад гідролізатів DS-Na клітин проводили за методами [5]. Вміст білків в DS-Na-екстрактах визначали методом Лоурі, а кількість вуглеводів – антроновим методом [6]. Гемаглютинуючу активність (ГАА) зразків визначали в реакції гемаглютинації (РГА). РГА проводили шляхом 2-х кратних серійних розведень у 96-лункових круглодонних планшетах застосовуючи 2% суспензію трипсинізованих, зафіксованих глутаровим альдегідом, кролячих еритроцитів [7].

Нами встановлено, що DS-Na-клітини зберігали свою цілісність та життєздатність, а також здатність позитивно зафарбовуватися за Грамом. Вони містили міколові кислоти та сполуки, які входять до складу пептидоглікану (мезо-діамінопімелінова кислота, глютамінова кислота та аланін у співвідношенні 1:1:2) та арабіногалактану (арабіноза і галактоза). Це свідчить про те, що після екстракції поверхневих біополімерів у DS-Na-клітин зберігався основний каркас клітинної стінки: пептидоглікан-арабіногалактан-міколові кислоти.

Дослідження якісного хімічного складу DS-Na-екстрактів показало наявність в цих зразках значної кількості білків (3,4-7,4 мг/г сирої біомаси) та вуглеводних компонентів (2,7-16,2 мг/г сирої біомаси). За допомогою електрофорезу білкових складових DS-Na-екстрактів у досліджених штамів коринебактерій виявлено понад 20 індивідуальних біополімерів з M_m від 10,0 кДа до 120,0 кДа. Було встановлено, що білкові профілі досліджених культур характеризувались наявністю специфічного спектру поверхневих білків, який був властивий певному виду коринебактерій (мал.). Порівняльний аналіз білкових спектрів дозволив виявити у них спільні низькомолекулярні компоненти у зоні гелю, де локалізовані біополімери з M_m 19,5-17,5 кДа та 12,5-10,0 кДа.

Відомо, що поверхневі біополімери клітин, взаємодіючи з компонентами навколишнього середовища, можуть виконувати роль антигенних детермінант,



Мал. Електрофореграми препаратів поверхневих біополімерів клітинної стінки коринебактерій: 1 – маркерні білки; 2 – *C. glutamicum* УКМ Ас-714; 3 – *C. glutamicum* УКМ Ас-715; 4 – *C. glutamicum* УКМ Ас-733; 5 – *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610; 6 – *C. flavescens* УКМ Ас-611; 7 – *C. variabile* УКМ Ас-716; 8 – *C. variabile* УКМ Ас-717; 9 – *C. vitaeuginis* УКМ Ас-718; 10 – *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732; 11 – *Corynebacterium* sp. УКМ Ас-719.

відповідати за адгезію, зв'язування імуноглобулінів, бактеріофагів, а також за резистентність мікроорганізму до різних фізичних, хімічних та біологічних факторів. В якості медіаторів адгезії можуть виступати як асоційовані з клітиною, так і позаклітинні білки-лектини (гемаглютинини) [8;9]. Враховуючи те, що дані про наявність лектинів у непатогенних коринебактерій в літературі відсутні, наступним етапом роботи було визначення гемаглютинуючої активності в одержаних нами препаратах. Дослідження проводили з вільною від клітин культуральною рідиною, інтактними клітинами бактерій та DS-Na-препаратами, які включали DS-Na-екстракти та DS-Na-клітини. В якості контролю використовували буфер екстракції та культуральне середовище до інокуляції мікроорганізмами (таблиця).

У культуральній рідині гемаглютинуюча активність була виявлена лише у штамів *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610, *C. variabile* Ас-716, *Corynebacterium* sp. ІМВ

92. Для цих та інших досліджених культур, а саме *C. glutamicum* УКМ Ас-715, УКМ Ас-733, *C. flavescens* УКМ Ас-611, *C. variabile* УКМ Ас-717, *Corynebacterium* sp. УКМ Ас-719, ІМВ 14 та ІМВ 53 більш значна ГАА була зафіксована на поверхні інтактних клітин. Незалежно від наявності чи

Таблиця

Гемаглютинуюча активність препаратів досліджених штамів коринебактерій

Вид, штам	Титр ⁻¹ РГА						
	DS-Na буфер	Середовище	Культуральна рідина	Інтактні клітини	DS-Na-препарати		
					DS-Na-клітини		DS-Na-екстракти
					не відмиті від DS-Na	відмиті від DS-Na	
1	2	3	4	5	6	7	
<i>C. ammoniagenes</i> УКМ Ас-732	0	0	0	0	32	64	0
<i>C. glutamicum</i> : 22Л	0	0	0	0	256	512	0
ВНИИгенетика90	0	0	0	0	128	256	0
E531	0	0	0	0	128	512	0
УКМас-714	0	0	0	0	128	256	0
УКМ Ас-715	0	0	0	4	128	128	0
УКМ Ас-733	0	0	0	4	128	256	0
<i>C. flavescens</i> УКМ Ас-611	0	0	0	512	2048	2048	0
<i>C. terpenotabidum</i> УКМ Ас-610	0	0	4	16	64	128	0
<i>C. variabile</i> УКМ Ас-716	0	0	4	128	1024	2048	0
УКМ Ас-717	0	0	0	16	32	64	0
<i>C. vitaeruminis</i> УКМ Ас-718	0	0	0	0	512	1024	0
<i>Corynebacterium sp.</i> УКМ Ас-719	0	0	0	4	256	512	0
ІМВ 14	0	0	0	64	128	256	0
ІМВ 53	0	0	0	64	1024	2048	0
ІМВ 92	0	0	8	128	256	256	0

відсутності активності в інтактних клітинах, в препаратах клітин після їхньої обробки DS-Na активність різко зростала та сягала максимальних значень у клітин після екстракції, відмитих від DS-Na. У жодному із досліджених DS-Na-екстрактів ГАА не виявлена.

Таким чином, нами встановлено, що поверхневі біополімери непатогенних коринебактерій представлені компонентами глікотеїдної та білкової природи з M_m 10,0-120,0 кДа; гемаглютинини досліджених штамів локалізовані не на поверхні клітин, а у внутрішніх шарах клітинної стінки, про що свідчить наявність гемаглютинуючої активності в препаратах DS-Na-клітин та її відсутність в DS-Na-екстрактах.

Список літератури

1. Puech V., Chami M., Lemassu A. et al. Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane // *Microbiology* . – 2001. – Vol. 147. – P.1365-1382.
2. Михальський Л.О., Фуртат І.М., Буц О.Р. та ін. Аналіз електрофоретичних спектрів білків клітинної стінки *Corynebacterium diphtheriae* // *Дитячі інфекції*. – 2000. – № 27. – С. 34 –41.
3. Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH. Catalogue of strains. Fourth Ed. – 1989. – 459 p.
4. Михальський Л.О., Фуртат І.М., Дем'яненко Ф.П., Костючик А.А. Електрофоретичні спектри білків клітинної стінки як критерій для ідентифікації та класифікації непатогенних коринебактерій // *Укр. біохім. журн.* – 2001. – Т.73. – №3. – С. 61 –70.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г.Звягинцева. М: Изд-во МГУ, 1980. – 224 с.
6. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. - К.: Наукова думка, 1982. – С. 37.
7. Подгорский В.С., Коваленко Е.О., Симоненко И.А. Влияние факторов внешней среды на биосинтез лектинов *Bacillus mesentericus* // *Микробиол. журн.* – 1988. – Т.50, №2. – С.12 –16.
8. Карась С.Р., Касимова Д.Л., Костюкова Н.Н. Некоторые особенности адгезинов *Corynebacterium diphtheriae* // *Журн. микробиол.* – 1991. – №5. – С. 17 –18.
9. Костюкова Н.Н., Карась С.Р. Адгезивная активность дифтерийных штаммов в зависимости от особенностей вызываемого ими инфекционного процесса // *Журн. микробиол.* – 1991. – №5. – С. 24 –27.

Поступила в редакцию 15.04.2003 г.