

3. Schleifer K. H., Ehrmann M., Krusch U., Neve H. Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. // *Syst. Appl. Microbiol.* - 1991. - 14. - P. 386-388.
4. Ляковский Т. М., Подгорский В. С. Оценка пробиотиков, согласно рекомендациям международных организаций (FAO/WHO) // *Микроб. журн.* - 2005. - 67, № 6. - С. 104-112.
5. Parente E., Rota M. A., Ricciardi A. and Clementi F. Characterization of natural starter cultures used in the manufacture of pasta filata cheese in Basilicata (southern Italy) // *Int. Dairy J.* - 1997. - 7. - P. 775-783.
6. Аверина О. В., Лысенко А. М., Ермакова Л. М., Огай Д. К., Суходолец В. В. Сравнительное изучение гомологии ДНК у штаммов термофильных и мезофильных молочнокислых стрептококков различного происхождения // *Микробиология.* - 1998. - Т. 67, №6. - С. 792-798.
7. Лысенко А. М., Карпушина С. Г., Суходолец В. В. Дивергенция по гомологии ДНК среди отечественных штаммов *Streptococcus thermophilus* // *Микробиология.* - 1999. - Т. 68, №4. - С. 514-518.
8. Лысенко А. М., Ботина С. Г., Ганина В. И., Суходолец В. В. Дивергенция по уровню гибридизации ДНК и образование видов-двойников у молочнокислых бактерий *Streptococcus thermophilus* // *Микробиология.* - 2001. - Т. 70, №1. - С. 70-76.
9. Ботина С. Г., Лобанов А. О., Лысенко А. М., Суходолец В. В. Генетическое разнообразие штаммов молочнокислых термофильных бактерий на территории СНГ // *Биотехнология.* - 2004. - № 2. - С. 3-12.
10. Ботина С. Г., Лысенко А. М., Суходолец В. В. Выяснение таксономического положения отечественных штаммов термофильных молочнокислых бактерий по данным секвенирования генов 16S рРНК // *Микробиология.* - 2005. - Т. 74, №4. - С. 520-525.
11. Tilsala-Timisjärvi A., and Alatossava T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int. J. Food Microbiol.* - 1997. - 35. - P. 49-56.
12. Ke D., Picard F. J., Martineau F., Menard C., Roy P. H., Ouellette M., and Bergeron M. G. Development a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* - 1999. - 37, N 11. - P. 3497-3503.
13. Jackson C. R., Fedorka-Cray, and Barrett J. B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci // *J. Clin. Microbiol.* - 2004. - 42, N 8. - P. 3558-3565.

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ САПРОФИТНЫХ ВИДОВ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

Фуртат И. М.¹, Ногина Т.М.², Ткачева Д.Л.³

¹Национальный университет «Киево-Могилянская Академия», Киев, Украина, e-mail: furtat@ukma.kiev.ua

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины, Киев, Украина,
e-mail: nogina@serv.imv.kiev.ua

³ООО "Синво-Украина", Киев, Украина

Современная классификация бактерий рода *Corynebacterium*, как и других микроорганизмов, основывается на использовании методов полифазной таксономии, предполагающей проведение комплексного изучения фенотипических, генотипических и филогенетических признаков исследуемых объектов. Возможность использования для этих целей методов иммунохимического анализа ограничена в связи с недостаточной изученностью антигенных свойств коринебактерий, исследованию которых посвящена данная работа.

В работе использованы штаммы коринебактерий из Украинской коллекции микроорганизмов (УКМ) Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины: *C. glutamicum* УКМ Ас-733; *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610^{Тип}, *C. flavesces* УКМ Ас-611^{Тип}, *C. variabile* УКМ Ас-717^{Тип} и УКМ Ас-716, *C. vitaeruminis* УКМ Ас-718^{Тип} и *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732^{Тип}, а также 22 свежевыделенных из различных природных и производственных субстратов штамма актинобактерий которые предварительно на основании исследования физиолого-биохимических и хемотаксономических признаков отнесены нами к роду *Corynebacterium*.

Изучение антигенных свойств интактных клеток и поверхностных биополимеров клеточных стенок (КС) коринебактерий проводили методом иммуноферментного анализа (ELISA). В работе использовали охарактеризованные нами ранее иммунные сыворотки, специфичные к интактным клеткам *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610, *C. flavesces* УКМ Ас-611, *C. variabile* УКМ Ас-717, *C. vitaeruminis* УКМ Ас-718, *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 и *C. glutamicum* УКМ Ас-733, которые соответственно обозначали как: анти-610, анти-611, анти-717, анти-718, анти-732 и анти-733 [1, 2]. Для сравнительного анализа и определения антигенного родства коринебактерий использовали компьютерную программу, с помощью которой рассчитывали коэффициент R, характеризующий степень антигенного подобия коллекционных штаммов и изолятов. Значение коэффициента R было равно 0 в

гомологичной системе антиген-антитело, тогда как $R=1$ – у наиболее отдаленных между собой штаммов [3]. Поверхностные биополимеры клеточных стенок (ПБКС) экстрагировали из интактных клеток буферным раствором, содержащим 1% ДДС-Na (Sigma, США), pH 4.5 как описано в [4]. Полученный гомогенат центрифугировали (8 тыс. об/мин), в результате чего получали препараты ПБКС – содержащиеся в супернатанте растворимые в ДДС-Na поверхностные биополимеры КС. Предварительно разделенные с помощью электрофореза в системе ПААГ-ДДС-Na по Laemmli, препараты ПБКС, переносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”, США) и проводили иммуноэлектроблоттинг по методу Towbin [5].

Ранее при изучении антигенных свойств коллекционных штаммов непатогенных видов коринебактерий, в частности *C. glutamicum*, *C. ammoniagenes*, *C. vitaeruminis*, *C. variabile*, *C. terpenotabidum* и *C. flavescens* нами было показано, что представители этих видов отличались между собой не только иммуногенностью, но и степенью серологического родства. Было установлено, что значения коэффициента $R = 0-0.4$ характеризуют штаммы, принадлежащие к одному виду, $R = 0.5-0.6$ – характерен для близкородственных видов, тогда как $R > 0.6$ свидетельствует о низком уровне антигенного родства между штаммами. У культур, которые существенно отстоят от гомологичного штамма, значения коэффициента R изменяются в пределах 0.85-1.0 [1,2]. Указанные различия между представителями разных видов обусловлены наличием на поверхности клеток специфического набора индивидуальных антигенов преимущественно белковой природы. Поэтому, с целью получения более объективных результатов, для изучения антигенных свойств коринебактерий мы использовали не только интактные клетки, но и препараты ПБКС.

Изучение антигенных свойств интактных клеток и препаратов ПБКС с использованием анти-718- и анти-733-сывороток позволило установить, что все исследованные изоляты коринебактерий существенно отличались от коллекционных штаммов *C. vitaeruminis* УКМ Ас-718 и *C. glutamicum* УКМ Ас-733 ($R = 0.9-1.0$). Только у штамма ИМВ-93 присутствовал ряд антигенов общих с *C. glutamicum* УКМ Ас-733, о чем свидетельствует достаточно высокое значение коэффициента R , равное 0.7. В реакции с анти-610-сывороткой некоторые штаммы (например, ИМВ-14, ИМВ-91, ИМВ-92, ИМВ-102, ИМВ-126, ИМВ-127, ИМВ-132) проявляли слабые антигенные связи с типовым штаммом *C. terpenotabidum* УКМ Ас-610. Коэффициент подобия R для интактных клеток и препаратов ПБКС этих штаммов был равен, 0.55-0.65 и 0.68-0.84, соответственно. При этом у остальных штаммов этот показатель имел значение 0.69-0.84 для интактных клеток и 0.85-0.90 – для препаратов ПБКС. Таким образом, полученные результаты подтверждают данные исследования физиолого-биохимических свойств изученных штаммов, которые свидетельствуют об отсутствии среди изолятов представителей видов *C. terpenotabidum*, *C. vitaeruminis* и *C. glutamicum*.

При использовании анти-717-сыворотки было установлено, что большинство исследованных культур также не могут быть отнесены к виду *C. variabile*, поскольку интенсивность взаимодействия интактных клеток и препаратов ПБКС с указанной видоспецифической сывороткой была очень низкой – значения коэффициента R у них варьировало в пределах 0.8-1.0. Исключение составили штаммы ИМВ-7 и ИМВ-53, из которых наивысшую степень подобия к типовому штамму *C. variabile* УКМ Ас-717 проявлял ИМВ-53 ($R = 0.20$ и 0.58 для интактных клеток и препарата ПБКС, соответственно). Для штамма ИМВ-7 значение коэффициента R (0.46) для интактных клеток и препаратов ПБКС имело промежуточное значение между критериями, определяющими родственные или близкородственные виды. Вместе с тем результаты предыдущих исследований свидетельствуют о том, что в пределах вида (например, *C. glutamicum*) может существовать некоторая антигенная гетерогенность [1, 2]. Поэтому для окончательного подтверждения правомерности отнесения штаммов ИМВ-7 и ИМВ-53 к виду *C. variabile* мы провели сравнительный анализ состава индивидуальных антигенов указанных изолятов и коллекционных штаммов этого вида. Методом иммуноблоттинга было показано, что между отдельными штаммами указанного вида также может наблюдаться антигенная гетерогенность. Так, не все антигены (например, имеющие молекулярную массу 27.0 и 67.0 кДа), выявляемые у штамма *C. variabile* УКМ Ас-717, присутствовали у *C. variabile* УКМ Ас-716. Выявлено, что по составу индивидуальных антигенов штамм ИМВ-53 был более сходен с *C. variabile* УКМ Ас-717, тогда как штамм ИМВ-7 – с *C. variabile* УКМ Ас-716. Кроме того, у штаммов ИМВ-53, УКМ Ас-717 и УКМ Ас-716 с помощью анти-717 сыворотки обнаружено значительное количество общих антигенов с молекулярными массами от 14.0 кДа до 62.0 кДа, среди которых иммунодоминантными были антигены с молекулярными массами 21.0 кДа и 31.0 кДа. Интересно отметить, что у штамма ИМВ-53, в отличие от типового штамма *C. variabile* УКМ Ас-717, антигены с молекулярными массами 18.0 кДа и 23.0 кДа были мажорными. У штамма ИМВ-7 количество общих с типовым штаммом антигенов было несколько меньше. Так, у этого штамма в качестве минорных, по сравнению со штаммами ИМВ-53 и

C. variabile УКМ Ас-717, были представлены антигены с молекулярными массами 14.0, 15.0, 21.0, 25.0, 31.0, 38.0, 42.0, 48.0 и 52.0 кДа. Таким образом, результаты иммуноблотинга согласуются с данными, полученными при использовании метода ELISA, на основании которых установлено, что штамм ИМВ-53 наиболее близок к виду *C. variabile*, а уточнение видовой принадлежности штамма ИМВ-7 требует проведения дополнительных исследований.

При изучении антигенного сходства исследованных штаммов с использованием сыворотки анти-611 наивысшую степень родства с типовым видом *C. flavescens* УКМ Ас-611 выявляли в интактных клетках и препарате ПБКС штамма ИМВ-126 ($R = 0.40$ и 0.38 , соответственно). Некоторые различия между интактными клетками и препаратами ПБКС наблюдали у штамма ИМВ-56, у которого было зафиксировано наивысшее значение коэффициента подобия для интактных клеток ($R = 0.30$), а для препаратов ПБКС – $R = 0.54$. У штамма ИМВ-65 высокую степень подобия регистрировали в препарате ПБКС ($R = 0.36$), тогда как коэффициент R для интактных клеток был равен 0.79 . Для окончательного подтверждения правомерности отнесения изолятов ИМВ-56, ИМВ-65, ИМВ-126 к виду *C. flavescens* необходимо проведение дальнейших исследований с привлечением других фенотипических признаков.

Анализ взаимодействия изолятов с анти-732-сывороткой позволил установить, что наиболее близким к типовому штамму *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 был штамм ИМВ-89 ($R = 0.2$ для интактных клеток и препаратов ПБКС). Такая же высокая степень антигенного подобия выявлена у изолятов ИМВ-102 и ИМВ-114 в реакции ELISA при взаимодействии с указанной сывороткой препаратов ПБКС ($R = 0.3$ и 0.2 , соответственно), вместе с тем, значения коэффициента R были несколько выше для интактных клеток. Как близкородственные виды с этой сывороткой реагировали изоляты ИМВ-14, ИМВ-92 ($R = 0,6$). Изоляты ИМВ-65, ИМВ-91, ИМВ-93, ИМВ-100, ИМВ-131 и ИМВ-132 проявляли слабые антигенные связи с *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 ($R = 0.7-0.8$), тогда как остальные изученные штаммы коринебактерий по антигенным свойствам существенно отличались от типового штамма этого вида (рисунок)

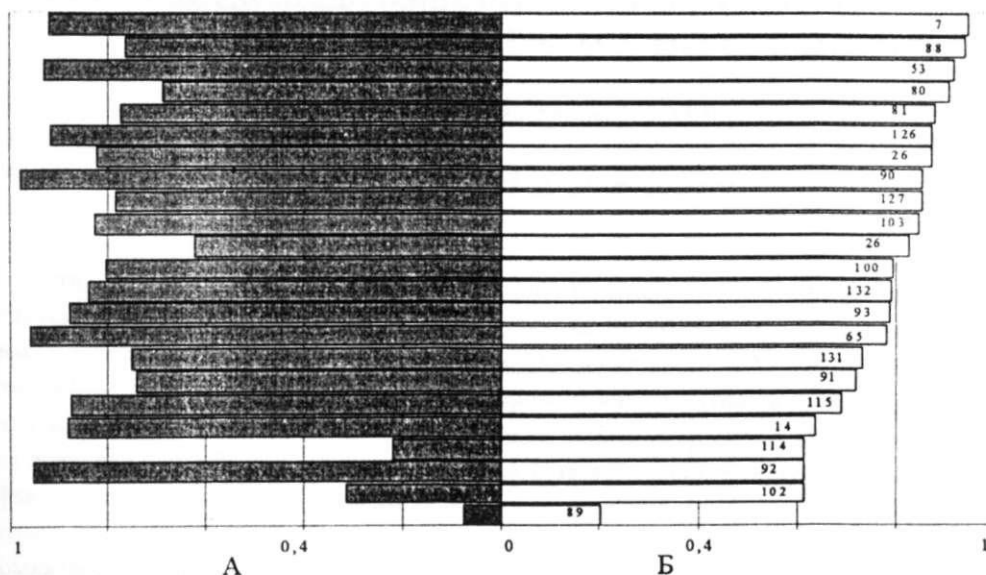


Рисунок. Степень антигенного подобия исследованных изолятов с типовым штаммом *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732, определенная в реакции с анти-732-сывороткой: А – препараты ПБКС; Б – интактные клетки

Учитывая некоторые отличия, выявленные с помощью иммуноферментного анализа, мы изучили состав индивидуальных антигенов изолятов ИМВ-89, ИМВ-102 и ИМВ-114 методом иммуноблотинга и сравнили его с таковым типового штамма *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732. Нами установлено, что штаммы ИМВ-89, ИМВ-102 и *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732 имеют общие антигены с молекулярными массами 52.0 кДа (доминирует у ИМВ-89) и 49.0 кДа (доминирует у УКМ Ас-732), причем наибольшее количество антигенов с помощью анти-732 сыворотки выявлено у штамма ИМВ-89. Эти данные согласуются с результатами ELISA, в соответствии с которыми у штамма ИМВ-89 была зафиксирована максимальная интенсивность реакции и свидетельствуют о значительном уровне сходства этого штамма по антигенным свойствам с типовым штаммом *C. ammoniagenes* УКМ Ас-732. У штамма ИМВ-102, кроме антигена с молекулярной массой 52.0 кДа, был обнаружен общий с

C. ammoniagenes УКМ Ас-732 антиген с молекулярной массой 42.0 кДа. У штамма ИМВ-114 идентифицировано всего 3 антигена (42.0 кДа, 41.0 кДа и 38.0 кДа), причем все они были минорными.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что антигенные свойства коринебактерий могут быть использованы в комплексе признаков для видовой диагностики этих микроорганизмов. Сравнительный анализ антигенных свойств интактных клеток коринебактерий и препаратов ПКБС показал, что при проведении подобных исследований достаточно использовать для анализа указанные препараты поверхностных биополимеров клеточных стенок.

Список литературы

1. Фуртат И.М., Ногіна Т.М., Михальський Л.О., Веденеева О.А. Серологічні властивості неспатогенних видів коринебактерій // Мікробіол. журн. – 2002. – Т. 64, №1. – С. 66 – 76.
2. Фуртат И.М., Михальський Л.А., Зубарева А.В., Горбатько Л.А. Антигенные свойства *Corynebacterium flavescens* и *Corynebacterium terpenotabidum* и их серологическое родство с другими непатогенными представителями рода // Матлы Междуна. Конф. "Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии", 28 мая 2004 г., Минск, Беларусь. – 2004. – С.35-36.
3. Михальський Л.О., Фуртат И.М., Ногіна Т.М. Веденеева О.А. Використання комп'ютерного аналізу для оцінки антигенних взаємозв'язків різних видів коринебактерій // Наукові записки НаУКМА. – К.: Видавничий дім "KM Academia", 2001. – Т. 19. – Ч. II. – С. 401 – 405.
4. Михальський Л.О., Фуртат И.М., Дем'яненко Ф.П., Косточик А.А. Електрофоретичні спектри білків клітинної стінки як критерій для ідентифікації та класифікації неспатогенних коринебактерій // Укр. біохім. журн. – 2001. – Т.73, №3. – С. 61-70.
5. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications// Proc. Nat. Sci.USA. -1979. -V. 76, №9. - P. 4350 – 4354.

ВЕРТИКАЛЬНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОКАРИОТИЧЕСКОГО ФОТОТРОФНОГО ПЛАНКТОНА В МЕРОМИКТИЧЕСКОМ ГОРОДСКОМ ПРУДУ

Горбунов М.Ю., Уманская М.В.

Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти, Россия, e-mail: myugor@pochta.ru

Развитие анаэробных фототрофных бактерий в водной толще озер требует присутствия восстановленных неорганических соединений и отсутствия кислорода, и может происходить только в анаэробных слоях стратифицированных водоемов. Особенно многочисленны популяции анаэробных фототрофных бактерий обнаруживаются в меромиктических (биоанізотропных) водоемах, в которых стратификация водной толщи носит долговременный характер [1-5]. Состав и вертикальная структура анаэробного фототрофного планктона в таких озерах различны и зависят от сочетания многих факторов. Как правило, в них развиваются как пурпурные (*Chromatiaceae*), так и зеленые серные бактерии (*Chlorobiaceae*), но в некоторых озерах отмечены бактерии только одной из этих групп. Для меромиктических водоемов характерна также резкая неоднородность в вертикальном распределении планктонных организмов вообще.

Нами было исследовано вертикальное распределение фототрофных бактерий в небольшом городском водоеме с меромиктическим характером перемешивания - Нижнем пруду Самарского Ботанического сада.

Исследования проводили ежемесячно в период открытой воды 2004 г., а также с мая 2005 по май 2006 года. Пробы воды отбирали батометром Рутнера в наиболее глубокой части пруда, через каждые 0,5 м от поверхности до глубины 4,5 м. Общую численность и биомассу бактерий определяли на мембранных фильтрах Владипор [6]. Численность фототрофных бактерий (цианобактерии, зеленые серные бактерии, пурпурные серные бактерии) определяли методом прямого счета под микроскопами МБИ-6 и Люмам Р8. Концентрацию фотосинтетических пигментов определяли, как описано ранее [7].