

И. Б. Ившина

БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ «МИКРОБИОЛОГИЯ»

*Допущено Учебно-методическим объединением
по классическому университетскому образованию
в качестве учебного пособия
для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по направлению 020400.62 «Биология»
(профиль «Микробиология»)*



Санкт-Петербург
2014

УДК 579.2+579.8(57.06)
ББК 28.4
И17

Рецензенты:

д-р биол. наук, проф., чл.-корр. РАН
В. В. Михайлов,
д-р мед. наук, проф., засл. деят. науки РФ
Э. С. Горвиц

Ившина, И. Б.
И17 Большой практикум «Микробиология»: учебное пособие / И. Б. Ившина. — СПб.: Проспект Науки, 2014. — 112 с.
ISBN 978-5-903090-97-6

Содержит лабораторные работы по определению систематического положения прокариотных организмов. Описаны методы современной полифазной таксономии. Рассмотрены способы определения хемотаксономических характеристик бактерий (тип клеточной стенки, компоненты свободных полярных и неполярных липидов, чувствительность к антибиотикам и др.). Изложены принципы и методы иммунодиффузионного и иммунофлуоресцентного анализа, позволяющие проводить экспрессную идентификацию бактерий на основе их антигенных характеристик. Охарактеризованы уровни таксономического разрешения изложенных методов дифференциации бактерий.

Предназначено для студентов вузов, будет полезно биологам и специалистам в смежных областях знаний.

УДК 579.2+579.8(57.06)
ББК 28.4

ISBN 978-5-903090-97-6

© И. Б. Ившина, 2014
© ООО «Проспект Науки», 2014

Содержание

Список принятых сокращений	6
Предисловие	7
Введение	9
1. Хемотаксономические признаки	12
1.1. Хемотип клеточной стенки	13
ЗАДАЧА I. Установление хемотипа клеточных стенок коринеформных и нокардиоформных актинобактерий	15
Занятие 1. Определение моносахаридного состава гидролизатов целых клеток	15
Занятие 2. Определение изомеров диаминопимелиновой кислоты в гидролизатах клеток	18
1.2. Липидный состав клеток	21
ЗАДАЧА II. Количественное определение неочищенных суммарных липидов	26
Занятие 3. Определение общего содержания липидов гравиметрическим методом	26
ЗАДАЧА III. Таксономическая специфичность состава жирных кислот бактериальных клеток	27
Занятие 4. Определение свободных жирных кислот у бактерий	29
1.3. Свободные миколовые кислоты	32
ЗАДАЧА IV. Установление типа миколовых кислот у коринеформных и нокардиоформных актинобактерий	34
Занятие 5. Определение свободных миколовых кислот методом тонкослойной хроматографии метанолизатов целых клеток	34
1.4. Фосфолипиды бактерий	37
ЗАДАЧА V. Таксономическая специфичность фосфолипидов бактериальных клеток	39
Занятие 6. Определение типа фосфолипидов актинобактерий	39

1.5. Менахиноны бактерий	42
ЗАДАЧА VI. Таксономическая специфичность менахинонов	42
Занятие 7. Выявление менахинонов у актинобактерий	42
1.6. Чувствительность к антибиотикам	44
ЗАДАЧА VII. Выявление уровня антибиотикочувствительности коринеформных и нокардиоформных актинобактерий	46
Занятие 8. Определение чувствительности бактерий к антибиотическим веществам дискодиффузионным методом	46
Занятие 9. Идентификация непатогенных актинобактерий на основе анализа антибиограмм с использованием программы <i>Identification</i>	49
2. Иммунохимический анализ.	55
2.1. Иммунодиффузионный анализ	56
ЗАДАЧА VIII. Идентификация актинобактерий с использованием иммунодиффузионного метода	58
Занятие 10. Идентификация актинобактерий методом двойной иммунодиффузии в агаровом геле по Оухтерлони	58
2.2. Иммунофлуоресцентный анализ	61
ЗАДАЧА IX. Детекция и идентификация актинобактерий с использованием иммунофлуоресцентного метода	67
Занятие 11. Иммуноиндикация нокардиоформных актинобактерий в чистой культуре с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител.	67
Занятие 12. Выявление и дифференциация родококков в составе смешанных популяций непрямым методом флуоресцирующих антител	72
Словарь	79
Указатель латинских названий	90
Рекомендуемая литература	92
Приложение 1. Способ получения культур из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов	95
Приложение 2. Наборы коллекционных бактериальных культур для обеспечения практических занятий	98
Приложение 3. Получение видоспецифических поликлональных иммунных сывороток	100

Приложение 4. Количественное определение общего белка по методу Лоури–Фолина.	102
Приложение 5. Правила работы с дозаторами (пипетками) переменного объема	104
Приложение 6. Средства для мытья лабораторной посуды	105
Приложение 7. Средства для обработки рабочего стола	106
Приложение 8. Обработка предметных стекол	106
Приложение 9. Методические инструкции по подготовке исследовательского отчета по лабораторной работе	107

Список принятых сокращений

ДАПК	– Диаминопимелиновая кислота
МПА	– Мясопептонный агар
МПБ	– Мясопептонный бульон
нМФА	– Непрямой метод флуоресцирующих антител
<i>C.</i>	– <i>Corynebacterium</i>
<i>D.</i>	– <i>Dietzia</i>
<i>G.</i>	– <i>Gordonia</i>
<i>LL-A₂pm</i>	– <i>LL</i> -диаминопимелиновая кислота
<i>meso-A₂pm</i>	– <i>meso</i> -диаминопимелиновая кислота
<i>M.</i>	– <i>Mycobacterium</i>
<i>Micr.</i>	– <i>Microbacterium</i>
<i>N.</i>	– <i>Nocardia</i>
<i>R.</i>	– <i>Rhodococcus</i>

Предисловие

Пособие служит руководством к лабораторным занятиям по дисциплине «Большой практикум „Микробиология“». В нем приведены отдельные задачи лабораторного практикума, касающиеся определения систематического положения прокариотных организмов. Дано описание части методов современной полифазной таксономии. Рассмотрены способы определения хемотаксономических характеристик бактерий (тип клеточной стенки, компоненты свободных полярных и неполярных липидов, чувствительность к антибиотикам и др.). Изложены принципы и методы иммунодиффузионного и иммунофлуоресцентного анализа, позволяющие проводить экспрессную идентификацию бактерий на основе их антигенных характеристик. Охарактеризованы уровни таксономического разрешения изложенных методов дифференциации бактерий.

В каждой лабораторной работе кратко обоснована цель исследования, описаны техника и методика постановки опыта, дан анализ полученных результатов, перечень необходимых материалов и оборудования для проведения эксперимента. Изложение методов дополнено сводными таблицами, схемами и рисунками, позволяющими легко ориентироваться в материале и необходимыми для выполнения заданий. Кратко изложены основные теоретические вопросы по каждой рассматриваемой теме. Предлагаемая форма изложения делает практикум доступным для самостоятельной практической работы студентов. Предлагаемые экспериментальные работы могут быть использованы не только на практикуме по микробиологии, но и при проведении научных исследований по курсовым и выпускным проектам студентов.

В задачах лабораторного практикума применяются наборы штаммов бактерий, предоставляемые безвозмездно для образовательных целей Региональной профилированной коллекцией алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, номер 768 во Всемирной федерации коллекций культур, *World Federation for Culture Collections — WFCC*, www.wfcc.info), а также реагенты и среды, широко используемые в отечественных бактериологических лабораториях, что делает учебное пособие доступным для любого университета Российской Федерации. Задачи практикума содержат минимум теоретических знаний, достаточный для проведения экспериментов, но не освобождающий студентов от чтения рекомендованной специальной литературы, необходимой для критической оценки и обработки полученных результатов.

Лабораторный практикум направлен на приобретение студентами навыков экспериментальной работы, использования измерительных

приборов и лабораторного аналитического оборудования, критической оценки и интерпретации полученных результатов, а также составления исследовательского отчета. Практикум построен в соответствии с требованиями ФГОС «Биология», не повторяет работы в изданных ранее учебных пособиях по микробиологии, содержит избранные лабораторные работы, которые позволяют студентам бакалавриата и магистратуры освоить методики проведения ведущих хемотаксономических тестов для идентификации бактерий. Предлагаемые лабораторные работы отвечают современным требованиям подготовки специалистов-микробиологов.

Введение

Стремительное развитие современной микробиологии и тесно связанной с ней биотехнологии предъявляет строгие требования к методам анализа их основного объекта — микробной клетке. Эти требования касаются всех без исключения уровней организации микроорганизмов — молекулярного и клеточного, биоценотического и популяционного. Особо важная роль принадлежит методам индикации и диагностики живых микроорганизмов, а также количественного определения их в смешанных микробных популяциях, разнообразных природных и искусственных субстратах и материалах.

В настоящее время приходится констатировать, что до сих пор существует значительный разрыв между современной таксономией, основанной на полифазном (интегрированном использовании различной информации о микроорганизмах, полученной с помощью молекулярно-биологических, химических и нумерических методов) подходе (*Vandamme et al.*, 1996), и практической идентификацией микроорганизмов. Число экспрессных, простых и надежных диагностических тестов, доступных исследователю для очертания бактерий различных иерархических уровней, невелико. До недавнего времени для классификации и идентификации прокариотных организмов использовали в основном морфологические и культуральные признаки, варьирующие в зависимости от состава среды, на которой выращивается микроорганизм, скорости его роста, возраста, длительности культивирования и ряда других факторов. Использование морфологических и культуральных характеристик в значительной степени ограничивается не только их изменчивостью в зависимости от названных факторов, но и сходством по ним представителей многих таксонов.

Так, на основании морфологии, культуральных и отдельных биохимических свойств чрезвычайно сложно разграничить актиномицеты — грамположительные бактерии с высоким (более 50 мол.%) содержанием Г+Ц-пар в ДНК, выделяющиеся среди других бактерий наибольшим морфологическим разнообразием и отнесенные (*Stackebrandt et al.*, 1997) на основании молекулярно-биологических исследований к новому классу *Actinobacteria*, таксономическому типу *Actinobacteria*.

Основные таксономические категории, применяемые при классификации актинобактерий, такие же, что и у других бактерий. «*Species*» («вид») может иметь подвиды «*Subspecies*» — «*Genus*» («род») — «*Familia*» («семейство») — «*Ordo*» («порядок»), «*Subordo*» («подпорядок») — «*Classis*» («класс»), «*Subclassis*» («подкласс») — «*Phylum*» («тип») — «*Domain*»

(«домеи»). По-английски — *Species, Subspecies — Genus — Family — Order, Suborder — Class, Subclass — Phylum — Domain*. По последним данным, таксономический тип *Actinobacteria*, занимающий по объему третье место в домене *Bacteria*, включает 10 порядков, 17 подпорядков, 58 семейств и более 300 родов (<http://www.bacterio.cict.fr>). Операционной же единицей является штамм. Штамм (от немецкого *stamm*, буквально — род, племя, по-английски — *strain*) — чистая культура бактерий, изолированная в определенное время в определенном месте. Штамм не является таксономической категорией, один и тот же штамм не может быть выделен второй раз из того же источника в другое время. Большинство видов описано по многим штаммам, один из которых обозначается типовым (это обязательно). Некоторые бактерии описаны по одному штамму, который и является, естественно, типовым. Записывается это так — *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 70^Г.

Актинобактерии (в прежнем понимании термина — актиномицеты, представители порядка *Actinomycetales*) являлись и остаются предметом пристального внимания исследователей. В первую очередь, это связано с тем беспрецедентным количеством разнообразных биологически активных соединений, которые эти бактерии синтезируют. Свыше половины из более чем 10 000 зарегистрированных к настоящему времени биологически активных соединений продуцируются актинобактериями (*Anderson, Wellington, 2001*).

Многие представители коринеформных и нокардиоформных актинобактерий, в частности принадлежащие к родам *Corynebacterium, Dietzia, Gordonia, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus, Tsukamurella*, разлагают труднодоступные для других микроорганизмов природные полимеры и ксенобиотики. Велико значение данных актинобактерий в восстановлении плодородия почв, очистке окружающей среды от загрязнений.

Особое место среди актинобактерий занимают представители *Rhodococcus* spp., биологическая уникальность которых — способность ассимилировать в качестве единственных источников углеродного питания, наряду с жидкими, газообразные углеводороды (пропан, *n*-бутан). В настоящее время реально использование газоокисляющих родококков в качестве биокатализаторов в тонком органическом синтезе, высокоэффективных биосинтетиков белка на основе углеводородных газов и биологических индикаторов углеводородных залежей. Родококки являются уникальными источниками иммуномодуляторов, биополимеров, витаминов, специфических ферментных систем, а также агентами химической трансформации.

Бесспорно, что все вопросы, связанные с прикладными аспектами изучения микроорганизмов, требуют четкого определения таксономической принадлежности практически ценных культур. Для установления принадлежности бактерий к определенному роду, виду необходимо

использование объективных дифференцирующих тестов, хорошо воспроизводимых при практической диагностике и определяемых доступными методами. Для дифференциации сложных в таксономическом отношении групп бактерий нет единого «золотого стандарта». Методы генетического анализа, требующие использования дорогостоящих реагентов и оборудования, доступны еще далеко не для каждой университетской лаборатории. Для различения истинных актинобактерий (*actinobacteria proper*) и других групп бактерий эффективным оказывается применение методов хемотаксономического и иммунохимического анализа, поскольку эти методы адекватные, недорогие, легкодоступные и относительно просты в исполнении. Как показывает практика, группирование бактериальных штаммов на уровне вида и рода по хемотаксономическим и иммунохимическим критериям согласуется с результатами геносистематической классификации на основании данных сравнительного анализа последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК.

В работе по идентификации бактерий необходимо соблюдать следующие правила: использовать только чистые культуры бактерий, находящиеся в активном физиологическом состоянии, применять для выявления признаков стандартные методы.

Список литературы

- Anderson A. S., Wellington E. M. H. The taxonomy of Streptomyces and related genera // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. — 2001. — Vol. 51. — P. 798–814.*
- Stackebrandt E., Rainey F. A., Ward-Rainey N. L. Proposal for a new hierarchical classification system, Actinobacteria classis nov. // Int. J. Syst. Bacteriol. — 1997. — Vol. 47. — P. 479–491.*
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial classification // Microbiol. Rev. — 1996. — Vol. 60. — P. 407–438.*

1. ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ

Хемотаксономия (вначале обозначалась термином «микроморфология») играет исключительно плодотворную роль в систематике и идентификации тех групп прокариотных организмов (актинобактерий, в частности), у которых морфологические и физиологические характеристики широко варьируются и недостаточны для проведения их удовлетворительной идентификации. Своим успехом она в значительной степени обязана простым и быстрым количественным и качественным анализам химического состава клеточной стенки и липидов этих микроорганизмов.

Одним из преимуществ хемотаксономических методов является то, что при их использовании не требуется углубленного и обычно длительного изучения специфических особенностей развития организмов, их жизненных циклов. Специалист в данном случае может ограничиться знанием условий получения доброкачественной биомассы, необходимые количества которой очень незначительны. Работа по изучению хемотаксономических признаков актинобактерий не связана с какими-либо специальными приемами. Они должны быть выращены на питательных средах и в условиях, обеспечивающих быстрый и хороший рост культуры.

Следует помнить: как правило, биомассу бактерий собирают в конце экспоненциальной или в начале стационарной фазы роста.

Использование хемотаксономических признаков является определяющим фактором при разработке новых концепций в систематике актинобактерий и обосновании выделения новых таксонов данной группы микроорганизмов.

Ниже рассматриваются основные хемотаксономические признаки: «хемотип клеточной стенки», предусматривающий определение аминокислотного и моносахаридного состава клеток; «свободные миколовые кислоты» или «тест *LCN-A*»; «липиды», «свободные жирные кислоты», «менахиноны», «фосфолипиды» и др.

Следует помнить: для получения воспроизводимых результатов идентификации бактерий требуются высоко стандартизированные процедуры.

1.1. Хемотип клеточной стенки

Определение состава клеточной стенки традиционно считается важным для грамположительных бактерий. Наиболее подробно первоначальные представления о типах клеточных стенок микроорганизмов изложены в обзорах Лешевалье с соавт. (*Lechevalier, Lechevalier, 1970; Lechevalier et al., 1971*). К настоящему времени описано 9 разных типов клеточной стенки бактерий (цит. по *Ward, Bara, 2009* с дополнениями). Каждый из них характерен для представителей определенного таксона бактерий. Наборы дифференцирующих сахаров в клетках обозначаются как типы сахаров (*A, B, C, D*).

Уникальна и необычайно сложна по структуре клеточная стенка у актинобактерий группы «*mycolata*» («миколосодержащие»), в состав которой входят представители *Corynebacterium, Dietzia, Mycobacterium, Nocardia, Rhodococcus, Skermania, Tsukamurella*. К муреиновому саккулусу (лат. *sacculus* — сферический мешочек) ковалентно присоединен полисахарид арабиногалактан, этерифицированный миколовыми кислотами. В результате образуется некая матрица пептидогликан — арабиногалактан — миколовые кислоты, так называемый «тройственный муреинмиколиларабиногалактановый саккулус» (цит. по *Sutcliffe et al., 2010*).

В клеточной стенке актинобактерий с окислительным типом метаболизма содержится диаминопимелиновая кислота. Эта кислота имеет три изомерные формы и легко обнаруживается в гидролизатах целых клеток. Два ее изомера (*LL-* и *мезо-*) имеют таксономическое значение и дифференцируются с помощью восходящей бумажной хроматографии.

Ниже представлены возможные хемотипы клеточных стенок бактерий.

I тип клеточной стенки предполагает наличие *LL*-формы диаминопимелиновой кислоты (ДАПК, *LL-A₂pm*) и глицина. Диагностические сахара отсутствуют. Характерен для представителей *Streptomyceae, Nocardioideae*.

II тип клеточной стенки предполагает наличие *мезо*-ДАПК (*meso-A₂pm*) и/или иногда *гидроксид*-ДАПК (*hydroxyl-A₂pm*) и глицина или ксилозы и арабинозы (тип сахаров *D*). Характерен для представителей *Micromonosporineae*.

III^A тип клеточной стенки предполагает наличие *мезо*-ДАПК и мадуры (3-*O*-метил-*D*-галактозы) (тип сахаров *B*). Характерен для представителей *Dermatophilaceae, Frankiaceae, Streptosporangiaceae*.

III^B тип клеточной стенки предполагает наличие *мезо*-ДАПК и отсутствие мадуры (тип сахаров *C*). Характерен для представителей *Actinosynnemataceae, Brevibacteriaceae, Thermomonosporaceae*.

IV^A тип клеточной стенки предполагает наличие мезо-ДАПК, арабинозы, галактозы (тип сахаров А) и миколовых кислот. Характерен для представителей *Corynebacterineae*.

IV^B тип клеточной стенки предполагает наличие мезо-ДАПК, арабинозы и галактозы (тип сахаров А). Характерен для представителей *Pseudonocardiaceae*.

V тип клеточной стенки предполагает наличие лизина и орнитина. Характерен для представителей *Actinomyces israelii*.

VI тип клеточной стенки предполагает наличие лизина, иногда аспарагиновой кислоты, галактозы. Характерен для представителей *Microbacterium*, *Oerskovia*.

VII тип клеточной стенки предполагает наличие 2,4-диаминомасляной кислоты, глицина, иногда лизина. Характерен для представителей *Agromyces*, *Clavibacter*.

VIII тип клеточной стенки предполагает наличие орнитина. Характерен для представителей *Bifidobacterium*, *Cellulomonas*, *Curtobacterium*.

IX тип клеточной стенки предполагает наличие LL- и мезо-ДАПК, галактозы и глицина. Характерен для представителей *Kitasatosporia*.

Большинство актинобактерий имеют I, II, III или IV хемотип клеточной стенки, которые легко установить путем определения в гидролизатах целых клеток изомеров ДАПК и дифференцирующих сахаров, минуя трудоемкий процесс получения препаратов клеточных стенок.

Качественный состав дифференцирующих компонентов бактериальных клеток — стабильный признак, не зависящий от среды и условий культивирования микроорганизмов. Выявление диагностических диаминокислот и основных сахаров бактериальных клеток осуществляется с использованием метода бумажного хроматографического анализа. Фильтровальная бумага является носителем неподвижной фазы, а система растворителей — подвижной фазой, которая перемещается на хроматограмме под действием капиллярных сил.

Таксономическое значение придается компонентам, присутствующим в больших количествах, минорные компоненты не используются. Оценка носит качественный характер.

Список литературы

Lechevalier M. P., Lechevalier H. A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes // *Int. J. Syst. Bacteriol.* — 1970. — Vol. 20. — P. 435–443.

Lechevalier H. A., Lechevalier M. P., Gerber N. N. Chemical composition as a criterion in the classification of Actinomycetes // *Adv. Appl. Microbiol.* — 1971. — Vol. 14. — P. 47–72.

Sutcliffe I. S., Brown A. K., Dover L. G. The rhodococcal cell envelope: composition, organization and biosynthesis // *In Biology of Rhodococcus, Microbiology Monographs.* — 2010. — Vol. 16. — P. 29–72.

Ward A. C., Bara N. M. The Actinobacteria // *In Practical Handbook of Microbiology. Second Edition.* 2009. Edited by E. Goldman, L. H. Green. CRC Press. — P. 375–444.

ЗАДАЧА I

УСТАНОВЛЕНИЕ ХЕМОТИПА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КОРИНЕФОРМНЫХ И НОКАРДИОФОРМНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ

Занятие 1

Определение моносахаридного состава гидролизатов целых клеток

Объект исследования. Кислый гидролизат целых клеток свежее выделенных и коллекционных культур *Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp. (Получение гидролизатов клеток: 200 мг сырой биомассы помещают в ампулу, добавляют 5,0 мл 2н H₂SO₄, ампулу запаивают и нагревают на водяной бане в течение 4 ч).

Реагенты. Насыщенный раствор гидроксида бария Ba(OH)₂. Стандартные растворы известной (1 %) концентрации сахаров («метчиков»): 1 — галактозы, 2 — глюкозы, 3 — маннозы, 4 — арабинозы, 5 — ксилозы, 6 — рибозы, 7 — рамнозы. Система растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота (4:1 по объему). Проявляющий реактив: кислый анилингидрофталаат (1,66 г фталевой кислоты + 100 мл водонасыщенного *n*-бутанола (85 мл *n*-бутанола + 15 мл дистиллированной воды) + + 0,91 мл анилина).

Материалы. Хроматографическая бумага типа FN1 (7×40) («FILTRAK», Германия). Стеклообразные одноразовые микрокапилляры (объемом 1,0 мкл) для нанесения образцов. Одноканальный механический дозатор переменного объема (рабочий объем 20–200 мкл) с набором наконечников. Стеклообразная цилиндрическая хроматографическая камера. Центрифужные пробирки. Универсальная индикаторная бумага для определения pH. Фарфоровая ступка. Бумажные фильтры и стеклообразные воронки. Прибор для вскрытия ампул. Линейка. Простой карандаш. Стеклограф. Защитные очки.

Методика. Запаиваемые ампулы с кислым гидролизатом целых актинобактериальных клеток вскрывают. Содержимое переносят в центрифужную пробирку и нейтрализуют, приливая по каплям (около 10 мл) насыщенный раствор Ba(OH)₂ до уровня pH 7,0. Для проверки pH используют универсальную индикаторную бумагу.

Полученный раствор центрифугируют (3000 об/мин, 10 мин). Надосадочную жидкость фильтруют через бумажный фильтр в фарфоровую ступку, предварительно промаркировав ее с помощью стеклографа. Надосадочную жидкость упаривают на водяной бане (80 °С) до объема 0,1 мл.

В рабочем журнале составляют план нанесения опытных образцов на хроматографическую бумагу. На бумаге карандашом отмечают стартовую линию, отступив от правого, левого и нижнего края по 1,5 см. Затем отмечают место нанесения исследуемых проб и растворов «свидетелей» («метчиков») на линии старта точками через 2,0 см друг от друга.

Содержимое (тягучий темно-коричневый раствор) фарфоровой чашки наносят на бумагу с помощью дозатора в три-четыре приема в одну точку после высушивания на воздухе предыдущей капли. Между двумя опытными образцами в одно и то же место на бумагу микрокапилляром наносят растворы «метчиков» (по 1,0 мкл каждого сахара после высушивания предыдущей капли) в последовательности, указанной в приведенном выше перечне реагентов.

Следует помнить: дозируйте образец с одинаковым стабильным темпом, не спешите и размеренно выполняйте каждый этап цикла дозирования.

Бумагу с нанесенными образцами помещают в предварительно насыщенную парами растворителей хроматографическую камеру. Камеру плотно закрывают стеклянным колпаком во избежание испарения элюентов.

Разделение исследуемых веществ методом восходящей хроматографии на бумаге (рис. 1) происходит в течение 6 суток с интервалами 2, 4, 7, 12 и три раза по 24 ч. При этом бумага высушивается на воздухе перед каждым последующим помещением в камеру. Высушенная после хроматографии бумага является хроматограммой исследуемых веществ.

Визуализация пятен сахаров на хроматограмме. Хроматограмму опрыскивают проявителем и нагревают в течение 15 мин при 105 °С в сухожаровом шкафу. Пятна сахаров с четным количеством атомов углерода (гексоз) имеют буро-коричневую, с нечетным (пентоз) — коричнево-розовую окраску на светло-желтом фоне. При идентификации сахаров измеряют и сравнивают расстояния, пройденные «метчиками» сахаров и веществами, которые предполагалось обнаружить в анализируемой смеси.

На рис. 2 приводится расположение на хроматограмме пятен дифференцирующих сахаров, содержащихся в гидролизате целых клеток родококков.

Общие требования безопасности при выполнении работы. Особое внимание и осторожность следует проявлять при вскрытии стеклянной ампулы (глаза обязательно должны быть защищены очками) и переносе кислого гидролизата в центрифужную пробирку. При попадании кислоты на кожу или одежду пораженное место обработать 2–5%-ным раство-

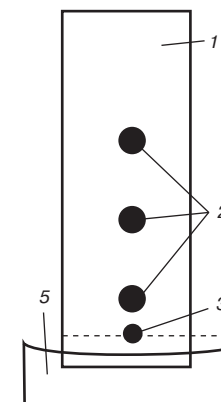


Рис. 1. Восходящая бумажная хроматография:

1 — бумажная полоска; 2 — окрашенные пятна, соответствующие различным веществам, входившим в состав анализируемой смеси; 3 — капля анализируемой смеси; 4 — линия старта; 5 — растворитель

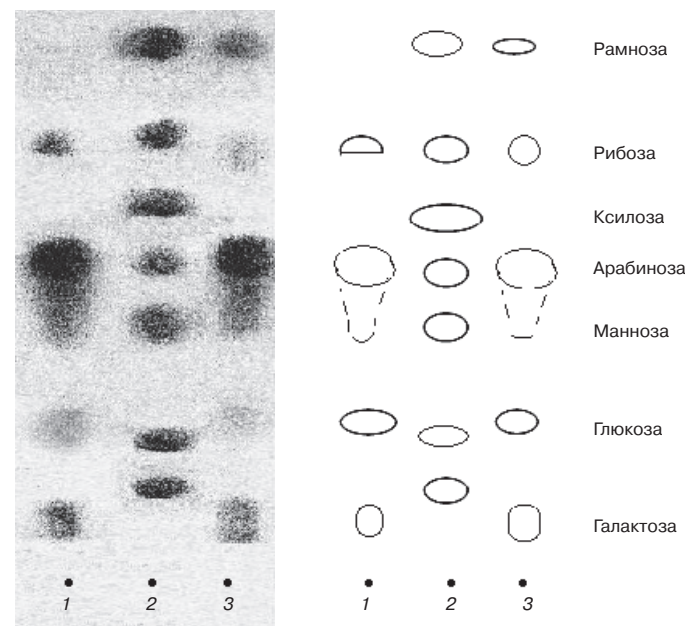


Рис. 2. Бумажная хроматограмма моносахаров, содержащихся в гидролизатах целых актинобактериальных клеток:

1 — *R. erythropolis* ИЭГМ 270; 2 — стандартные растворы сахаров; 3 — *R. rhodochrous* ИЭГМ 647. Система растворителей: *n*-бутанол — уксусная кислота (4:1)

ром соды, а затем обильно водой. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3%-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. В журнале лабораторных исследований записать сведения, касающиеся выполнения данной работы, в определенном порядке (название опыта, дата его постановки и окончания, объект исследования, принцип используемого метода, план работы, таблицы для записи наблюдений). Дать схематическое изображение полученных хроматограмм. По результатам заполнения сводной табл. 1 сформулировать выводы о соответствующем типе (наборе) дифференцирующих сахаров у тестированных бактериальных культур.

Таблица 1

Моносахаридный состав гидролизатов актинобактериальных клеток

Номер штамма	Моносахаридный состав гидролизатов целых клеток						
	Галактоза	Глюкоза	Манноза	Арабиноза	Ксилоза	Рибоза	Рамноза

Примечание. «+» или «-» — наличие или отсутствие определенного моносахарида; «+++», «++» или «+» — степень интенсивности окраски пятен.

Литература

Becker B., Lechevalier M. P., Gordon B. E., Lechevalier H. A. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates // *Appl. Microbiol.* — 1964. — Vol. 12, N. 5. — P. 421–423.

Занятие 2

Определение изомеров диаминопимелиновой кислоты (ДАПК) в гидролизатах клеток актинобактерий

Объект исследования. Кислый гидролизат целых клеток свежевыведенных и коллекционных культур *Corynebacterium* spp., *Mycobacterium* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp. (Получение гидролизатов клеток: 1,0–2,0 мг (биомасса в количестве одной бактериологической петли) сырой биомассы помещают в ампулу, добавляют 0,2 мл 6N HCl, ампулу запаивают и нагревают при 120 °C в сухожаровом шкафу в течение 3 ч).

Реагенты. Система растворителей: метанол — пиридин — 10N HCl — дистиллированная вода (32:4:1:7). Стандартный образец DL-ДАПК («Sigma»), 0,01M раствор, содержащий изомеры мезо- и LL-ДАПК. Про-

являющий реактив: 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне (готовят растворением нингидрина в ацетоне, ледяной уксусной кислоте и дистиллированной воде (95:1:4) непосредственно перед определением).

Материалы. Хроматографическая бумага типа FN1 (7×40 см) («FILTRAK», Германия). Стеклокапилляры объемом 1,0 мкл (ООО «Прецизионное стекло», Россия). Стеклокапиллярная камера. Прибор для вскрытия ампул. Линейка. Простой карандаш. Стеклограф. Защитные очки.

Методика. В рабочем журнале составляют план нанесения опытных образцов на хроматографическую бумагу. На бумаге карандашом отмечают стартовую линию, отступив от правого, левого и нижнего края по 1,5 см. Затем отмечают место нанесения исследуемых проб и стандартного образца изомеров ДАПК на линии старта точками через 2,0 см друг от друга.

Запаянные ампулы с кислым гидролизатом целых актинобактериальных клеток вскрывают. 10–15 капель гидролизата с помощью капилляра наносят на хроматографическую бумагу в одну точку, подсушивая бумагу на воздухе перед каждым последующим нанесением образца. Расстояние между образцами на хроматографической бумаге — 2 см. На бумагу в качестве контролей наносят 5–10 мкл гидролизата клеток *R. ruber* ИЭГМ 70^Г, содержащих мезо-ДАПК, и 1 мкл 0,01M стандартный раствор ДАПК, содержащего мезо- и LL-ДАПК.

Следует помнить: дозируйте образец с одинаковым стабильным темпом, не спешите и размеренно выполняйте каждый этап цикла дозирования.

Бумагу с нанесенными образцами помещают в предварительно насыщенную парами растворителей хроматографическую камеру. Камеру плотно закрывают крышкой во избежание испарения элюентов. Разделение исследуемых веществ методом восходящей хроматографии на бумаге происходит в течение 18 ч, после чего бумагу вынимают из камеры, высушивают на воздухе и опрыскивают раствором вещества, дающего цветную реакцию с пятнами, полученными на бумаге. Хроматограмма исследуемых веществ, в конечном итоге, будет представлять собой полосу бумаги, на которой сверху вниз расположены на различных расстояниях цветные пятна неправильной формы.

Визуализация пятен аминокислот на хроматограмме. Хроматограмму опрыскивают проявляющим реактивом с последующим высушиванием на воздухе и прогреванием при 105 °C в течение 15 мин. Пятна диаминокислоты обеих конфигураций имеют оливково-зеленоватый цвет, быстро желтеют на воздухе, на хроматограмме располагаются ниже пятен других аминокислот, имеющих пурпурно-фиолетовую окраску и другие значения R_f (так как быстрее двигаются на хроматограмме). Пятно мезо-ДАПК располагается ближе к линии старта, LL-ДАПК — дальше, так как R_f мезо-ДАПК меньше, чем R_f LL-ДАПК (рис. 3).

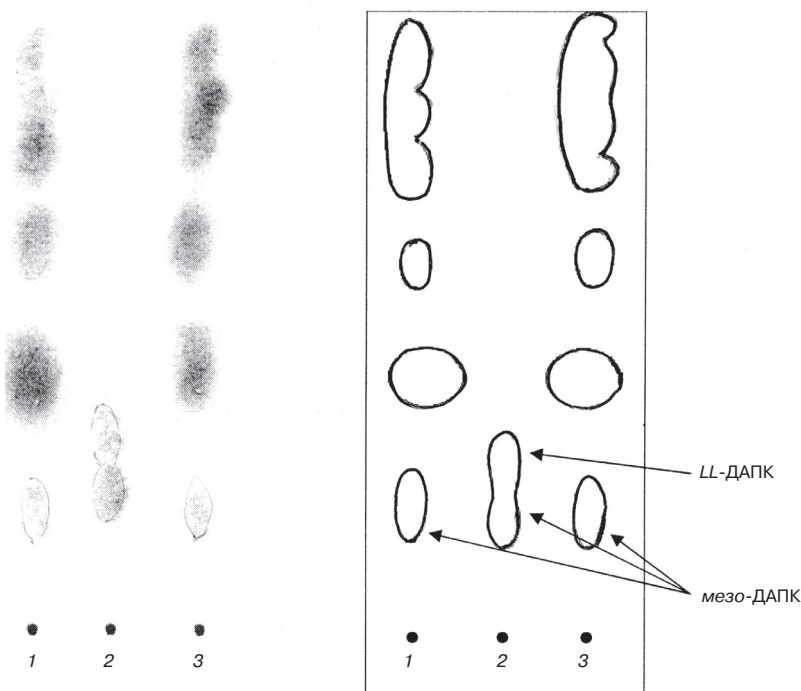


Рис. 3. Бумажная хроматограмма изомеров ДАПК гидролизатов целых актинобактериальных клеток:

1 — *R. erythropolis* ИЭГМ 270; 2 — стандартный раствор DL-ДАПК, содержащий изомеры мезо- и LL-ДАПК (пятно имеет форму «восьмерки», снизу мезо-ДАПК, сверху LL-ДАПК); 3 — *R. rhodochrous* ИЭГМ 647. Система растворителей: метанол — пиридин — 10н HCl — вода дистиллированная (32:4:1:7)

Общие требования безопасности при выполнении работы. Особую осторожность проявлять при вскрытии стеклянной ампулы (глаза обязательно должны быть защищены очками). При попадании кислоты на кожу или одежду пораженное место обработать 2–5%-ным раствором соды, а затем обильно водой. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3%-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Заполнить табл. 2. Дать схематическое изображение бумажной хроматограммы. Сделать обобщение и с учетом результатов предыдущей лабораторной работы (Занятие 1. Определение моносахаридного состава гидролизатов целых клеток) составить заключение о хемотипе клеточной стенки тестируемых культур актинобактерий. Оформить полученные результаты в виде исследовательского отчета.

Таблица 2

Выявление изомеров ДАПК в гидролизатах актинобактериальных клеток

Номер тестируемого штамма	Стереизомер диаминопимелиновой кислоты	
	Мезо-ДАПК (<i>meso</i> -A ₂ pm)	LL-ДАПК (<i>LL</i> -A ₂ pm)

Примечание. «+» или «-» — наличие или отсутствие определенного изомера диаминокислоты.

Литература

Hasegawa T., Takizawa M., Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes // *J. Gen. Appl. Microbiol.* — 1983. — Vol. 29, N. 4. — P. 319–322.

Staneck J. L., Roberts G. D. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography // *Appl. Microbiol.* — 1974. — Vol. 28. — P. 226–231.

1.2. Липидный состав бактерий

Термин «липиды» по-разному истолковывается разными исследователями. В большинстве случаев под липидами понимают химически разнородные соединения, нерастворимые в воде и обладающие общим свойством: высокой растворимостью в неполярных органических растворителях (хлороформе, диэтиловом спирте или бензоле). Это свойство обусловлено тем, что в молекулах липидов преобладают длинные алифатические углеводородные цепи или бензольные кольца, то есть неполярные, гидрофобные компоненты. У ряда липидов эти компоненты соединяются с полярной группой, что делает их амфифильными — сочетание гидрофильной, способной к образованию водородных связей, и гидрофобной, избегающей воды, частей одной и той же молекулы.

Однако далеко не все липиды растворимы в этих растворителях. Здесь приводится еще одно определение (Васьковский, 1997). Липиды — это жирные кислоты и их производные. Понятие «общие липиды» объединяет в себе сумму всех липидов, содержащихся в бактериальной клетке.

Липиды являются важными компонентами биологических мембран, они определяют степень текучести плазматических мембран всех живых клеток. Липиды играют важную роль в жизнедеятельности бактерий. Нейтральные липиды выполняют резервную функцию и представляют собой форму депонирования метаболической энергии (выступают в качестве носителей энергии и топливных молекул); фосфолипиды,

гликолипиды и стеринны в качестве структурных компонентов биомембран оказывают влияние на транспорт ионов и метаболитов; липиды выполняют защитные функции организма от внешних воздействий. Накоплен значительный материал по вопросам, касающимся участия липидов в адаптивных реакциях микроорганизмов на изменение условий окружающей среды. Установлено, что адаптации осуществляются преимущественно за счет модификаций мембранных липидов и углеводородных радикалов их жирных кислот.

Ниже в табл. 3 приводятся три крупные группы липидов, различающихся по химическому строению (цит. по Васильковскому, 1997).

Таблица 3

Классификация липидов

Группа	Липиды	Химические соединения
I	Простые	Жирные кислоты, а также соединения, содержащие одну длинную углеводородную цепь с функциональной группой, образованной из карбоксильной группы, или утратившие карбоксил
II	Сложные	Нейтральные липиды: свободные жирные кислоты и их эфиры, моно-, ди- и триацилглицерины, стероиды, воски, глицериды, углеводороды, терпены Полярные липиды: фосфолипиды (липиды, содержащие фосфор), гликолипиды (липиды, содержащие остатки сахаров), холестерин
III	Оксипипиды	Окисленные производные длинноцепочечных (C ₁₈ , C ₂₀) полиненасыщенных жирных кислот

Наибольшим разнообразием в составе бактериальных липидов характеризуются жирные кислоты (алифатические карбоновые кислоты). В бактериях присутствует свыше 300 жирных кислот и родственных соединений. Жирные кислоты не только входят в состав сложных липидов, этерифицируют оксигруппы белков, полисахаридов, но и могут находиться в свободном виде. Жирные кислоты, обнаруженные в бактериальных клетках, чаще всего имеют четное (от 12 до 20) число атомов углерода и относительно просты по химической структуре (табл. 4).

Они отличаются друг от друга длиной углеводородной цепи, степенью ненасыщенности, положением двойных связей, структурной конфигурацией, характером ветвления, наличием группировок (гидрокси-, кето-, эпокси-, циклопропановых, циклопентановых и др.). *Насыщенные* жирные кислоты не имеют двойных связей между атомами углерода: 16:0 — пальмитиновая, 18:0 — стеариновая и др.; *мононенасыщенные*

Таблица 4

Наименование и формула некоторых жирных кислот

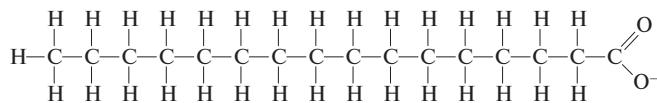
Жирная кислота	Формула	Число двойных связей	Число атомов углерода
Пальмитат	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COO ⁻	Нет	16
Стеарат	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COO ⁻	Нет	18
Олеат	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COO ⁻	1	18
Линолеат	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COO ⁻	2	18
Линоленат	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COO ⁻	3	18
Арахидонат	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COO ⁻	4	20

(моноеновые): 18:1 (*n*-9) — олеиновая и др. и *полиненасыщенные* (полиеновые): 18:2 (*n*-6) — линолевая, 18:3 (*n*-3) — альфаиноленовая, 18:3 (*n*-6) — гаммаиноленовая, 20:4 (*n*-6) — арахидоновая, 20:5 (*n*-3) — эйкозапентаеновая и др. имеют одну или более двойных связей. Примеры приведены на рис. 4. Указанные выше различия в строении жирных кислот являются удобными параметрами для дифференциации бактериальных таксонов.

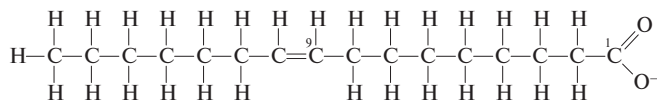
У бактерий, как правило, отсутствуют полиненасыщенные жирные кислоты или их мало, но обнаруживаются разветвленные, циклопропансодержащие и оксикислоты. Последние обычно связаны с сахарами и аминокислотами. Известны кислоты с четным и нечетным числом атомов углерода или их комбинацией.

Следует помнить: для указания количества атомов углерода и двойных связей в структуре жирных кислот используют стенографическое обозначение. Так, жирная кислота с 18 атомами углерода и без двойных связей обозначается 18:0, тогда как такая же кислота, но с двумя двойными связями обозначается 18:2. Атомы углерода в жирной кислоте пронумерованы по остаткам карбоновой кислоты, поэтому положение двойных связей можно описать, используя номер первого атома углерода в двойной связи. Например, Δ⁹ показывает двойную связь между атомами углерода 9 и 10 в цепи жирной кислоты (рис. 4, б). Конфигурация двойных связей большинства непредельных жирных кислот *цис* (лат. *цис* — на одной стороне), т. е. два атома водорода по обеим сторонам атомов углерода в двойной связи находятся на той же стороне молекулы (рис. 4, б). Отсюда, полное систематическое название линолеата (табл. 4): *цис*, *цис*-Δ⁹, Δ¹²-октадекадиеноат (рис. 4, з). В процессе деградации жирных кислот образуются *транс*-изомеры (лат. *транс* — напротив),

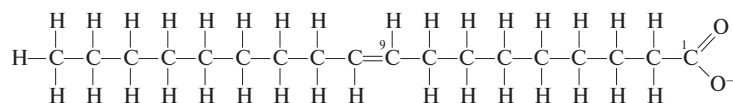
а)

Пальмитат (гексадеканат) $C_{16:0}$

б)

Пальмитолеат (цис- Δ^9 -гексадеканат) $C_{16:1}$

в)

(Транс- Δ^9 -октадеценат) $C_{18:1}$

г)

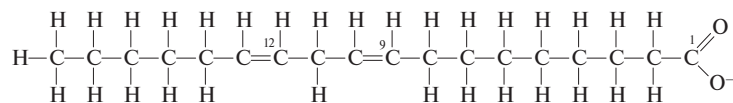
Линолеат (цис, цис- Δ^9 , Δ^{12} -октадекадиенат) $C_{18:2}$

Рис. 4. Структуры (а) насыщенной жирной кислоты (пальмитат, $C_{16:0}$); (б) мононенасыщенной жирной кислоты с одной двойной связью в цис-конфигурации (пальмитолеат, $C_{16:1}$); (в) мононенасыщенной жирной кислоты с двойной связью в транс-конфигурации ($C_{18:1}$) и (г) полиненасыщенной жирной кислоты (линолеат, $C_{18:2}$)

у которых атомы водорода на каждой стороне атома углерода в двойной связи расположены на противоположных сторонах молекулы (рис. 4, в).

Бактерии разных таксонов различаются по общему содержанию липидов. Например, общее количество липидов у представителей рода *Oerskovia* составляет лишь 2,4–3,5, *Escherichia coli* — 9,1, тогда как у представителей *Nocardia*, *Mycobacterium* или *Rhodococcus* может достигать от 30 до 70% от сухих веществ клетки.

При экстракции липидов нужно учитывать то, что они способны не только к гидрофобным взаимодействиям, но и образованию водородных, электростатических и ковалентных (сложноэфирных, амидных, гликозидных) связей с полисахаридами.

Следует помнить: неполярные растворители разрушают комплексы, образованные в результате ванн-дер-ваальсового гидрофобного взаимодействия.

Липиды, связанные в мембранах, экстрагируют полярными растворителями (этанол, метанол), разрушающими водородные связи и нарушающими электростатическое взаимодействие белков с липидами. Их применяют в смеси с полярными растворителями при экстракции липидов из плазматических мембран. Липиды, находящиеся в комплексах, образованных ковалентными связями, растворителями не экстрагируются. Их можно выделить только после гидролиза комплекса слабыми растворами кислот или щелочей в органическом растворителе.

Распространенным методом экстракции липидов является способ, предложенный Фолчем с соавторами (Folch *et al.*, 1957). Одним из наиболее часто применяемых и эффективных способов экстракции липидов является экстракция по Блай и Дайеру (Bligh, Dyer, 1959) — упрощенный вариант классического метода Фолча. При экстракции по этому методу используют однофазную систему растворителей хлороформ — метанол — вода (1,0:2,0:0,8 по объему), с помощью которой сравнительно быстро и эффективно извлекаются липиды. Экстракт разбавляют одним объемом воды и одним объемом хлороформа. В результате образуется двухфазная система, нижний (мутный) слой которой состоит из хлороформа, а верхний (прозрачный) — из смеси метанола и воды (1,0:0,9). Водорастворимые нелипидные примеси переходят в водно-метанольный слой, тогда как в хлороформном слое остаются липиды, практически свободные от примесей. Выход суммарных неочищенных липидов после отделения от нелипидных примесей должен быть выше 95%.

Для определения жирных кислот из бактериальных клеток предварительно извлекают общую фракцию липидов по методу Фолча (или их отдельные фракции, например фосфоглицериды, гликолипиды). Высушенную общую фракцию липидов омыляют 1М раствором КОН при 100 °С в течение 1 ч. Неомыляемые примеси экстрагируют петролейным эфиром и удаляют. Образовавшиеся мыла расщепляют с использованием 6N HCl. Затем жирные кислоты экстрагируют, высушивают и взвешивают. Гравиметрический (*lat. gravis* — тяжелый) метод анализа суммарных неочищенных липидов является одним из наиболее распространенных и точных классических методов. Для разделения жирных кислот применяют газовую хроматографию.

Список литературы

- Васьковский В. Е. Липиды // Соросовский образовательный журнал. — 1997. — № 3. — С. 32–37.
- Bligh E. G., Dyer W. I. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* — 1959. — Vol. 37. — P. 911–917.
- Folch J., Less M., Sloane-Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* — 1957. — Vol. 222. — P. 497–507.

ЗАДАЧА II

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
СУММАРНЫХ НЕОЧИЩЕННЫХ ЛИПИДОВ

Занятие 3

Определение общего содержания липидов
гравиметрическим (весовым) методом

Объект исследования. Хлороформ-метанольные экстракты клеток природных изолятов и коллекционных штаммов гордоний, диетций и родококков. (*Получение клеточных экстрактов:* 50 мг сухой биомассы + + 3,75 мл смеси хлороформ — метанол (2:1) оставляют на 2 ч при энергичном встряхивании).

Реагенты. Хлороформ (хч). Абсолютный метанол (хч). Бензол (хч). Азот. Гидроксид калия (КОН). Вода дистиллированная.

Материалы. Центрифужные пробирки объемом 50 мл с химически устойчивыми пробками. Колба со шлифом. Стеклянные пипетки. Вials из темного стекла с крышкой. Бумажный фильтр с синей лентой. Вакуум-эксикатор. Резиновые перчатки.

Методика. Хлороформ-метанольные экстракты центрифугируют (3000 об/мин, 15 мин) для осаждения бактериальных клеток. Супернатант фильтруют через бумажный фильтр в другую центрифужную пробирку. Для повторного экстрагирования бактериальные клетки снова суспендируют в 4,75 мл смеси хлороформ — метанол — вода (1:2:0,8), смесь встряхивают и центрифугируют. К объединенному супернатанту прибавляют 2,5 мл хлороформа и 2,5 мл воды; хлороформный и водно-метанольный слои разделяют центрифугированием (3000 об/мин, 15 мин). Нижний хлороформный слой декантируют в предварительно взвешенную колбу со шлифом, разбавляют равным объемом бензола и упаривают досуха в токе азота на роторном испарителе при 30–35 °С. После выпаривания колбу помещают в вакуум-эксикатор с КОН до установления постоянного веса. Колбу с осадком неочищенных суммарных липидов взвешивают с помощью аналитических весов.

Содержание общих липидов определяют по формулам:

$$\begin{aligned} & \text{Общие липиды, мг} = \\ & = \text{Вес колбы с липидами, мг} - \text{Вес пустой колбы, мг} \\ & \text{Общие липиды, \%} = \\ & = (\text{Вес липидов, мг} / \text{Вес сухой биомассы, мг}) \times 100. \end{aligned}$$

Колбу с липидами сразу же заливают небольшим количеством свежеприготовленной смеси хлороформ — метанол (2:1). Содержимое пе-

реносят в колбу с притертой стеклянной пробкой, и весь объем (25 мл) колбы заполняют приготовленной смесью растворителей. Полученный препарат суммарных липидов хранят в герметичном состоянии при низкой (до –20 °С и ниже) температуре в целях дальнейшего использования для определения свободных жирных кислот (см. Занятие 4) и фосфолипидов (см. Занятие 6) бактерий.

Поскольку в состав липидов входят жирные кислоты с одной или более двойными связями, при работе с полученными препаратами и при их хранении следует соблюдать определенные меры предосторожности с тем, чтобы избежать аутоокисления. Для этих целей можно применять антиоксиданты, в частности 2,6-ди-грег-бутил-п-крезол, который в концентрации менее 0,005 % эффективно предотвращает окислительное расщепление ненасыщенных липидов.

Следует помнить: в препараты суммарных липидов не должны попадать липиды или другие примеси из растворителей, реагентов или используемого оборудования.

Общие требования безопасности при выполнении работы. Все операции проводить в вытяжном шкафу, обязательно в резиновых перчатках. Особую осторожность проявлять при работе с хлороформом и метанолом. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3 %-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Самостоятельно сделать расчеты. Представить полученные данные в виде диаграммы. Оформить результаты лабораторной работы в виде исследовательского отчета.

Литература

Keim M. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. — М.: Мир, 1975. — 323 с.

Препаративная биохимия липидов / Л. Д. Бергельсон [и др.]; отв. ред. Л. Д. Бергельсон, Э. В. Дятловицкая. — М.: Наука, 1981. — 259 с.

Bligh E. G., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* — 1959. — Vol. 37. — P. 1090–1098.

ЗАДАЧА III

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ СОСТАВА
ЖИРНЫХ КИСЛОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Таксономическая ценность этого признака долгое время подвергалась сомнению ввиду того, что состав жирных кислот в значительной мере зависит от возраста культуры, условий ее выращивания — состава среды,

pH, температурного режима. Однако при строгом соблюдении общих требований к выращиванию культур, высокой стандартизации условий культивирования микроорганизмов и стандартизации исследуемого материала (целесообразно использовать для анализа жирных кислот клетки, находящиеся в стационарной фазе роста) качественный состав групп жирных кислот достаточно постоянен. Выполнение этих правил полностью зависит от исследователя и должно быть под его постоянным контролем.

В качестве диагностических чаще всего используют следующие жирные кислоты (или их группы): насыщенные с прямой цепью; ненасыщенные, разветвленные изо- и антеизо-серий кислоты; метилированные по 10-му атому углерода. Особое значение имеет присутствие 10-метилстеариновой или 10-метилоктадекановой (туберкулостеариновой) кислоты. Этот признак используется в основном на родовом уровне. Спектр жирных кислот бактерий отдельных видов может быть настолько характерным, что определение его не составляет сомнений в видовой принадлежности культур. Однако нередко представители разных видов одного и того же рода или даже разных родов имеют сходные жирнокислотные профили. В рамках полифазной таксономии анализ жирных кислот бактериальных клеток часто полезен в качестве экспрессного и относительно недорогого метода, позволяющего сравнивать и группировать большое количество штаммов с минимальными усилиями и затратами, получать наглядную информацию по характеристике и идентификации бактериальных культур.

По данным сотрудников лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (Ившина и др., 1994), актинобактерии рода *Rhodococcus*, независимо от их видовой принадлежности, характеризуются повышенным содержанием пальмитиновой ($C_{16:0}$), пальмитолеиновой ($C_{16:1}$) и олеиновой ($C_{18:1}$) кислот, а также неизменным присутствием туберкулостеариновой ($10MeC_{18:0}$) кислоты. Преобладающие компоненты жирнокислотного пула родококков — насыщенные прямоцепочечные (от 43,7 до 68,0 % общего количества обнаруживаемых жирных кислот) с четным числом (от 73,9 до 98,1 %) углеродных атомов кислоты.

При этом спектр жирных кислот штаммов родококков, принадлежащих к различным видам, представляет довольно сложную композицию, тогда как качественный состав их почти идентичен. Существенные различия выявляются, прежде всего, в количественном соотношении индивидуальных кислот. Так, по соотношению миристиновой ($C_{14:0}$) и пентадекановой ($C_{15:0}$) кислот родококки подразделяются на две группы. Для родококков группы I (*R. erythropolis*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*) характерно отношение $C_{14:0}$ и $C_{15:0}$ кислот больше единицы, группы II ('*R. longus*'* и *R. opacus*) — меньше единицы.

* Инвалидный вид (согласно существующим правилам) пишется без курсива и в кавычках.

Для представителей *R. erythropolis* типичным является присутствие (от 2,5 до 3,9 %) «маркерной» циклопропановой жирной кислоты $C_{17\gamma}$. Этот признак отличает их от штаммов всех других видов родококков, у которых данная кислота не обнаруживается. Другая отличительная особенность культур *R. erythropolis* — повышенное содержание миристиновой ($C_{14:0}$) и туберкулостеариновой кислот.

Сопоставление жирнокислотных профилей трудно дифференцируемых таксонов *R. rhodochrous* и *R. ruber* выявляет их отличительные особенности. Так, представители *R. ruber* успешно различаются по минимальному (3,4 %) процентному содержанию туберкулостеариновой кислоты и ее гомологов ($10MeC_{16:0}$, $10MeC_{17:0}$) по сравнению с таковым у *R. rhodochrous* и *R. erythropolis* (9,7 и 10,8 % соответственно). Своеобразие жирнокислотного спектра представителей *R. opacus* проявляется в сравнительно более высоком (10,1 %) показателе суммарных количеств туберкулостеариновой кислоты и ее гомологов по сравнению с таковым (4,9 %) у штаммов '*R. longus*'. Последние отличаются более высоким показателем ненасыщенности, рассчитанным по соотношению суммарных количеств ненасыщенных и насыщенных жирных кислот. По жирнокислотным профилям не удается однозначно дифференцировать изоляты *R. fascians*. Однако замечено, что они характеризуются самым высоким (до 35,6 %) уровнем пальмитиновой кислоты.

Выявленные особенности жирнокислотного клеточного пула родококков использованы для построения частной таксономической системы, позволяющей дифференцировать *Rhodococcus* на видовом уровне (Ившина, 1997).

Список литературы

Ившина И. Б. Бактерии рода *Rhodococcus*: детекция, иммунодиагностика, био-разнообразие: дис. ... д-ра биол. наук. — Пермь, 1997.

Методы консервации культур *Rhodococcus* spp. и их применение в практике поддержания специализированного фонда алканотрофных микроорганизмов / И. Б. Ившина и др. // Микробиология. — 1994. — Т. 63. — Вып. 1. — С. 118–128.

Занятие 4

Определение свободных жирных кислот у бактерий

Объект исследования. Реакционную смесь общих липидов клеток свежесыводенных и коллекционных культур родококков разных видов (15–30 мг липидов в смеси хлороформ — метанол (2:1) (см. Занятие 3)

помещают в колбу с боковым отростком. Растворитель удаляют в токе азота при 30 °С. К остатку прибавляют 5,0 мл 0,3N метанольного раствора NaOH. Смесь кипятят, после кипячения охлаждают в течение 2 ч).

Реагенты. Смесь абсолютный метанол — вода (9:1). Фенолфталеин 1 %-ный раствор в 90 %-ном эталоне. 6н HCl. Петролейный эфир (40–70 °С). 2,5 %-ный раствор хлористого водорода в метаноле. Стандартная смесь метиловых эфиров жирных кислот («*SUPELCO*», США).

Материалы. Колба с боковым отростком. Одноканальный механический дозатор переменного объема (рабочий объем 1–5 мл) с набором наконечников. Делительная воронка. Колба с притертой крышкой. Вакуум-эксикатор. Резиновые перчатки. Защитные очки.

Методика. К реакционной смеси общих липидов добавляют 3 капли раствора фенолфталеина и 90 %-ный раствор метанола с таким расчетом, чтобы раствор продуктов реакции заполнил весь объем бокового отростка колбы. В результате добавления фенолфталеина смесь окрашивается в малиновый цвет, что свидетельствует об успешном проведении щелочного гидролиза. Полученный раствор переливают в делительную воронку, и порционно (3–4 раза по 5 мл) приливают петролейный эфир для экстракции неомыляемых веществ (алкен-1-иловые эфиры глицерина, стерины, углеводороды, каротиноиды, высшие спирты и др.). Верхний слой (неомыляемые вещества) постоянно сливают в предварительно взвешенную колбу с притертой крышкой. Водно-спиртовую фазу (нижний слой) подкисляют 6н HCl (0,3 мл) до обесцвечивания раствора и экстрагируют свободные жирные кислоты, порционно (3–4 раза по 5 мл) приливая петролейный эфир. Верхний слой (свободные жирные кислоты) постоянно сливают в предварительно взвешенную колбу с притертой крышкой.

Объединенные экстракты неомыляемых веществ, а также свободных жирных кислот упаривают досуха в токе азота, сушат в вакуум-эксикаторе над NaOH. Остаток взвешивают и определяют содержание полученных веществ по формулам:

$$\text{Содержание клеточных жирных кислот, \%} = \frac{\text{Вес жирных кислот, мг}}{\text{Вес образца, мг}} \times 100,$$

$$\text{Содержание неомыляемых веществ, \%} = \frac{\text{Содержание неомыляемых веществ, мг}}{\text{Вес образца, мг}} \times 100.$$

Полученный препарат свободных жирных кислот заливают свежеприготовленной смесью хлороформ — метанол (2:1) и хранят при температуре –4 °С неограниченное время.

Для идентификации свободные жирные кислоты переводят в метиловые эфиры с помощью кислотного гидролиза (2,5 %-ный раствор

хлористого водорода в метаноле) и анализируют на газовом хроматографе *Agilent 6890N* с квадрупольным масс-спектрометром «*Agilent MSD 5973N*» («*Agilent Technologies*», США). Для анализа используют капиллярную колонку *RTX-5MS* (30 м/0,25 мм/0,25 мкм с 5-метровой предколонкой). Кислоты идентифицируют путем сравнения характеристик удерживания неизвестных метиловых эфиров жирных кислот бактерий с таковыми стандартных метиловых эфиров жирных кислот.

Общие требования безопасности при выполнении работы. Все операции проводить в вытяжном шкафу, обязательно в резиновых перчатках. Особое внимание и осторожность проявлять при работе с соляной кислотой и смесью спирта с хлороформом (глаза обязательно должны быть защищены очками). Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3 %-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Самостоятельно сделать расчеты. Проиллюстрировать полученные данные графиками, а также хроматограммами метиловых эфиров жирных кислот. На основе полученных результатов с помощью Ключа для определения видов родококков (Ившина, 1997) осуществить группирование штаммов по данным жирнокислотного состава и сделать выводы о видовой принадлежности исследованных культур. Сравнить полученные выводы с результатами первичной идентификации культур по другим хемотаксономическим маркерам. Оформить результаты в виде исследовательского отчета.

Ключ для определения видов родококков

1. Отношение концентраций миристиновой кислоты $C_{14:0}$ к концентрации пентадекановой кислоты $C_{15:0}$ больше единицы — *R. erythropolis*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*.

А. Циклопропановая жирная кислота C_{17V} присутствует — *R. erythropolis*.

Б. Процентное содержание туберкулостеариновой кислоты $10MeC_{18:0}$ и ее гомологов $10MeC_{16:0}$, $10MeC_{17:0}$ минимальное, меньше 3 — *R. ruber*.

В. Процентное содержание туберкулостеариновой кислоты $10MeC_{18:0}$ и ее гомологов $10MeC_{16:0}$, $10MeC_{17:0}$ высокое, больше 9 — *R. rhodochrous*.

2. Отношение концентрации миристиновой кислоты $C_{14:0}$ к концентрации пентадекановой кислоты $C_{15:0}$ меньше единицы — ‘*R. longus*’, *R. opacus*.

А. Процентное содержание туберкулостеариновой кислоты $10MeC_{18:0}$ и ее гомологов $10MeC_{16:0}$, $10MeC_{17:0}$ меньше 4 — ‘*R. longus*’.

Б. Процентное содержание туберкулостеариновой кислоты $10MeC_{18:0}$ и ее гомологов $10MeC_{16:0}$, $10MeC_{17:0}$ больше 10 — *R. opacus*.

Литература

Ившина И. Б. Бактерии рода *Rhodococcus*: детекция, иммунодиагностика, био-разнообразие: дис. ... д-ра биол. наук. — Пермь, 1997.

Knoppenstedt R. M. *Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms* // In M. Goodfellow, D. E. Minnikin (Eds.). *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Academic Press. — London, UK, 1985. — P. 173–199.

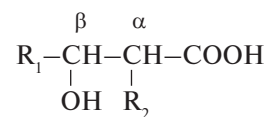
1.3. Свободные миколовые кислоты (тест LCN-A)

На основании типов клеточной стенки не всегда представляется возможным разграничить истинные нокардии, микобактерии, родококки и коринебактерии, ибо все они имеют клеточные стенки IV хемотипа, содержащие мезо-ДАПК, арабинозу и галактозу в больших количествах.

Дифференцировать бактерии этих родов позволяет метод обнаружения липида LCN-A — свободных миколовых кислот (анг.: *mycolic acid*), содержащих от 0 до 4 двойных связей (Goodfellow et al., 1973), путем анализа спиртово-эфирных клеточных экстрактов на тонкослойных хроматограммах.

Специфический липид LCN-A впервые был обнаружен в 1970 г. (Mordarska, Mordarski, 1970; Mordarska, Réthy, 1970) в патогенных истинных нокардиях, за что получил название «Липид, характерный для нокардий» («*Lipid Characteristic of Nocardia*»). В дальнейшем многими авторами липид LCN-A был выявлен у представителей родококков, коринебактерий, но не у микобактерий, более высокомолекулярные миколовые кислоты которых не извлекаются данными растворителями и не выявляются на хроматограмме. Нерастворимость миколовых кислот микобактерий в смеси спирт-эфир положена в основу экспрессного метода дифференциации представителей *Mycobacterium* от *Nocardia*, *Rhodococcus* и *Corynebacterium*.

Таким образом, важным хемотаксономическим критерием в идентификации актинобактерий является присутствие в них определенного типа миколовых кислот, представляющих собой высокомолекулярные α-разветвленные жирные β-гидроксикислоты с двумя алкильными радикалами:



где R₁ и R₂ — алкильные группы.

Более консервативный радикал из 20–25 атомов углерода занимает α-положение. Более вариабельный радикал из 50–65 атомов углерода (так называемый меромикولات) занимает β-положение. В структуре меромиколатного радикала обычно присутствует до четырех двойных связей, циклопропановые и эпокси-кольца, а также метильные, кето- и метоксигруппы. Миколовые кислоты у актинобактерий группы «*mycolata*» различаются по длине углеродных цепей (от 20 до 80 атомов C), числу двойных связей, природе заместителей (метильные, кето- и метоксигруппы, циклопропановые и эпокси-кольца), соотношению длин алифатических цепей при C₂- и C₃-атомах жирной кислоты. Миколовые кислоты в комплексе «пептидогликан — арабиногалактан — миколовые кислоты» формируют основу внешнего липидного барьера непроницаемости клеточной стенки.

Липид LCN-A представляет собой комплекс свободных миколовых кислот (числом до 15), экстрагируемых, в отличие от миколовых кислот, истинных микобактерий спиртово-эфирной смесью. Высокомолекулярные миколовые кислоты микобактерий, как правило, экстрагируются хлороформом. Так, миколовые кислоты с наибольшим (60–98) числом углеродных атомов характерны для микобактерий, нокардиям свойственны миколовые кислоты с 45–58 атомами углерода, большинству родококков — с 35–50, коринебактериям — с 20–36 атомами углерода (Collins et al., 1982).

Тест LCN-A помогает разграничить труднодифференцируемые культуры, имеющие IV хемотип клеточной стенки. Так, липид LCN-A, выявляемый у родококков, коринебактерий и нокардий, имеет на тонкослойных хроматограммах неодинаковое положение пятен: более высокое значение R_f имеет липид LCN-A, изолируемый из нокардий, ниже всех на хроматограмме располагается липид LCN-A из коринебактерий, а промежуточное положение между коринемиколовыми и нокардио-миколовыми кислотами занимают миколовые кислоты из родококков:

<i>Mycobacterium</i>	—
<i>Nocardia</i>	+
<i>Gordonia</i>	+
<i>Rhodococcus</i>	+
<i>Corynebacterium</i>	+

Актинобактерии, обладающие уникальной способностью к синтезу миколовых кислот, отнесены к подпорядку *Corynebacterineae*. Подпорядок *Corynebacterineae* включает 8 семейств: *Corynebacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Gordoniaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Tsukamurellaceae*, ‘*Williamsiaceae*’, *Segniliparaceae* и следующие роды: *Corynebacterium*, *Dietzia*,

Gordonia, *Segniliparus*, *Skermania*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Tsakamurella* и *Williamsia*.

Неизменное присутствие миколовых кислот определенного типа у тех или иных актинобактерий делает их надежным и ценным хемотаксономическим критерием в классификации и идентификации микроорганизмов с IV хемотипом клеточной стенки.

Список литературы

Collins M. D., Goodfellow M., Minnikin D. E. *A survey of the structure of mycolic acids in Corynebacterium and related taxa // J. Gen. Microbiol.* – 1982. – Vol. 128. – P. 129–149.

Goodfellow M., Minnikin D. E., Patel P. V., Mordarska H. *Free nocardomycolic acids in the classification of nocardias and strains of the 'rhodochrous' complex // J. Gen. Microbiol.* – 1973. – Vol. 74. – P. 185–188.

Mordarska H., Mordarski M. *Cell lipids of Nocardia // In The Actinomycetales. Ed. H. Prauser. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.* – 1970. – P. 47–53.

Mordarska H., Réthy A. *Preliminary studies on the chemical character of the lipid fraction in Nocardia // Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (AITE).* – 1970. – Vol. 18. – P. 455–459.

ЗАДАЧА IV

УСТАНОВЛЕНИЕ ТИПА МИКОЛОВЫХ КИСЛОТ У КОРИНЕФОРМНЫХ И НОКАРДИОФОРМНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ

Занятие 5

Определение свободных миколовых кислот (липида LCN-A) методом тонкослойной хроматографии метанолизатов целых клеток

Объект исследования. Метанолизаты целых клеток свежeweделенных и коллекционных штаммов актинобактерий. (*Получение метанолизатов клеток:* 200 мг сухой биомассы помещают в пробирку со шлифом, добавляют 5 мл метанола, 5 мл толуола и 0,2 мл концентрированной H_2SO_4 , закрывают крышкой и выдерживают в термостате при 50 °C не менее 12 часов. По истечении этого времени пробирки остужают до комнатной температуры, метилмиколяты экстрагируют в 2 мл *n*-гексана).

Реагенты. Хроматографическая система: петролейный эфир — диэтиловый эфир (85:25). Проявляющий реактив: 10 %-ный раствор фосфорномолибденовой кислоты в этаноле.

Материалы. Тонкослойные хроматографические пластинки типа *Silufol UV 254* (150×150 мм, «Merek», Германия). Стеклокамера хроматографическая. Стеклокамера микрокапилляры объемом 1,0 мкл (ООО «Прецизионное стекло», Россия). Пинцет. Простой карандаш. Линейка. Защитные очки.

Методика. В рабочем журнале составляют план нанесения анализируемых образцов на хроматографическую пластинку. На пластинке карандашом отмечают место нанесения опытных образцов на линии старта точками через 1,5 см друг от друга. Линия старта должна быть расположена на расстоянии 1,5 см от нижнего края силуфольной пластинки. На расстоянии 13,5 см от линии старта карандашом обозначают высоту подъема растворителя.

Следует помнить: процесс нанесения образца на хроматографическую пластинку является одной из самых ответственных операций. Ошибки хроматографического анализа зависят в основном от неточного нанесения заданного объема образца и размывания зоны по слою сорбента в момент нанесения, что ухудшает последующее разделение и затрудняет детектирование. Дозируйте образец с одинаковым стабильным темпом, не спешите и размеренно выполняйте каждый этап цикла дозирования.

С помощью микрокапилляра 5,0 мкл образца наносят в виде отдельного пятна диаметром 10 мм на пластинку в несколько приемов в одну и ту же точку, при этом тщательно высушивая пятно на воздухе или с помощью вентилятора перед каждым последующим нанесением опытного образца.

Следует помнить: непосредственный контакт следует осуществлять со слоем сорбента так, чтобы из микрокапилляра полностью выходил весь раствор.

В качестве контроля используют метилмиколяты эталонных штаммов известной систематической принадлежности и с известным значением R_f пятен липида LCN-A на хроматограмме.

Хроматографическое разделение миколовых кислот проводят в стеклянной камере, в которой можно следить за движением растворителя. Для лучшего насыщения внутреннюю поверхность камеры выстилают фильтровальной бумагой, в камеру заливают приготовленную перед разделением систему растворителей, смачивают бумагу, закрывают плотно стеклянной крышкой и в течение одного часа насыщают камеру парами растворителей (процедура носит название «уравновешивание»).

Пластинку с нанесенными образцами помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами растворителей. Камеру герметично закрывают, чтобы избежать испарения растворителя. Температура в камере в течение всего процесса разделения должна быть постоянной.

После подъема растворителя на высоту 13,5 см пластинку удаляют из камеры и высушивают на воздухе до полного испарения растворителя. Хроматографическое разделение миколовых кислот повторяют трижды.

Визуализация пятен миколовых кислот на хроматограмме. Пластинку опрыскивают фосфорномолибденовой кислотой и нагревают в сушильном шкафу при 105 °С до появления пятен. Пятна свободных миколовых кислот располагаются между стартовой линией и дополнительно выявляемыми на хроматограмме пятнами неидентифицированных жирных кислот (рис. 5).

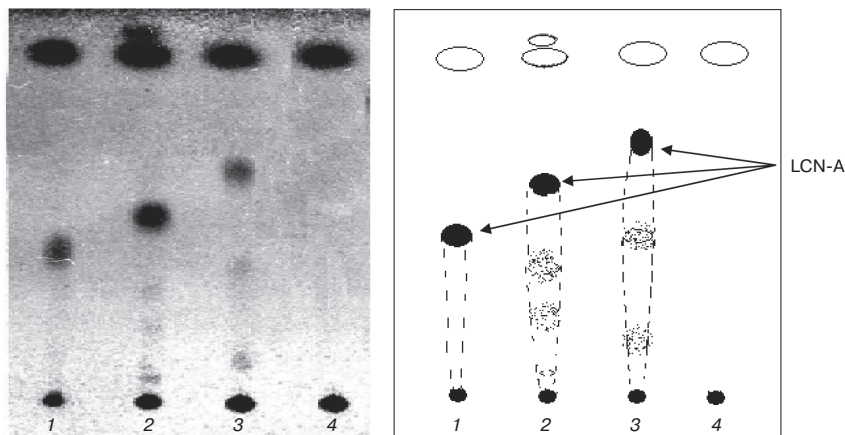


Рис. 5. Тонкослойная хроматограмма метанолизатов целых актинобактериальных клеток:

1 — *C. glutamicum* ИЭГМ 1861; 2 — *R. ruber* ИЭГМ 70^T; 3 — *N. farcinica* ИЭГМ 621; *Micr. imperiale* ИЭГМ 827. Система растворителей: петролейный эфир — диэтиловый эфир (85:25)

Тип свободных миколовых кислот определяют по значениям коэффициента R_f разделенных метилмиколоватов:

$$R_f = X / X_1, \quad (1)$$

где X — расстояние, пройденное веществом от точки старта (от исходного пятна на линии старта до середины пятна разделенного вещества), см;

X_1 — расстояние, пройденное фронтом подвижной фазы за это же время: от линии старта (а не от края пластинки) до места, где находился фронт в момент окончания процесса хроматографирования, см.

Общие требования безопасности при выполнении работы. Все операции проводить в вытяжном шкафу, обязательно в резиновых перчатках. Особую осторожность проявлять при работе со стеклянными микрокапиллярами и агрессивными реагентами (глаза обязательно должны быть

защищены очками). Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3%-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Заполнить сводную табл. 5. Дать схематическое изображение тонкослойной хроматограммы. С помощью линейки измерить расстояния: 1) от места нанесения раствора до середины каждого пятна (X); 2) от места нанесения капли раствора до линии фронта растворителя (X_1). Вычислить коэффициент распределения R_f для миколовых кислот. Представить полный отчет по данной лабораторной работе.

Таблица 5

Определение типа свободных миколовых кислот (липида LCN-A) в метанолизатах целых клеток

Исследованный штамм	Расстояние, см		Значение R_f
	Старт — фронт растворителя	Старт — липид LCN-A	

Литература

Hecht S. T., Causey W. A. Rapid method for the detection and identification of mycolic acids in aerobic actinomycetes and related bacteria // *J. Clin. Microbiol.* — 1976. — Vol. 4 (3). — P. 284–287.

Mordarska H., Mordarski M., Goodfellow M. Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria // *J. Gen. Microbiol.* — 1972. — Vol. 71, N. 1. — P. 77–86.

Minnikin D. E., Alshamaony L., Goodfellow M. Differentiation of *Mycobacterium*, *Nocardia* and related taxa by thin-layer chromatographic analysis of whole-organism methanolsates // *J. Gen. Microbiol.* — 1975. — Vol. 88, N. 1. — P. 200–204.

1.4. Фосфолипиды бактерий

Фосфолипиды (фосфатиды) — сложные полярные липиды, содержащие в своем составе остаток фосфорной кислоты и соединенную с ней добавочную группу атомов различной химической природы. В состав фосфолипидов входят спирт, жирные кислоты, фосфорная кислота и азотистые соединения. По природе спирта фосфолипиды можно разделить на три группы: фосфоглицериды, фосфосфинголипиды и фосфоинозитиды. Наиболее широко распространены фосфоглицериды (фосфолипиды, производные фосфатидной кислоты). К ним относятся фосфатидилхолины, фосфатидилэтаноламины (кефалины), фосфатидилсерин и плазмалогены (ацетальфосфатиды).

Фосфолипиды в значительной степени обладают антибактериальной и иммунобиологической активностью. Фосфолипиды — основные компоненты липидного биослоя бактериальных мембран и часто используются наряду с жирными кислотами в качестве информативных хемотаксономических маркеров. При обязательном соблюдении стандартных, строго контролируемых условий культивирования микробных культур анализ фосфолипидов является быстрым и эффективным методом первичной (вспомогательной) идентификации актинобактерий труднодифференцируемых таксонов на уровне родов и видов.

Очерчено (Lechevalier *et al.*, 1977; Minnikin *et al.*, 1978) 5 типов фосфолипидов, характеризующихся присутствием азотистых компонентов и имеющих диагностическое значение (табл. 6).

Таблица 6

Типы фосфолипидов у коринеформных и нocardioформных актинобактерий

Фосфолипиды	Типы фосфолипидов				
	I	II	III	IV	V
Фосфатидилэтанолламин	–	+	B	B	–
Фосфатидилметилэтанолламин	–	–	B	B	–
Фосфатидилхолин	–	–	+	–	–
Фосфолипид, содержащий глюкозамин	–	–	–	+	+
Фосфатидилглицерин	B	–	B	–	+

Примечание. В составе фосфолипидов всех типов присутствует фосфатидилинозит; «–» — фосфолипид отсутствует; «+» — фосфолипид имеется; B — фосфолипид выявляется не всегда или содержание его варьирует.

У подавляющего большинства бактерий более 70% их фосфолипидов составляет фосфатидилэтанолламин. Основным критерием для выделения типов фосфолипидов является присутствие азотсодержащих компонентов, эффективно выявляемых методом тонкослойной хроматографии с помощью селективных красителей.

Список литературы

Lechevalier M. P., de Bievre C., Lechevalier H. A. *Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition* // *Biochem. Ecol. Syst.* — 1977. — Vol. 5. — P. 249–260.

Minnikin D. E., Goodfellow M., Collins M. D. *Lipid composition in the classification and identification of coryneform and related taxa* // *In Coryneform Bacteria. Eds. I. J. Bousfield, A. G. Calley. London, New York, San Francisco: Acad. Press.* — 1978. — P. 85–160.

ЗАДАЧА V ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ФОСФОЛИПИДОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Занятие 6

Определение типа фосфолипидов актинобактерий

Объект исследования. Хлороформ-метанольные экстракты клеток природных изолятов и коллекционных штаммов гордоний, диетций и родококков. (*Получение экстрактов клеток:* 150 мг сухой биомассы + 20 мл смеси хлороформ — метанол (2:1) оставляют на 12 ч).

Реагенты. Хлороформ (хч). Метанол (хч). Ацетон (хч). Уксусная кислота (хч). Аммиак конц. (хч). Вода дистиллированная. 10%-ный метанольный раствор $MgCl_2 \times 6 H_2O$. Стандартные образцы фосфолипидов («Sigma»): фосфатидилсерин, фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, кардиолипин, фосфатидилинозит. Селективные проявители: для обнаружения аминокислотсодержащих фосфолипидов (фосфатидилэтанолламина, фосфатидилсерина) используют нингидриновый реагент (0,2 г нингидрина растворяют в 100 мл *n*-бутанола, содержащего 0,5 мл концентрированной уксусной кислоты); для липидов, содержащих холиновую группу (фосфатидилхолина), — реагент Драгендорфа (реактив А: 1,7 г нитрата висмута + 100 мл уксусной кислоты + дистиллированная вода в соотношении 8:2; реактив Б: 10 г йодида калия + 25 мл дистиллированной воды; затем 20 мл реактива А + 5 мл реактива Б + 70 мл дистиллированной воды); остальных фосфолипидов — молибдатный реагент или реактив Васьяковского (0,5 г молибдата аммония + 5,0 мл дистиллированной воды + 1,5 мл 25% HCl + 2,5 мл 70% HClO₄). После охлаждения полученной смеси при комнатной температуре добавляют ацетон до общего объема 50 мл).

Материалы. Тонкослойные хроматографические пластинки типа *Silufol UV 254* (150×150 мм, «Merck», Германия). Стеклопробирки со шлифом объемом 15 мл. Одноканальный механический дозатор переменного объема (рабочий объем 1–5 мл) с набором наконечников. Стекломикрокапилляры объемом 1,0 мкл (ООО «Прецизионное стекло», Россия). Вакуум-эксикатор. Стеклохроматографические камеры. Линейка. Простой карандаш. Резиновые перчатки. Защитные очки.

Методика. Хлороформ-метанольные экстракты, содержащие липиды, помещают в пробирку с притертой пробкой, упаривают с использованием роторного испарителя при 30 °С до объема 0,2–0,3 мл. Затем добавляют 5,0 мл ацетона и 1,0 мл 10 %-ного метанольного раствора $MgCl_2 \times 6 H_2O$. Пробирку выдерживают в бане со льдом в течение одного часа. Полученную суспензию центрифугируют (2000 об/мин, 5 мин), супернатант удаляют с помощью пипетки. Осадок промывают при перемешивании в 1 мл охлажденного ацетона, центрифугируют (2000 об/мин, 5 мин). Данную операцию повторяют дважды. Осадок, содержащий фосфолипиды, сушат в токе азота в вакуум-эксикаторе над КОН. Высушенный осадок растворяют в 1 мл хлороформа.

На хроматографической пластинке отмечают карандашом место нанесения опытных образцов на линии старта точками через 1,5 см друг от друга. Линия старта должна быть расположена на расстоянии 1,5 см от нижнего края силуфольной пластинки. 10,0 мкл опытного образца наносят при помощи микрокапилляра на стартовую линию в форме линии шириной 10,0 мм, которая менее подвержена искажениям во время развития хроматограммы, чем отдельные пятна. В качестве контроля используют стандартные растворы фосфолипидов, которые также наносятся полоской в объеме 5,0 мкл.

Следует помнить: дозируйте образец с одинаковым стабильным темпом, не спешите и размеренно выполняйте каждый этап цикла дозирования.

Пластинку с нанесенными образцами помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами растворителей. Камеру герметично закрывают крышкой во избежание испарения элюентов.

Следует помнить: для каждой новой пластинки систему растворителей следует готовить заново, так как соотношение в ней компонентов после хроматографирования изменяется.

Для разделения фосфолипидов используют двумерную хроматографию в 2-х системах растворителей: (I) хлороформ — метанол — ацетон уксусная кислота — вода (8:2:8:2:1); (II) хлороформ — метанол — аммиак концентрированный (32,5:12,5:2). Разделение заканчивают, когда фронт растворителей не доходит до верхнего края пластины на 0,3–0,5 см. После разделения фосфолипидов в системе растворителей I пластинку вынимают из камеры, высушивают до исчезновения запаха растворителей, поворачивают на 90° по часовой стрелке и помещают (в другую камеру) в систему растворителей II в направлении, перпендикулярном первому таким образом, чтобы пятна фосфолипидов располагались внизу (рис. 6).

Визуализация пятен фосфолипидов на хроматограмме. Для проявления пятен отдельных фосфолипидов используют селективные реагенты: при



Рис. 6. Двумерная хроматограмма

использовании нингидринового реагента фосфолипиды окрашиваются в красно-фиолетовый цвет; реагента Драгендорфа — оранжевый на белом фоне; молибдатного реагента или реактива Васьяковского — голубой цвет.

Тип фосфолипидов определяют по значениям коэффициента R_f разделенных веществ по формуле (1).

Полученные значения R_f сравнивают с таковыми стандартных образцов фосфолипидов.

Общие требования безопасности при выполнении работы. Все операции проводить в вытяжном шкафу и обязательно в резиновых перчатках. Особую осторожность проявлять при работе с растворителями (глаза обязательно должны быть защищены очками). Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3 %-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Самостоятельно сделать расчеты. Проиллюстрировать полученные данные хроматограммами фосфолипидов. Оформить результаты в виде исследовательского отчета.

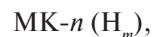
Литература

- Lechevalier M. P., Horan A. C., Lechevalier H. A. Lipid composition in the classification of nocardia and mycobacteria // *J. Bacteriol.* — 1971. — Vol. 105. — P. 313–318.
- Minnikin D. E., Collins M. D., Goodfellow M. Fatty acid and polar lipid composition in the classification of *Cellulomonas*, *Oerskovia* and related taxa // *J. Appl. Bacteriol.* — 1979. — Vol. 47. — P. 87–95.

1.5. Менахиноны бактерий

Менахиноны (витамин K_2) — терпеноидные липиды обнаруживаются в мембранах бактериальных клеток и играют важную роль в транспорте электронов в дыхательных цепях. Структура этих соединений отличается количеством специфических изопреновых единиц в боковой цепи, связанных с хиноновым кольцом, а также числом водородных атомов, насыщающих изопреноидную цепь. Изучение основных различий в структуре менахинонов дает дополнительную информацию для классификации и идентификации коринеформных и нокардиоформных актинобактерий при группировании их на уровне рода. Менахиноновые системы у представителей актинобактерий довольно сложны и различаются по количеству изопреновых единиц в углеводородной цепи менахинона, степени насыщенности и положению двойных связей.

Менахиноны (МК) обозначаются символом



где n — число изопреновых единиц в углеводородной цепи менахинона;
 m — число гидроизопреновых звеньев, умноженное на 2.

Так, у представителей родов *Dietzia* или *Rhodococcus* доминирующим менахиноном является МК-8 (H_2), *Williamsia* или *Mycobacterium* — МК-9 (H_2).

ЗАДАЧА VI

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ МЕНАХИНОНОВ (ВИТАМИНОВ ГРУППЫ К)

Занятие 7

Выявление менахинонов у актинобактерий

Объект исследования. Хлороформ-метанольные экстракты клеток природных изолятов и коллекционных штаммов гордоний, диетций и родококков. (*Получение экстрактов клеток:* 150 мг сухой биомассы + 20 мл смеси хлороформ — метанол (2:1) оставляют на 12 ч).

Реагенты. Ацетон. Петролейный эфир (40–70 °С). Диэтиловый эфир. Хлороформ. Витамин K_2 («Sigma»).

Материалы. Тонкослойные хроматографические пластинки *Kieselgel* 60 F₂₅₄ (10×15 см, «Merck», Германия). Колба с притертой крышкой. Торированные стеклянные капилляры (на 10 мкл). Одноканальный механический дозатор переменного объема (рабочий объем 20–200 мкл) с набором наконечников. Бумажный фильтр (синяя лента). Простой карандаш. Скальпель. Фильтр со стеклянной ватой. Резиновые перчатки. Защитные очки.

Методика. Хлороформ-метанольные экстракты центрифугируют (3000 об/мин, 15 мин). Клеточную биомассу отделяют фильтрацией с использованием бумажного фильтра. Супернатант выпаривают досуха с помощью роторного испарителя «Heidolph LABOROTA 4000» (Германия) при 37 °С. К сухому осадку с помощью дозатора добавляют 0,2 мл ацетона. Нерастворимые в ацетоне соединения отфильтровывают, фильтрат упаривают и наносят полоской шириной 15 мм на хроматографическую пластинку. Линия старта должна быть расположена на расстоянии 1,5 см от нижнего края хроматографической пластинки. Высота подъема фронта растворителя составляет 12,5 см. Выделение менахинонов проводят в системе растворителей: петролейный эфир — диэтиловый эфир (85:15). В качестве хроматографического стандарта используют витамин K_2 .

Идентификацию менахинонов проводят с помощью ультрафиолетового облучателя «LG/58» (Россия). Пятна менахинонов имеют голубой и синий цвет на желто-зеленом фоне. Тип менахинонов определяют по значениям коэффициента R_f разделенных веществ по формуле (1).

Полученные значения коэффициента R_f сравнивают с таковым стандартного образца менахинонов.

Для определения состава менахинонов пятна на пластинках легко обводят простым карандашом и осторожно соскабливают скальпелем. Менахиноны элюируют при помощи хлороформа, вымывающего искомые соединения. Длину изопреноидной цепи и степень гидрированности устанавливают с помощью масс-спектрометрического анализа на масс-спектрометре высокого разрешения типа МХ-1310 (ФГУП ЭЗАН, г. Черноголовка, Россия).

Общие требования безопасности при выполнении работы. Все операции проводить в вытяжном шкафу и обязательно в резиновых перчатках. Глаза должны быть защищены очками. Особую осторожность проявлять при работе с агрессивными реагентами. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3 %-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Заполнить табл. 7. Проиллюстрировать полученные данные хроматограммами менахинонов. Оформить результаты в виде исследовательского отчета.

Таблица 7

Определение типа менахинонов актинобактерий

№	Исследованный штамм	Расстояние, см		Значение R_f
		Старт-фронт растворителя	Старт-менахинонов	

Литература

Collins M. D., Pirouz M., Goodfellow M., Minnikin D. E. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria // *J. Gen. Microbiol.* — 1977. — Vol. 100. — P. 221–230.

Knoppenstedt R. M. Fatty acid and menaquinone analysis of actinomycetes and related organisms // *In Chemical Methods in Bacterial Systematics. Academic Press. Eds. M. Goodfellow, D. E. Minnikin.* — London, UK. 1985. — P. 173–199.

1.6. Чувствительность к антибиотикам

Антибиотики — это вещества биогенного происхождения и их синтетические модификации, обладающие выраженной физиологической активностью в отношении микроорганизмов, в малых количествах избирательно задерживающие рост (бактериостатическое или фунгиостатическое воздействие) или вызывающие их гибель (бактерицидное или фунгицидное действие). Антибиотики природного происхождения чаще всего продуцируются актиномицетами, у которых синтез антибиотических соединений является основным проявлением антагонизма и служит механизмом поддержания равновесия в естественных микробных популяциях. В настоящее время общее число антибиотиков, в том числе полусинтетических, гибридных и мутасинтетических, достигло нескольких десятков тысяч.

В молекулах антибиотиков представлены практически все функциональные группы и структуры, известные в органической химии. Это могут быть азотсодержащие гетероциклические соединения, имеющие в своем составе β -лактамное кольцо (пенициллины, цефалоспорины), аминогликозиды, содержащие аминокислоты и шестичленные циклы (неомицин, канамицин А, гентамицин С), тетрациклины, включающие четыре конденсированных шестичленных кольца, макролиды, имеющие макроциклическое лактонное кольцо, к которому присоединены сахара (эритромицин А), ароматические соединения (хлорамфеникол) и т. д.

По механизму биологического действия антибиотики можно разделить на группы соединений, ингибирующих синтез компонентов клеточной стенки; целостность и функции мембран; синтез нуклеиновых кислот и азотистых оснований; синтез белка; процессы дыхания и окислительного фосфорилирования.

Мишени действия большинства антибиотиков расположены внутри бактериальных клеток. Чтобы достигнуть их, молекулам антибиотических веществ нужно пересечь два важных барьера на пути — клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану. Проникновение антибиотиков через наружную клеточную оболочку происходит обычно путем пассивной диффузии через заполненные водой поры, образуемые специальными белками-поринами, и зависит от молекулярного размера, электрического заряда и гидрофильных свойств проникающих антибиотических соединений. Проникновение антибиотиков через цитоплазматическую мембрану обычно является результатом активного транспорта антибиотических молекул. Активный транспорт осуществляется специальными белками-переносчиками и требует энергетических затрат.

Под антибиотикорезистентностью или антибиотикостойкостью понимают способность микроорганизма противостоять действию антибиотика. Известны различные механизмы антибиотикорезистентности, как то: ферментативная инактивация антимикробного агента; изменение конформации мишени, на которую действует антибиотик; система активного выброса антибиотика из клетки с помощью эффлюксных помп на стадии проникновения через цитоплазматическую мембрану; снижение проницаемости мембраны и др. Генотипическая устойчивость возникает в результате одно- или многоступенчатой мутации в хромосоме или R -плазмидах, а также за счет передачи R -плазмид, транспозонов или участка хромосомы, ответственных за устойчивость, путем конъюгации, трансдукции или трансформации от устойчивой клетки к чувствительной. Мутации или перенос генетического материала, как правило, обуславливают развитие резистентности прокариотных организмов к одному, двум и нередко нескольким антибиотикам.

Данный признак широко используется в классификации бактериальных родов, включающих патогенные виды, идентификации клинических изолятов, характеристике потенциальных биопродуцентов антибиотических веществ. Изучение устойчивости бактерий к разным классам антибиотических веществ методом антибиотикотипирования (антибиограмм) позволяет быстро получить значительную информацию о геноме исследуемых бактерий и использовать ее в таксономических целях. В настоящее время получены данные, подтверждающие таксономическую значимость показателей антибиотикочувствительности, используемых в сочетании с критериями геносистематики. Так, чувствительность к антибиотикам различной природы и спектра действия

имеет значение в родовой и видовой классификации сапротрофных нокардиоформных бактерий.

Преимущества метода антибиотикотипирования: относительная простота исполнения, определенность в интерпретации результатов, гибкий выбор антибиотических веществ, использование химических реагентов и оборудования, отвечающих уровню оснащенности любой диагностической лаборатории. При соблюдении строго стандартизированных условий постановки экспериментов и учета ряда технологических моментов (зависимость диффузионной картины от толщины агарового слоя, полноты прилегания диска к агару, морфологических особенностей бактериальной культуры, ионного состава среды) достигается высокий уровень воспроизводимости результатов.

ЗАДАЧА VII

ВЫЯВЛЕНИЕ УРОВНЯ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КОРИНЕФОРМНЫХ И НОКАРДИОФОРМНЫХ АКТИНОБАКТЕРИЙ

Занятие 8

Определение чувствительности бактерий к антибиотическим веществам дискодиффузионным методом (тест *Kirby Bauer*)

Объекты исследования. Свежевыделенные и коллекционные штаммы *Dietzia* spp., *Gordonia* spp., *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp., предварительно выращенные на мясопептонном агаре.

Реагенты. Набор из 25 бумажных дисков, пропитанных стандартными растворами антибиотических веществ (ампициллина, бензилпенициллина, ванкомицина, гентамицина, доксициклина, канамицина, карбенициллина, клиндамицина, линкомицина, метициллина, мономицина, налидиксовой кислоты, неомицина, новобиоцина, оксациллина, олеандомицина, полициклина, ристомицина, рифампицина, стрептомицина, тетрациклина, фузидина, хлорамфеникола, цефалексина, эритромицина) различного биологического происхождения: образующие бактериями и несовершенными грибами, а также широкого спектра действия на бактериальную клетку. Агаризованная питательная среда.

Материалы. Пробирки со стерильным физиологическим раствором (0,85 % хлорида натрия) для приготовления бактериальных взвесей. Чашки Петри (диаметр 90 или 155 мм) с МПА. Одноканальный механический дозатор переменного объема (рабочий объем 20–200 мкл) с набором наконечников. Бумажные диски, пропитанные антибиотиками. Стерильные стеклянные шпатели. Бактериологические петли. Пинцет. Штатив для пробирок на 10 гнезд. Стеклограф. Миллиметровая линейка.

Методика. Готовят однородную ($\times 10^8$ КОЕ/мл) бактериальную суспензию в физиологическом растворе. Приготовленную суспензию следует использовать в течение 15 мин после приготовления. С помощью дозатора 0,1 мл суспензии наносят на поверхность агаризованной среды. Засев агаризованной среды проводят сплошным газонем с помощью стерильного шпателя, процедуру повторяют дважды, поворачивая чашку Петри на 60° (для ровного распределения инокулята по поверхности агаровой пластинки). Чашку Петри оставляют при комнатной температуре на 15 мин для высушивания и адсорбции бактериальных клеток.

Затем на поверхность агаризованной среды с помощью пинцета помещают бумажные диски на равном (2,5–3,0 см) расстоянии друг от друга и на расстоянии 1,5–2,0 см от края чашки, чтобы свести до минимума возможность перекрытия зон ингибирования роста бактерий. Как правило, на чашку размером 155 мм накладывают не более 12 дисков, а размером 90 мм — до 5 дисков. Меньшее число дисков используют в том случае, если предполагают, что тестируемые организмы будут высокочувствительными. Для обеспечения полного контакта диски следует плотно прижимать к поверхности агара.

Чашки выдерживают при комнатной температуре для лучшей диффузии антибиотиков в толщу агаризованной питательной среды, а затем, уложенные по 5 штук одна на другую в перевернутом виде (агаром вверх), — 24 ч при 28–30 °С.

Антибиотические вещества диффундируют в агар, создавая концентрационный градиент, который понижается по мере удаления от центра бумажного диска. Если исследуемые бактерии чувствительны к данным антибиотикам, то вокруг дисков образуются круглые зоны отсутствия бактериального роста. Чем активнее антибиотик, тем больше зона отсутствия роста. Диаметр зоны измеряют с точностью до миллиметра с помощью миллиметровой линейки от края бумажного диска до края бактериального роста. Размер зоны ингибирования роста бактерий обычно пропорционален минимальной подавляющей концентрации антибиотического вещества. Зона более 30 мм свидетельствует о высокой чувствительности микроорганизма к антибиотик, а менее 12 мм — слабой чувствительности. Антибиотикоустойчивые культуры не образуют стерильных зон.

Следует особо отметить, что дискретные колонии в зоне ингибирования бактериального роста являются свидетельством возможной гетерогенной резистентности исследуемой бактериальной популяции в отношении соответствующего антибиотика либо загрязнения бактериальной культуры. Усиленный рост культуры вокруг диска свидетельствует о зависимом характере роста (антибиотик является фактором роста для данной бактериальной культуры).

Высокочувствительными к данному антибиотику считают микроорганизмы, образующие при его действии зоны задержки роста 25 мм в диаметре, чувствительными — 15–25 мм, малочувствительными — 11–15 мм, устойчивыми — менее 10 мм или полное отсутствие зоны угнетения роста.

Исследование проводят в трехкратной повторности.

Общие требования безопасности при выполнении работы. Строго соблюдать правила обращения с бактериальными культурами (не оставлять открытыми чашки Петри, пробирки с бактериальными взвесями). Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3 %-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Заполнить сводную табл. 8. Провести сравнительный анализ спектров антибиотикочувствительности представителей филогенетически близких родов нокардиоформных бактерий *Dietzia*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, труднодифференцируемых на основании морфологических, культуральных, физиологических признаков. Оформить результаты в виде исследовательского отчета.

Таблица 8

Результаты определения чувствительности бактерий к антибиотическим веществам

Номер штамма	Диаметры зон отсутствия роста, мм									
	Использованные антибиотики									

Литература

- Bauer A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method // *Am. J. Clin. Pathol.* — 1966. — Vol. 36. — P. 493–496.
- Goodfellow M., Orchard V. A. Antibiotic sensitivity of some nocardioform bacteria and its value as a criterion for taxonomy // *J. Gen. Microbiol.* — 1974. — Vol. 83. — P. 375–387.
- Hudzicki J. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. 26.04.2013. [<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer>].

Занятие 9

Идентификация непатогенных актинобактерий на основе анализа антибиограмм с использованием программы *IDENTIFICATION*

Назначение программы. Программа *IDENTIFICATION* предназначена для идентификации актинобактерий по результатам измерения степени их чувствительности к антибиотикам. Программа для персонального компьютера зарегистрирована (Свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2010615181) и разработана сотрудниками кафедры теоретической механики Пермского национального исследовательского политехнического университета (зав. каф., проф. Ю. И. Няшин) и лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (зав. лаб., проф. И. Б. Ившина). Видовая дифференциация бактериальных культур осуществляется на основе компьютерного анализа антибиограмм, в частности по количественным показателям степени чувствительности к одному, двум или трем антибиотикам. При этом программа осуществляет подбор антибиотика либо пары или тройки антибиотиков, дающих максимальную вероятность правильной идентификации штамма.

Область применения программного комплекса — экологическая и медицинская микробиология, биоинформатика, использование в учебном процессе высших и средних профильных учебных заведений при подготовке студентов по специальностям «Микробиология», «Биотехнология», «Компьютерная биомеханика».

Описание программы. В папке «Идентификация» содержатся папки («Антибиотики», «*Buffer files*») и файлы («*Identification.exe*», «Микроорганизмы.txt», «*Identification.hlp*», «*Identification.GI*»). Пользователь работает только с папкой «Антибиотики» и с файлами «*Identification.exe*», «Микроорганизмы.txt» (см. ниже). Для начала работы необходимо скопировать папку «Идентификация» с дискеты в любую директорию жесткого диска и запустить файл «*Identification.exe*».

Объекты исследования. Спектры антибиотикочувствительности свежeweделенных и коллекционных культур актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus* в виде значений (в мм) диаметра зоны ингибирования бактериального роста под воздействием антибиотиков.

Последовательность работы. После запуска файла «*Identification.exe*» открывается форма «Идентификация микроорганизма». Из выпадающего списка «Идентификация по...» выбирается количество антибиотиков, использованных для идентификации (один, два или три). Далее выбираются из соответствующего количества выпадающих списков названия (различные) этих антибиотиков, и вводятся в расположенные

рядом окна значения измеренных диаметров (в мм) зон ингибирования бактериального роста под действием антибиотиков.

Затем следует нажать кнопку «Выполнить идентификацию». В окне «Ответ» появятся названия рода и вида, к которым принадлежит микроорганизм или сообщение «Микроорганизм не принадлежит ни к одному из известных видов».

В соседнем окне будет указана вероятность того, что дан правильный ответ.

Программа может отыскивать антибиотик, пару или тройку антибиотиков, дающих максимальную вероятность правильной идентификации микроорганизма. Для проведения такого поиска необходимо нажать соответствующую кнопку в группе кнопок «Оптимальные ...». При нажатии кнопки «Антибиотик» открывается форма «Оптимальный антибиотик», содержащая первый десяток из возможных антибиотиков в порядке убывания вероятности правильной идентификации микроорганизма по чувствительности к аналогично упорядоченным. Так как отыскание оптимальных пар требует некоторого времени, то в нижней

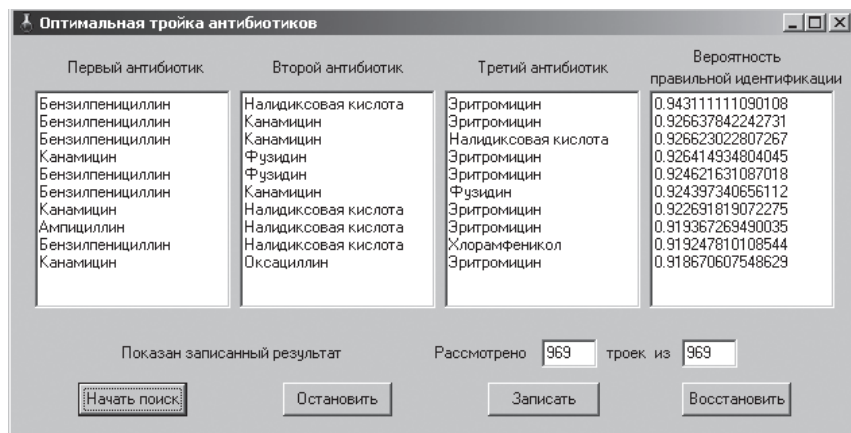
части формы выводятся текущее количество просмотренных пар и их общее количество.

Антибиотик	Вероятность правильной идентификации
Фузидин	0.581841496269687
Эритромицин	0.549231530160653
Карбенициллин	0.537562933157624
Бензилпенициллин	0.53179230564226
Ампициллин	0.523668581372931
Олеандомицин	0.522984100396528
Цефалексин	0.510417591943276
Хлорамфеникол	0.496053852440154
Оксациллин	0.48891633179356
Канамицин	0.488267765300628

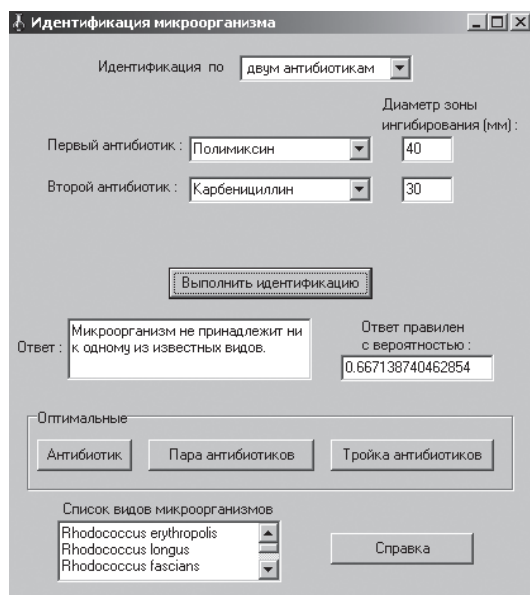
При нажатии кнопки «Пара антибиотиков» открывается форма «Оптимальная пара антибиотиков», содержащая первый десяток из возможных пар антибиотиков.

Первый антибиотик	Второй антибиотик	Вероятность правильной идентификации
Бензилпенициллин	Фузидин	0.84035857616895
Канамицин	Фузидин	0.826123411497307
Ампициллин	Фузидин	0.819082828280346
Карбенициллин	Фузидин	0.811187409584375
Фузидин	Хлорамфеникол	0.805170867406294
Бензилпенициллин	Налидиксовая кислота	0.801204796071242
Бензилпенициллин	Канамицин	0.797925639460445
Канамицин	Эритромицин	0.792069379211398
Олеандомицин	Фузидин	0.788854469368256
Фузидин	Эритромицин	0.788041159142483

При нажатии кнопки «Тройка антибиотиков» открывается форма «Оптимальная тройка антибиотиков», содержащая первый десяток из возможных троек антибиотиков, аналогично упорядоченных.



Поиск этих троек требует значительного времени (несколько часов). Поэтому при открытии данной формы вначале приводится уже найденный и записанный ранее результат. Если требуется получить результат заново (ввиду изменения исходных данных), то нажимается кнопка «Начать поиск». Тогда начнется отыскание требуемых троек, и в нижней части формы будут выводиться текущее количество просмотренных троек и их общее количество. При необходимости можно остановить поиск, нажав кнопку «Остановить». Тогда будет выведен результат, со-

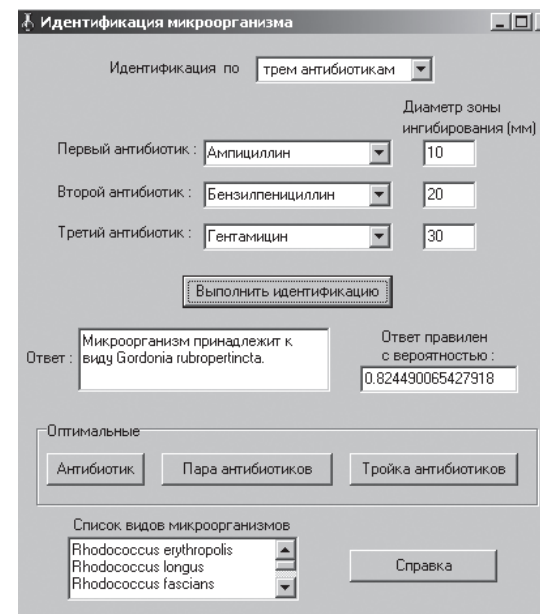


ответствующий рассмотрению лишь части возможных троек. Полученный новый результат можно записать, нажав кнопку «Записать» (тогда он превратится в «Найденный и записанный ранее результат»). Если полученный новый результат не нужен, то в окнах формы можно восстановить записанный ранее результат, нажав кнопку «Восстановить». При нажатии двух последних кнопок запрашивается подтверждение требуемых действий (так как при ошибочной записи теряется ранее записанный результат, а при ошибочном восстановлении теряется полученный новый результат).

В окне «Список видов микроорганизмов» указаны научные наименования видов микроорганизмов, для которых имеются данные по чувствительности к антибиотикам («Известные виды», см. выше).

Для получения справки о программе следует нажать кнопку «Справка».

Для завершения работы программы *IDENTIFICATION* нажимается кнопка «X» в правом верхнем углу формы «Идентификация микроорганизма».



Данные, на основе которых работает программа, содержатся в файле «Микроорганизмы.txt» и в файлах папки «Антибиотики». Пользователь может изменять эти файлы и добавлять новые (для этого следует завершить работу программы *IDENTIFICATION*).

В файле «Микроорганизмы.txt» содержатся научные наименования родов и видов микроорганизмов, для которых имеются данные по ан-

тибиотикочувствительности. Сами данные содержатся в файлах папки «Антибиотики». Каждый файл этой папки имеет название <имя антибиотика>.txt. В файле содержится столько строк, сколько имен содержится в файле «Микроорганизмы.txt»; каждая строка относится к соответствующему микроорганизму. В строке содержится (произвольное) количество разделенных пробелами целых чисел; это — измеренные диаметры (в мм) зон ингибирования для различных штаммов данного микроорганизма при воздействии данного антибиотика (с именем <имя антибиотика>).

Оформление результатов. Заполнить сводную табл. 9. Подготовить заключение по результатам видовой идентификации непатогенных актинобактерий на основе анализа антибиограмм с использованием компьютерной программы *IDENTIFICATION*.

Таблица 9

Результаты определения видовой принадлежности исследованных бактерий

Номер штамма	Видовая принадлежность штамма

Литература

Осипенко М. А., Кулюкина М. С., Ившина И. Б., Потеряева Е. В., Рогожникова Е. Н. Вероятностная модель антибиотикотипирования непатогенных актинобактерий // Российский журнал биомеханики. — 2004. — Т. 8, № 2. — С. 77–84.

2. ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Бактериальные клетки содержат мозаику различных антигенов в цитоплазме, оболочке, капсуле. Наиболее богаты антигенами поверхностные структуры бактерий. Бактерии в пределах рода и вида различаются по антигенной структуре.

Под антигеном понимают чужеродные вещества, индуцирующие в макроорганизме образование антител и способные вступать в специфическую реакцию с гомологичным антителом. Главное в антигене — его иммуногенность, то есть способность вызывать специфический иммунный ответ макроорганизма (образование гомологичных антител). К антигенам относятся белки, полисахариды, некоторые липополисахариды. Стимулировать образование антител к гаптанам и нуклеиновым кислотам можно при условии присоединения этих соединений в качестве носителей к большой белковой молекуле. Специфичность антигенов заключается в способности реагировать только с соответствующими им гомологичными антителами.

Антитела — это белки иммунной сыворотки, иначе иммуноглобулины, образующиеся в организме под воздействием антигена и обладающие свойством специфически с ним связываться. При постановке иммунохимических реакций необходимо наличие бактериальных антигенов и специфических антител, то есть специфических иммунных сывороток, получаемых из крови животных-продуцентов после введения им гетерогенного антигенного материала.

В систематике бактерий существует два подхода к применению иммунохимических методов. Первый состоит в идентификации штаммов на основании сходства или различия антигенов поверхности бактериальной клетки, второй — в определении разнообразия белкового состава и иммунохимических различий между отдельными белками у бактерий различных таксонов.

Основное преимущество иммунохимических методов исследования — их высокая чувствительность и специфичность. В этом отношении они превосходят, пожалуй, современные ферментативные методы анализа. Так, выявляемое в реакции иммунодиффузии минимальное количество антител в пересчете на белковый азот составляет 3,0–9,0 мкг/мл, реакции иммунофлуоресценции — 0,05–0,1 мкг/мл.

Серологические методы играют определяющую роль, прежде всего в медицинской микробиологии, и их применение за рамками медико-биологических исследований долгое время носило ограниченный

характер. Лишь только в течение последних лет они начали широко применяться при решении спорных вопросов систематики труднодифференцируемых таксонов и в экологических исследованиях непатогенных бактерий. Быстрой реализации возможностей иммунохимического анализа препятствует недостаточное знание антигенных особенностей этой группы микроорганизмов.

2.1. Иммунодиффузионный анализ

Метод иммунодиффузионного анализа (метод преципитации в агаре) позволяет дифференцировать отдельные виды и даже штаммы, а также проследить антигенные взаимоотношения между представителями отдельных таксонов. Данный метод, достоинство которого заключается не только в его специфичности, удовлетворительной воспроизводимости результатов, возможности получения быстрого лабораторного ответа и сравнения сложных антигенных комплексов, но и возможности использовать малые объемы антисывороток, что не менее важно при значительных масштабах таксономических исследований, рекомендуется для широкой практики в экспресс-диагностике актинобактерий, в частности отдельных видов родококков.

Следует помнить: метод иммунодиффузии требует большой четкости, тщательности исполнения, последовательности и стандартизации условий работы, так как игнорирование некоторых технических деталей при постановке реакции иммунодиффузии может привести к появлению артефактов, существенно влияющих на интерпретацию данных.

Принцип метода иммунодиффузии в агаровом геле заключается в том, что антиген и антитело, реагируя в агаре, образуют преципитат, который с течением времени проявляется в виде заметной невооруженным глазом линии преципитации при условии, если антиген и антитело взяты в оптимальных соотношениях. При этом число линий преципитации соответствует числу пар антиген-антитело в исследуемой системе.

Реакцию проводят в плоском слое агара, находящегося в чашке Петри. В агаре делают лунки, в одну из которых заливают антисыворотку, в другие — препараты исследуемых антигенов. Антигены и антитела, диффундируя из лунок, встречаются и образуют столько линий преципитации, сколько соответствующих пар антиген-антитело имеется в исследуемой системе. Используя данный вариант метода преципитации в агаре, можно одновременно сравнивать между собой антигены в двух и большем числе препаратов.

На основании сравнительного анализа антигенов выделяется три вида реакции, с которыми чаще всего сталкивается экспериментатор:

реакция идентичности, реакция неидентичности, реакция частичной идентичности.

На рис. 7 приводится схема расположения линий преципитации при сравнительном анализе антигенов с помощью метода двойной иммунодиффузии в агаровом геле, на которой римскими цифрами обозначены варианты возможного взаимодействия преципитатов.

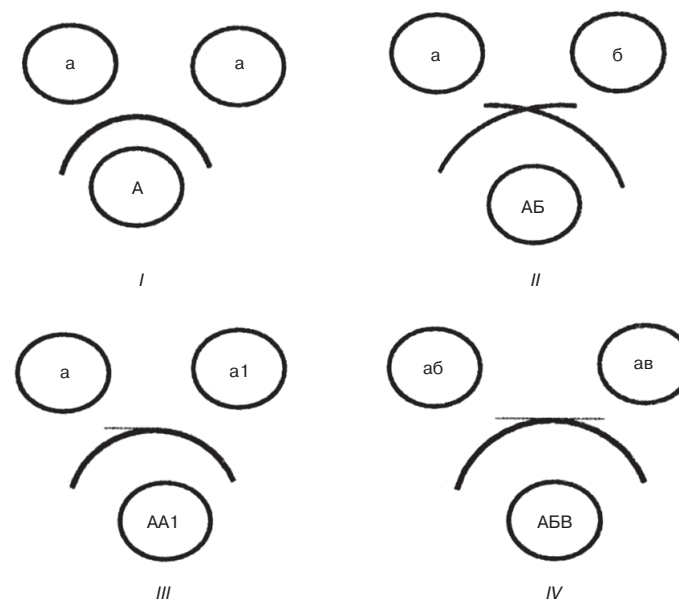


Рис. 7. Схема расположения линий преципитации при сравнительном анализе антигенов методом двойной иммунодиффузии в агаровом геле:

I — реакция идентичности; *II* — реакция неидентичности; *III*, *IV* — реакция частичной идентичности

Реакция идентичности: линии преципитации, образованные антигенами и антисывороткой к ним, сливаются, что указывает на серологическое тождество сравниваемых антигенов (рис. 7I).

Реакция неидентичности: линии преципитации, образованные антигенами и антисывороткой к ним, перекрещиваются, что свидетельствует о серологическом различии сравниваемых антигенов (рис. 7II).

Реакция частичной идентичности: линии преципитации, образованные антигенами и антисывороткой к ним, сливаются, но линия преципитации, образованная одной из этих систем антиген-антитело, дает отросток — истинную «шпору» (рис. 7III, IV). В данном случае можно говорить о частичном серологическом родстве сравниваемых антигенов, но не об идентичности их. Объясняется это тем, что в антисыворотке

содержатся антитела как к общим детерминантам сравниваемых антигенов, так и к детерминанте, отсутствующей у одного из них. Благодаря наличию общих детерминант антигенов происходит слияние линий преципитации, а дополнительная детерминанта одного из них дает с антителами к ней «шпору».

С помощью антисывороток, содержащих большой набор антител к различным антигенам, можно выявить до 10 и более линий преципитации. Антитела в антисыворотках и антигены в испытуемых препаратах должны находиться в эквивалентных соотношениях друг к другу.

ЗАДАЧА VIII

ИДЕНТИФИКАЦИЯ АКТИНОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОДИФфуЗИОННОГО МЕТОДА

Занятие 10

Идентификация актинобактерий методом двойной иммунодиффузии в агаровом геле по Оухтерлони

Объект исследования. Водорастворимые гомогенаты родококков различных видов, полученные при воздействии на клетки ультразвуком (низкочастотный дезинтегратор модели *Soniprep 150 MSE* («SANYO», Япония, 22 кГц, 15 мин) в условиях обязательного охлаждения суспензии). Концентрация белка в гомогенатах, определяемая по методу Лори—Фолина, составляет 25 мг/мл.

Реагенты. Референтные системы «антиген-антитело» (в замороженном виде с добавлением в пропорции 1:10 000 в качестве эффективного антимиicrobialного средства мертиолатата, $C_9H_9O_2SNaHg$, «Sigma»), состоящие из видоспецифических иммунных поликлональных сывороток против *R. coprophilus* ИЭГМ 600^T; *R. erythropolis* ИЭГМ 7^T; *R. opacus* ИЭГМ 716^T; *R. rhodnii* ИЭГМ 555^T; *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^T; *R. ruber* ИЭГМ 70^T; *R. zopfii* ИЭГМ 673^T и гомологичных бактериальных антигенов. Красители: кумасси ярко-голубой R-250, бромфеноловый синий.

Материалы. Чашки Петри (63×12 мм) с плоским слоем (3–4 мм) 1%-ного агара «*Bacto-Agar Difco Laboratories*» на физиологическом растворе. Стеклообразные трубочки емкостью 0,2–0,8 мл с равномерно оттянутыми капиллярными концами. Штамп «семерка» для просечения контуров лунок, состоящий из 7 трубок-пробойников (1 — централь-

ная и 6 — по окружности на расстоянии 8 мм друг от друга) с одного конца остро заточенными краями. Другие концы трубок-пробойников вмонтированы в отверстия плексигласового диска толщиной 4–6 см. Инъекционная игла с наружным диаметром от 0,8 до 1,5 мм, острый конец которой срезан, для отсоса агаровых пробок. Стеклограф. Влажная камера (эксикатор, на дно которого наливают дистиллированную воду с добавлением мертиолатата в качестве антисептика). Вентилятор. Уровень. Пробирки с 0,5 мл физиологического раствора для приготовления разведений бактериального антигена. Защитные очки.

Методика.

1. *Приготовление лунок.* Для просечения контуров лунок (диаметром 3 мм) в агаре применяется стандартный штамп «семерка». Контур лунок просекают вручную. Агар из просеченных лунок отсасывают с помощью инъекционной иглы. *Следует помнить:* агаровые пробки следует отсасывать с большой осторожностью, чтобы не портились края лунок.

2. *Подбор оптимального количества антигена для реакции иммунодиффузии.* Приготовление необходимых двукратных разведений исследуемых водорастворимых гомогенатов бактериальных клеток.

3. *Постановка реакции иммунодиффузии.* В центральную лунку вносят антисыворотку, в периферические — гомологичный антиген и исследуемые антигены с различными вариантами размещения (рис. 8).

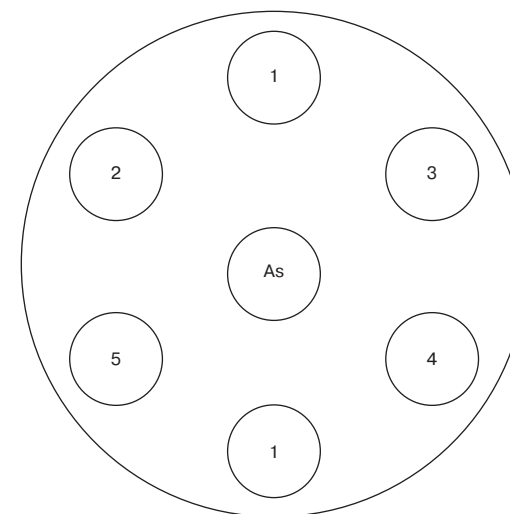


Рис. 8. Схематическое изображение постановки реакции двойной иммунодиффузии в агаровом геле:

As — антисыворотка; 1 — гомологичный антиген;
2, 3, 4, 5 — сравниваемые антигены

Для заполнения лунок используют стеклянные трубочки, в которые набирают необходимые для опыта реагенты.

Следует помнить: заполнение лунок доверху производят быстро и аккуратно, не переливая жидкость через края лунок и не касаясь их.

В лунки в зависимости от их диаметра вмещается от 0,01 до 0,04 мл реагента. Объем жидкости должен быть таким, чтобы мениск полностью исчез. Сразу же после заполнения лунок реагентами чашки Петри помещают во влажную камеру (эксикатор).

Реакция протекает при комнатной температуре (18–20°C), при этом следует избегать резких колебаний температуры в ходе инкубации. Результаты оценивают через 1, 2, 3 сут. Для ускорения реакции чашки Петри можно выдержать в термостате при 37°C, однако линии преципитации в этом случае получаются менее резкими.

4. *Сушка и хранение препаратов.* Препараты отмывают от непрореагировавших компонентов выдерживанием в физиологическом растворе в течение 2–3 сут: физиологический раствор при этом меняют 3–5 раз. Для равномерного удаления из препаратов солей и жидкости на них накладывают фильтровальную бумагу. После высушивания бумагу удаляют, оставшиеся ворсинки смывают дистиллированной водой. Препарат подсушивают на воздухе или досушивают под лампой или феном до полной прозрачности геля. Обработывая препараты солями кадмия, можно усилить невидимые линии преципитации и тем самым повысить чувствительность метода в 2–4 раза. Такой препарат готов для длительного хранения и последующей окраски.

5. *Окрашивание препаратов.* Используют красители, выявляющие белок: (1) кумасси ярко-голубой R-250 или (2) бромфеноловый синий. *Приготовление раствора для окрашивания белков:* (1) кумасси ярко-голубой R-250 — 1,25 г; ледяная уксусная кислота — 50 мл; дистиллированная вода — 185 мл. (2) 10 мг бромфенолового синего растворяют в 10 мл барбиталового буфера. Барбиталовый буфер, 0,08М, рН 8,2: растворяют 12 г 5,5-диэтилнатрийбарбитурата (барбитала натрия) в 800 мл дистиллированной воды; растворяют 4,4 г 5,5-диэтилбарбитуровой кислоты (барбитала) в 150 мл дистиллированной воды при нагревании до 95°C; смешивают оба раствора, доводят рН до 8,2 соляной кислотой, добавляют дистиллированную воду до объема 1 л. Приготовленные растворы хранятся несколько недель в герметично закрытой колбе. Краситель наносят на препараты с отмытым и высушенным гелем, держат до тех пор (около 5–7 мин), пока окрашенный преципитат не будет отчетливо виден на фоне окружающего геля. Затем краситель сливают. Гель с окрашенными линиями преципитации отмывают с использованием растворителя использованного красителя, высушивают с помощью вентилятора.

6. *Фотографирование препаратов.* Зоны преципитации фотографируют в косопадающем свете с использованием осветительного устрой-

ства, специального штатива и цифровой фотокамеры типа «Olympus». При фотографировании зон преципитации следует добиваться равномерности освещения объекта и не допускать попадания в объектив фотоаппарата световых лучей, отраженных от внутренней поверхности осветительного устройства.

Общие требования безопасности при выполнении работы. Особое внимание и осторожность проявлять при работе со стеклянными капиллярами и красителями (глаза должны быть защищены очками). Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3 %-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Графически нанести результаты реакции иммунодиффузии в соответствующие схемы постановки реакции. Заполнить **табл. 10** с использованием следующих обозначений: число плюсов отражает число полос преципитации; «—» — отсутствие общих антигенов; «Ш» — реакция частичной идентичности, образование истинной шпоры. Сопоставить полученные результаты с данными по идентификации исследованных штаммов другими методами бактериальной таксономии.

Литература

Иммунохимический анализ / Под ред. Л. А. Зильбера. — М.: Медицина, 1968. — С. 99–119.

Ившина И. Б., Кеворков Н. Н., Коблова И. В., Нестеренко О. А., Квасников Е. И. Идентификация бактерий рода *Rhodococcus* методом иммунодиффузии // Микробиология. — 1982. — Т. 51, вып. 4. — С. 636–641.

2.2. Иммунофлуоресцентный анализ

Иммунофлуоресцентный анализ получил широкое распространение в различных областях современной биологии и медицины. Этому способствовали такие несомненные его достоинства, как высокая чувствительность, специфичность, универсальность, экспрессность, хорошая воспроизводимость, высокая степень достоверности результатов, что заметно выделяет его среди других методов иммунохимического анализа.

Достаточная чувствительность и четкость реакции иммунофлуоресценции, относительная простота проведения и малое количество времени для ее выполнения (продолжительность реакции иммунофлуоресценции составляет 1,0–1,5 ч, не считая времени, затрачиваемого на приготовление видоспецифических поликлональных антисывороток)

Результаты иммунодиффузионного анализа бактериальных антигенов

Антисыворотка к штамму	Гомогенаты бактериальных клеток								Идентифицируемый штамм X	
	ИЭГМ 600 [†]	ИЭГМ 7 [†]	ИЭГМ 716 [†]	ИЭГМ 555 [†]	ИЭГМ 62 [†]	ИЭГМ 70 [†]	ИЭГМ 673 [†]			
<i>R. sorghophilus</i> ИЭГМ 600 [†]										
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 [†]										
<i>R. oracius</i> ИЭГМ 716 [†]										
<i>R. oracius</i> ИЭГМ 60										
<i>R. oracius</i> ИЭГМ 61										
<i>R. rhodnii</i> ИЭГМ 555 [†]										
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62 [†]										
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 [†]										
<i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 [†]										

Примечание. Здесь и в табл. 11, 12: [†] Типовой штамм.

позволяют за короткий промежуток времени исследовать большое количество чистых культур и образцов природного материала. Данный метод анализа экономичен, позволяет избежать промежутков времени между забором природного образца и исследованием его в лаборатории и незаменим в полевых условиях.

Метод флуоресцирующих антител может быть использован для обнаружения различных корпускулярных антигенов (микроорганизмов) в чистых и смешанных культурах с помощью антител, помеченных флуоресцирующими красителями.

Принцип метода флуоресцирующих антител (метода Кунса), как и любого другого метода иммунохимического анализа, основан на взаимодействии антигена с антителом, с той лишь существенной разницей, что конечный эффект взаимодействия флуоресцирующих антител и антигена может быть зарегистрирован уже в пределах первой специфической (невидимой) фазы иммунологической реакции и при этом на уровне отдельных клеток (бактерий), корпускул антигена, выявляемых в поле зрения люминесцентного микроскопа. Указанные особенности предопределяют многие преимущества метода флуоресцирующих антител в сравнении с другими серологическими тестами, включая потенциально высокую разрешающую способность, специфическую чувствительность, универсальность и экспрессность.

Существуют различные модификации метода флуоресцирующих антител. Исключительное распространение получили лишь прямой и непрямой варианты метода (рис. 9).

Прямой метод флуоресцирующих антител. В основе прямого метода флуоресцирующих антител лежит специфическое взаимодействие меченых антител непосредственно с гомологичным антигеном (микроорганизмом), фиксированным на предметном стекле. Ингредиентная формула метода: *Прямой метод флуоресцирующих антител* (или реакция прямой иммунофлуоресценции) = *Антиген + Флуоресцирующее антитело*. Препарат флуоресцирующих антител представляет собой высушенную лиофильным методом фракцию глобулинов гипериммунной сыворотки, к которым химическим путем присоединен флуорохром — изотиоцианат флуоресцеина. В результате реакции антиген получает способность флуоресцировать (рис. 9А).

При обнаружении антигенов (микроорганизмов) непосредственно в материалах различного биологического или небиологического происхождения (микст-материалах) флуоресцирующие антитела применяются с контрастирующим реагентом — бычьим альбумином, меченным родамином. Необходимость в контрастировании наведенного неспецифического свечения препаратов, приготовленных из микст-материалов, связана с тем, что флуоресцирующие антитела, в силу особенностей их внутримолекулярной организации, способны вызывать интенсивную

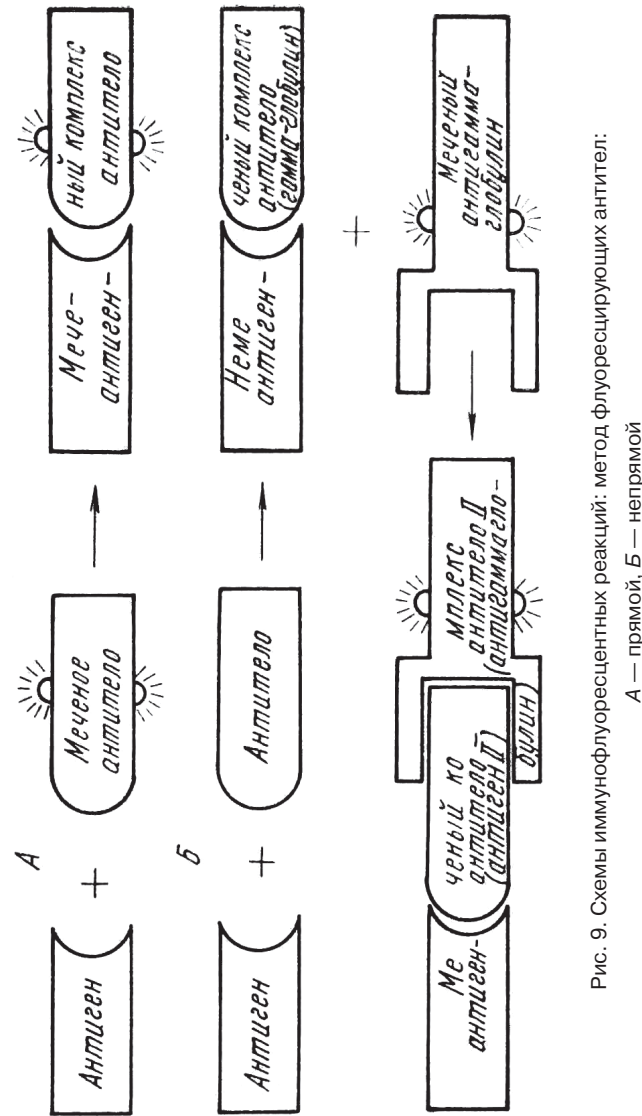


Рис. 9. Схемы иммунофлуоресцентных реакций: метод флуоресцирующих антител.

наведенную неспецифическую флуоресценцию гетерологичных структур («фона») объекта исследования, что затрудняет (а в ряде случаев делает невозможным) обнаружение и достоверную идентификацию искомого антигена.

Прямой метод флуоресцирующих антител используется только для идентификации антигенов (микроорганизмов). Антитела с его помощью выявлять нельзя.

Достоинства и недостатки прямого метода флуоресцирующих антител. Несомненное достоинство прямого метода флуоресцирующих антител в том, что он методически наиболее прост, наименее трудоемок и наиболее экономичен по сравнению с непрямой модификацией метода флуоресцирующих антител. Однако прямой метод флуоресцирующих антител менее чувствителен. Кроме того, его применение связано с необходимостью иметь флуоресцирующие антитела к каждому виду антигена, что в целом значительно увеличивает номенклатуру флуоресцирующих иммунохимических реагентов и таким образом ограничивает возможности тотального использования прямого метода флуоресцирующих антител.

Непрямой метод флуоресцирующих антител (метод Меллорса). Этот метод можно охарактеризовать как двухшаговый или двухэтапный. В основе непрямого метода флуоресцирующих антител лежит специфическое взаимодействие гомологичного антигена с комплементарными антителами немеченой иммунной сыворотки (этап I), которые в дальнейшем специфически реагируют с флуоресцирующими антивидами иммуноглобулинами (этап II). Ингредиенты формулы метода:

Непрямой метод флуоресцирующих антител (или реакция непрямого иммунофлуоресценции) = Антиген + Немеченое антитело + Флуоресцирующие антивидовые иммуноглобулины

Коммерческий препарат флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов представляет собой высушенную лиофильным методом фракцию глобулинов гипериммунной (против сывороточных иммуноглобулинов человека или животных) сыворотки, к которым химическим путем присоединен флуорохром — изотиоцианат флуоресцеина.

Как видно из рис. 9Б, на исследуемом антигене адсорбируется иммунный к нему γ -глобулин нефлуоресцирующей сыворотки, а на нем адсорбируется иммунный к нему γ -глобулин флуоресцирующей сыворотки.

При соединении антигена с соответствующим флуоресцирующим антителом клетка бактерий прочно связывается с флуоресцирующей сывороткой и приобретает способность ярко светиться. Таким образом, реакция специфического связывания антигена с антителом наблюдается бактериоскопически на «одной» клетке.

Достоинства и недостатки двухшагового непрямого метода флуоресцирующих антител. Преимущество данного метода заключается в возможности использования единственной флуоресцирующей сыворотки при наличии большого набора специфических немеченых сывороток для определения антигенов многих видов. При этом достаточно лишь небольших (0,5–1,0 мл) количеств антисывороток к исследуемым антигенам. Непрямой метод флуоресцирующих антител предназначен для обнаружения и идентификации антигенов, а также выявления и титрования комплементарных к ним антител.

Несомненное достоинство непрямого метода флуоресцирующих антител — универсальность, поскольку с его помощью возможна не только идентификация искомого антигена, но и детекция, а также титрование комплементарных к ним антител. При использовании данного метода отпадает необходимость во множестве препаратов флуоресцирующих антител к всевозможным искомым антигенам. Достаточно иметь лишь несколько препаратов антивидовых флуоресцирующих иммуноглобулинов (к глобулинам человека, кролика, мыши и др.), хотя необходимость в наличии диагностических немеченых иммунных сывороток к каждому искомому антигену по-прежнему остается. Для выявления и титрования антител столь же необходимы корпускулярные тест-антигены к каждому искомому антителу.

Непрямой метод флуоресцирующих антител намного (в 10–12 раз) чувствительнее прямого метода флуоресцирующих антител, ибо с каждой молекулой антигена соединяется несколько молекул антител, которые затем выступают в роли антигенов, присоединяющих по несколько молекул флуоресцирующих антител. В то же время он более трудоемок, менее экономичен, требует больше времени для проведения из-за большого количества необходимых контролей.

Следует помнить: при его применении число диагностических ошибок возрастает по сравнению с прямым методом флуоресцирующих антител. Это требует особой осторожности при интерпретации получаемых результатов, особенно в контролях. Для непрямого метода обязательными контрольными препаратами являются антигены, обработанные различными разведениями нормальной сыворотки; антигены, обработанные люминесцирующей антивидовой сывороткой без иммунной немеченой сыворотки и др.

К недостаткам всех вариантов метода флуоресцирующих антител относятся ограниченная чувствительность из-за наличия возможных перекрестных реакций между близкими по антигенному составу объектами и неспецифическая флуоресценция вследствие адсорбции флуоресцирующей сыворотки на различных элементах препарата.

Метод иммунофлуоресценции высокоспецифический, его использование позволяет дифференцировать бактерии на уровне вида. В настоя-

щее время метод флуоресцирующих антител занял определенное место в области идентификации непатогенных микроорганизмов и находит все более широкое внедрение в практике экологической микробиологии. Достаточная чувствительность и четкость реакции иммунофлуоресценции, относительная простота проведения и малое количество времени для ее выполнения (продолжительность реакции иммунофлуоресценции составляет 1,0–1,5 ч, не считая времени, затрачиваемого на приготовление видоспецифических антисывороток) позволяют за короткий промежуток времени исследовать большое количество образцов природного материала. Данный метод анализа экономичен еще и потому, что позволяет избежать промежутков времени между забором природного образца и исследованием его в лаборатории и незамедлительно в полевых условиях. С помощью данного метода удастся обнаруживать микробные клетки из природных образцов на уровне численности 10^4 – 10^5 клеток/мл (г).

ЗАДАЧА IX

ДЕТЕКЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ АКТИНОБАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА

Занятие 11

Иммуноиндикация нокардиоформных актинобактерий в чистой культуре с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител

Объект исследования. Суспензии ($OD_{600} 2,0$) целых клеток коллекционных культур диетций, гордоний, родококков разных видов (в ранней стационарной фазе роста на МПА) в натрий-фосфатном буфере (рН 7,0). Суспензии ($OD_{600} 2,0$) в натрий-фосфатном буфере (рН 7,0) целых клеток гетерологичных бактерий (корпускулярные антигены *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Corynebacterium* sp.) в ранней стационарной фазе роста на МПА.

Реагенты. Немеченые поликлональные гипериммунные сыворотки против *D. maris* ИЭГМ 55^T, *G. rubripertincta* ИЭГМ 95, *R. erythropolis* ИЭГМ 7^T, *R. opacus* ИЭГМ 716^T, *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^T, *R. ruber* ИЭГМ 70^T в замороженном виде с добавлением мертиолата (1:10 000). Коммерческая флуоресцирующая антивидовая диагностическая (антикроличья)

сыворотка производства Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН.

Материалы. Этиловый спирт 96°. 0,15М забуференный раствор хлорида натрия (рН 7,4–7,5). Дистиллированная вода. Предметные стекла. Химические стаканы. Одноканальные автоматические пипетки (дозаторы) на 10–40 мкл с апирогенными наконечниками. Пробирки или полистироловые планшеты. Влажная камера (эксикатор с увлажненной фильтровальной бумагой). Стеклограф. Химически чистый диметилфталат (или анизол) в качестве нефлуоресцирующей иммерсионной среды (применяют при зеленой флуоресценции препаратов). Глицерин (хч).

Оборудование. Световой микроскоп «*Micros MC400F*» (Австрия) с флуоресцентной насадкой, объективом 100× и окулярами 5×, 7× и 10×.

Методика

1. Подготовка реагентов для исследования включает приготовление рабочего разведения флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов; определение рабочего разведения немеченой иммунной сыворотки к искомым антигенам (актинобактериям разных видов).

Приготовление рабочего разведения флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов. Содержимое ампулы растворяют в 0,5 мл дистиллированной воды и получают цельное разведение препарата. При этом образуется прозрачный слегка опалесцирующий раствор желтовато-зеленого цвета без хлопьев и осадка. Необходимое для работы количество антиглобулинового флуоресцирующего конъюгата, взятого в цельном разведении, разбавляют физиологическим раствором до рабочего разведения, указанного на этикетке ампулы. Так, для получения рабочего разведения конъюгата 1:32 к 0,1 мл его цельного разведения следует добавить 3,1 мл физиологического раствора.

Следует помнить: флуоресцирующие антивидовые иммуноглобулины в рабочем разведении могут быть использованы только в течение 6–8 ч.

Определение рабочего разведения немеченой иммунной сыворотки к искомому антигену. На обезжиренных предметных стеклах, расчерченных на восемь квадратов, в пределах каждого квадрата готовят тонкий мазок из взвеси актинобактерий *D. maris* ИЭГМ 55^T, *G. rubripertincta* ИЭГМ 95^T, *R. erythropolis* ИЭГМ 7^T, *R. opacus* ИЭГМ 716^T, *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^T, *R. ruber* ИЭГМ 70^T, содержащей $5 \cdot 10^5$ клеток/мл). Мазки подсушивают в вертикальном положении при комнатной температуре на воздухе и фиксируют погружением в этиловый спирт. Время фиксации составляет 15 мин при комнатной температуре. Для дальнейшей обработки предметные стекла помещают во влажную камеру.

Следует помнить: в случае необходимости полученные таким образом препараты до окраски их флуоресцирующей сывороткой можно хранить в сухом месте длительное время (до 2 мес).

Далее видоспецифические антисыворотки размораживают при комнатной температуре.

Следует помнить: после размораживания образцы антисывороток необходимо тщательно перемешать.

В лунках полистироловых планшетов или стеклянных пробирках из цельного разведения каждой антисыворотки готовят ряд последовательных двукратных разведений (1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512). Для этого отбирают пипеткой 40 мкл исходного раствора антисыворотки и помещают в первую лунку на планшете (пробирку); в остальные 8 лунок вносят по 20 мкл физиологического раствора и делают последовательные двукратные разведения по схеме, перенося по 20 мкл раствора антител из одной лунки в другую пипеткой, каждый раз тщательно перемешивая вновь полученное разведение.

Следует помнить: каждый образец антисыворотки отбирается с использованием индивидуального наконечника. Можно добиваться высокой степени точности и воспроизводимости результатов от образца к образцу, если жидкость будет полностью выходить из пипетки, вся до последней капли, не оставаясь на наконечнике. При этом необходимо, чтобы кончик наконечника опирался на стенку сосуда, так как это уменьшает или полностью устраняет возможность удержания образца в наконечнике. Вынимайте пипетку, скользя наконечником вдоль боковой стенки, чтобы удалить последние капли с отверстия наконечника. Содержимое лунок перемешивать осторожно круговыми движениями планшета по поверхности рабочего стола в течение 20 с. При этом не допускать разбрызгивания жидкости в лунках.

На фиксированные мазки последовательно наносят по одной капле каждого разведения немеченой видоспецифической иммунной сыворотки, начиная с максимального, и камеру закрывают. Взаимодействие антигенов с антителами используемых в работе антисывороток происходит при комнатной температуре (18–20°C) в течение 20 мин.

После этого излишек антисыворотки, нанесенной на мазки, смывают физиологическим раствором. Препараты в целях удаления несвязавшихся остатков иммунной сыворотки помещают в стакан с физиологическим раствором, где их отмывают в течение 15 мин, при этом дважды меняя раствор. Отмытые препараты споласкивают дистиллированной водой и высушивают в вертикальном положении на воздухе при комнатной температуре.

Затем препараты (в сущности, комплекс «антиген — антитело») вновь помещают во влажную камеру и на каждый из мазков наносят по одной капле флуоресцирующей сыворотки, взятой в рабочем разведении, указанном на этикетке ампулы. Взаимодействие ингредиентов происходит в закрытой влажной камере в течение 20 мин при комнатной температуре. После этого нанесенные на мазки капли флуоресцирующего

конъюгата смывают физиологическим раствором. Препараты помещают в стакан, где их отмывают физиологическим раствором в течение 15 мин, дважды меняя раствор. Отмытые препараты споласкивают дистиллированной водой и высушивают при комнатной температуре.

Следует помнить: при изучении каждого нового объекта следует начинать с титрования немеченой антисыворотки и конъюгата меченых антител методом так называемой «шахматной доски», при котором берут различные сочетания разведений антисыворотки и конъюгата, что позволяет подобрать оптимальные условия для иммунореакции.

Учет и оценку результатов проводят в поле зрения флуоресцентного микроскопа, просматривая 20–40 полей зрения. Оценка интенсивности специфичности свечения тест-антигенов проводят по общепринятой четырехкrestной шкале:

Яркость и цвет специфической флуоресценции	Шкала оценки флуоресценции
Очень яркая (сверкающая) флуоресценция изумрудно-зеленого цвета по периферии клетки. Морфология клетки выявляется четко.	++++
Отчетливо выраженная, достаточно яркая флуоресценция зеленого цвета по периферии клетки. Морфология клетки выявляется четко.	+++
Умеренная флуоресценция по периферии клетки. Морфология клетки выявлена недостаточно четко.	++
Слабая флуоресценция клетки. Морфология клетки выявлена нечетко.	+
Специфическая флуоресценция отсутствует.	–

За титр немеченой иммунной сыворотки принимают ее максимальное разведение, при котором наблюдается свечение корпускулярных тест-антигенов (актинобактерий) не ниже чем на 3+. *Рабочее разведение* такой сыворотки в два раза концентрированнее ее титра. Так, если титр используемых антисывороток 1:128 или 1:512, то их рабочее разведение 1:64 или 1:256 соответственно.

2. *Работа по выявлению и идентификации антигенов* (актинобактерий) проводится в следующей последовательности: приготовление препаратов из взвеси исследуемых бактерий; фиксация препаратов; иммунофлуоресцентное окрашивание препаратов с использованием немеченых антисывороток в установленных рабочих разведениях.

Схема анализа сходна с той, что представлена выше: на предметных стеклах, размеченных стеклографом на восемь квадратов, готовят мазки из взвеси исследуемых бактерий, мазки высушивают и фиксируют эта-

нолом; препараты сначала обрабатывают немеченой иммунной сывороткой в рабочем разведении (например, 1:64 или 1:128), которая реагирует с соответствующими гомологичными антигенами; несвязавшиеся белки отмывают и наносят флуоресцирующую сыворотку в установленном рабочем разведении, указанном на этикетке ампулы; после 20-минутной экспозиции препараты промывают и высушивают по описанной выше методике.

Приготовленные таким образом препараты просматривают в поле зрения флуоресцентного микроскопа. При положительном результате образуется комплекс «антиген — немеченое антитело — флуоресцирующие антивидовые иммуноглобулины». Перед просмотром на препараты наносят каплю раствора, содержащего 1 часть 0,15М раствора хлорида натрия и 9 частей глицерина и закрыть покровным стеклом.

Следует помнить: препараты можно просматривать и без покровных стекол; просмотр препаратов одного и того же поля зрения целесообразно сочетать одновременно в люминесцентном микроскопе (освещение сверху) и в фазово-контрастном устройстве (освещение снизу) для определения наличия в препарате бактериальных клеток, неокрашенных флуоресцентной сывороткой.

(3). *В качестве контролей иммунологической специфичности используют:* (А) препараты исследуемых штаммов бактерий, обработанные только флуоресцирующей антикриличьей сывороткой (*контроль флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов*); (Б) препараты гетерологичных бактерий (представителей *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp. или *Corynebacterium* sp.), обработанные немеченой антисывороткой к искомому антигену (например, *R. ruber*) с последующим окрашиванием флуоресцирующей сывороткой (*контроль немеченой иммунной сыворотки*); (В) препараты, заведомо содержащие искомый антиген (например, *R. ruber*), последовательно обработанные немеченой антисывороткой к искомому антигену и флуоресцирующей сывороткой (*заведомо положительный контроль*).

Следует помнить: использование высоких разведений антисывороток, которые не проявляют неспецифического свечения, позволяет в дальнейшей работе избежать трудоемкой процедуры многократного их истощения гетерологичными бактериальными штаммами.

Общие требования безопасности при выполнении работы. Особую осторожность и внимание проявлять при работе со стеклянными ампулами. Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3%-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Учет результатов ведут визуально на основе оценки интенсивности специфического свечения, просматривая во флуоресцентном микроскопе не менее 10 полей зрения. Интенсивность

специфического свечения оценивают по четырехкrestной системе: (4+) — наиболее яркое свечение контура; (3+) — яркая специфическая флуоресценция периферии клеток; (2+) — умеренное; (+) — слабое свечение; (–) — отсутствие флуоресценции клеток. Результат считается положительным, если в каждом поле зрения обнаружено не менее 3–5 клеток с интенсивностью свечения не ниже, чем на 3+. В контрольных препаратах (А и Б) специфическое свечение должно отсутствовать. В контроле В должна наблюдаться специфическая флуоресценция искомого антигена не ниже, чем на 3+. Результаты иммунофлуоресцентного анализа исследованных штаммов занести в табл. 11. Подготовить заключение по результатам иммунофлуоресцентной диагностики штамма X, оценить достоинства и недостатки метода, а также результаты собственной работы.

Занятие 12

Выявление и дифференциация родококков в составе смешанных популяций непрямым методом флуоресцирующих антител

Объект исследования. Суспензии ($OD_{600} 2,0$) целых клеток коллекционных культур родококков разных видов (в ранней стационарной фазе роста на МПА) в натрий-фосфатном буфере (pH 7,0), против которых были получены видоспецифические гипериммунные сыворотки. Суспензии ($OD_{600} 2,0$) целых клеток представителей гетерологичных бактерий (корпускулярные антигены *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Corynebacterium* sp.) в натрий-фосфатном буфере (pH 7,0). Заведомо инфицированный природный материал (образцы воды из открытых водоемов в стерильной колбе емкостью 500 мл).

Реагенты. Немеченые моновалентные иммунные сыворотки против отдельных видов родококков (*R. erythropolis*, *R. opacus*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*) в рабочем разведении 1:64–1:128. Немеченые поливалентные (двух- или трехкомпонентные) антисыворотки (смесь нескольких индивидуальных специфических антисывороток, смешанных в соотношении 1:1). Коммерческая флуоресцирующая антивидовая диагностическая (антикроличья) сыворотка в рабочем разведении 1:4 производства Института эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи РАМН. Контрастирующий краситель — альбумин, меченный родамином.

Материалы. 96°-ный этанол. 0,15М забуференный физиологический раствор (pH 7,4–7,5). Дистиллированная вода. Предметные стекла.

Таблица 11

Результаты иммунофлуоресцентного анализа исследованных штаммов с диагностическими иммунными сыворотками

Антисыворотка к штамму	Предельные титры антител, определяемых в гомологичной и гетерологичной системах							
	ИЭГМ 600†	ИЭГМ 55†	ИЭГМ 95†	ИЭГМ 7†	ИЭГМ 716†	ИЭГМ 62†	ИЭГМ 70†	Идентифицируемый штамм X
<i>R. coprophilus</i> ИЭГМ 600†								
<i>D. maris</i> ИЭГМ 55†								
<i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95†								
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7†								
<i>R. opacus</i> ИЭГМ 716†								
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62†								
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 70†								

Примечание. Приводятся титры антител — максимальные разведения антисывороток, при которых наблюдалось специфическое свечение интенсивностью не менее 3+.

Химические стаканы. Пипетки. Пробирки или полистироловые планшеты. Влажная камера (экзикатор). Стеклограф. Химически чистый диметилфталат (или анизол) в качестве нефлуоресцирующей иммерсионной среды. Глицерин (хч).

Оборудование. Световой микроскоп «*Micros MC400F*» (Австрия) с флуоресцентной насадкой, объективом 100× и окулярами 5×, 7× и 10×.

Методика

1. *Подготовка природного материала к анализу.* 50 мл исследуемого водного образца центрифугируют при 4 500 об/мин в течение 30–45 мин. Осадок разбавляют минимальным количеством физиологического раствора, и полученный таким образом жидкий материал используют для приготовления мазков.

Схема анализа во многом сходна с той, что представлена выше.

2. *Приготовление рабочего разведения флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов и рабочего разведения немеченой иммунной сыворотки к искомым антигенам* (родококкам) (см. Занятие 11).

При выявлении искомого антигена (родококков отдельных видов) в водном образце наилучшим способом устранения (наведенного) неспецифического свечения, вызываемого флуоресцирующими антителами, или «тушения» является прием контрастирования с помощью бычьего альбумина, меченого родамином. С этой целью на мазки наносят смесь флуоресцирующей сыворотки и бычьего альбумина, меченого родамином. При этом особое внимание следует уделять правильному выбору рабочей дозы меченого альбумина, точнее — подбору оптимальных соотношений рабочих разведений флуоресцирующих антител и меченого альбумина.

3. *Определение оптимального соотношения рабочих разведений флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов и бычьего альбумина, меченого родамином.* На обезжиренных предметных стеклах, расчерченных на восемь квадратов, в пределах каждого квадрата готовят мазки из природной воды, заведомо содержащей искомым микроорганизм, и фиксируют в 96°С этаноле в течение 15 мин при комнатной температуре. Высохшие после фиксации препараты помещают во влажную камеру и на мазки наносят по одной капле немеченой антисыворотки, взятой в рабочем разведении. Взаимодействие антигена с антителами антисыворотки происходит при комнатной температуре в течение 20 мин. После этого несвязавшиеся остатки антисыворотки, нанесенной на мазки, смывают физиологическим раствором. Препараты помещают в химический стакан, где их отмывают физиологическим раствором в течение 15 мин, дважды меняя раствор. Отмытые препараты споласкивают дистиллированной водой, высушивают на воздухе в вертикальном виде при комнатной температуре. После этого препараты вновь помещают во влажную камеру.

В лунках полистиролового планшета или пробирках предварительно готовят ряд последовательных двукратных разведений бычьего альбумина, меченого родамином, в объеме 0,1 мл. Затем в лунки добавляют по 0,1 мл флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов, взятых в двукратном рабочем разведении (предварительно разведенных до концентрации, в четыре раза превышающей их красящий титр). Ингредиенты тщательно перемешивают.

На мазки, помещенные во влажную камеру, наносят по одной капле приготовленной смеси каждого разведения, и камеру закрывают. Взаимодействие ингредиентов происходит в течение 20 мин при 37°С. Процедуру отмывания и высушивания мазков проводят по описанной выше методике.

Учет и оценку результатов проводят в поле зрения флуоресцентного микроскопа, просматривая не менее 10 полей зрения. При этом выбирают то оптимальное соотношение рабочих разведений флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов и бычьего альбумина, меченого родамином, при котором наблюдается яркое (не ниже чем на 3+) свечение зеленого цвета на фоне кирпично-красной флуоресценции гетерологичных структур объекта исследования.

4. *Приготовление смеси рабочих разведений флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов и бычьего альбумина, меченого родамином.* Флуоресцирующие антивидовые иммуноглобулины и меченый альбумин готовят в разведении в 2 раза концентрированнее рабочего, определенного опытным путем, а затем смешивают друг с другом в равных объемах. Пример: рабочее разведение флуоресцирующих иммуноглобулинов 1:32, меченого бычьего альбумина — 1:16. Следовательно, для приготовления смеси флуоресцирующие иммуноглобулины необходимо приготовить в разведении 1:16, а меченый альбумин — 1:8. После смешивания ингредиентов в равных объемах рабочее разведение флуоресцирующих иммуноглобулинов становится 1:32, а меченого альбумина — 1:16.

5. *Постановка опыта и контролей специфичности реакции.*

Этап I. Приготовленные и фиксированные препараты из исследуемого природного материала помещают во влажную камеру и на мазки наносят по капле немеченой антисыворотки, взятой в рабочем разведении. Камеру закрывают и выдерживают при комнатной температуре в течение 20 мин. После этого препараты отмывают и высушивают в соответствии с процедурой, описанной выше (см. п. 3). (При положительном результате на этапе I образуется комплекс «антиген — антитело».)

Этап II. Высохшие препараты вновь помещают во влажную камеру и на мазки наносят по одной капле приготовленной смеси рабочих разведений флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов и меченого альбумина, камеру закрывают и после 20-минутной экспозиции препараты отмывают и высушивают.

Готовые («окрашенные») препараты просматривают в поле зрения флуоресцентного микроскопа. (При положительном результате на этапе II образуется комплекс «антиген — немеченое антитело — флуоресцирующие антивидовые иммуноглобулины»).

Следует помнить: готовые («окрашенные») препараты не хранят и по возможности тотчас же исследуют во флуоресцентном микроскопе. В исключительных случаях на сухие препараты наносят 90 %-ный раствор глицерина, забуференного при рН 7,4 (на девять частей химически чистого глицерина одна часть забуференного физиологического раствора). Препараты закрывают покровными стеклами, края которых парафинируют. Приготовленные таким образом препараты могут сохраняться при 4°С в продолжение не более 2 мес без потери специфичности и пригодности.

Постановка опыта сопровождается обязательными видами *контроля*.

А. Контроль немеченой иммунной сыворотки. Мазки, содержащие тест-антиген гетерологичного вида бактерий (*Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp., *Corynebacterium* sp.), последовательно обрабатывают немеченой иммунной сывороткой к искомому антигену и смесью флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов и меченого альбумина. Результат *отрицательный*.

Б. Контроль флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов. Мазки, содержащие искомый антиген, обрабатывают смесью флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов и меченого альбумина. Результат *отрицательный*.

В. Контроль исследуемого материала. Мазки, приготовленные из исследуемого природного материала, обрабатывают смесью флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов и меченого альбумина. Результат *отрицательный*.

Г. Заведомо положительный контроль. Мазки, заведомо содержащие искомый антиген, последовательно обрабатывают немеченой иммунной сывороткой к искомому антигену и смесью флуоресцирующих антивидовых иммуноглобулинов и меченого альбумина.

Общие требования безопасности при выполнении работы. Особую осторожность и внимание проявлять при работе со стеклянными ампулами (глаза обязательно должны быть защищены очками). Рабочий стол следует дезинфицировать не только до начала работы, но и после ее окончания. Для обработки рабочего стола использовать 0,5–3 %-ный водный раствор хлорамина.

Оформление результатов. Учет результатов ведут визуально на основе оценки интенсивности специфического свечения, просматривая во флуоресцентном микроскопе не менее 10 полей зрения. Используют четырехкрестную шкалу оценки интенсивности специфической флуоресценции: результат считается положительным, если в большинстве

полей зрения обнаружено не менее 3–5 клеток с интенсивностью свечения не ниже, чем на 3+. В контролях А–В специфическое свечение должно отсутствовать. В контроле Г должна наблюдаться специфическая флуоресценция искомого антигена не ниже, чем на 3+. Результаты обнаружения и количественного учета родококков отдельных видов в исследуемом природном субстрате занести в **табл. 12**.

Литература

Барбан П. С., Пиеничнов Р. А., Пантюхина А. Н., Ившина И. Б. Иммунофлуоресцентный анализ. — Свердловск : УрО АН СССР, 1988. — 175 с.

Таблица 12

Результаты индикации и дифференциации родококков в смешанных природных популяциях с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител

Характеристика исследованного образца	Наличие бактерий, учитываемое непрямым методом флуоресцирующих антител с антисывороткой к штамму					
	<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 [†]	<i>R. oracius</i> ИЭГМ 716 [†]	<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62 [†]	<i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 [†]	<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 [†] + <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 [†]	<i>R. oracius</i> ИЭГМ 716 [†] + <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 [†]

Примечание. «-» — не обнаружено; «4+» — десятки флуоресцирующих клеток в поле зрения; «3+» — единицы флуоресцирующих клеток в поле зрения; «2+» — единицы флуоресцирующих клеток в нескольких полях зрения; «1+» — единицы окрашенных клеток в десятках полей зрения. Положительным результатом считается флуоресценция клеток интенсивностью не менее 3+.

Словарь

Адсорбция (*adsorption*) — поглощение веществ на поверхности твердого или жидкого тела.

Аксеничная (чистая) **культура** (*axenic culture*) — культура, содержащая микроорганизмы одного вида. Если в культуре содержится более одного вида микроорганизмов, она носит название ксеничной (*xenic culture*) или смешанной.

Адьювант (*adjuvant*) — вещество, используемое для усиления иммунного ответа при введении одновременно с антигеном. Наиболее широко используемые адьюванты — соединения алюминия, минеральные масла и инактивированные микобактерии. Неполный адьювант Фрейнда представляет собой водно-жировую эмульсию, содержащую вазелиновое масло, ланолин и эмульгатор. Усиление иммунного ответа при использовании адьюванта связано с депонированием антигена и дополнительной стимуляцией вспомогательных звеньев иммунного ответа.

Аналитическая система (*assay system*) — все компоненты, оборудование, приспособления и методика анализа.

Антиген (*antigen*) — вещество, которое связывается обратимо и нековалентно с соответствующими специфическими антителами.

Антигенная детерминанта (*antigenic determinant*) — небольшой участок молекулы антигена, обычно олигосахаридной или пептидной природы, имеющий стабильную стереохимическую структуру и определяющий специфичность иммунного ответа животного организма на антиген и специфичность соединения антигена с антителом или (и) соответствующими рецепторами Т- и В-лимфоцитов. Молекула антигена может иметь на своей поверхности несколько (от единиц до десятков) одинаковых или структурно отличающихся антигенных детерминант.

Антитела (*antibodies*) — белки, продуцируемые лимфоцитами В, обладающие способностью избирательно и специфично связываться с гомологичными антигенами и которые можно использовать для обнаружения или количественного определения антигена.

Бумажная хроматография (*paper chromatography*) — сорбционный динамический метод разделения смесей веществ на полосках бумаги специальных сортов. Принцип метода хроматографии на бумаге основан на различии в коэффициентах распределения (R_f) анализируемых веществ между органической и водной фазами.

Буферный раствор (*buffer*) — раствор, состоящий из слабой кислоты и сильно ионизированной соли той же кислоты или слабого основания

и его соли. Данная система препятствует изменениям pH при добавлении небольших количеств свободной сильной кислоты или щелочи, при разбавлении или концентрировании.

Вид (*species*) — таксономическая категория, ограничивающая монофилетическую и генотипически объединенную группу индивидуальных организмов из разных местообитаний или группу генетически родственных коллекционных штаммов, имеющих высокую степень сходства разнообразных независимых признаков, определяемых экспериментально в строго стандартизированных условиях. В качестве молекулярных критериев вида рассматривают результаты ДНК–ДНК-гибридизации, сравнительного анализа последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК, а также функциональных генов.

Воспроизводимость результатов аналитической системы (*reproducibility of results in an assay system*) — степень соответствия данного ряда измерений последующим измерениям в одной аналитической системе. Воспроизводимость оценивается количественно как стандартное отклонение или коэффициент вариации. Воспроизводимость можно рассматривать как меру разброса результатов анализов. Воспроизводимость следует измерять при различных концентрациях определяемого вещества (см. Точность, Достоверность).

Восходящая бумажная хроматография (*ascending paper chromatography*) — распространенный вид хроматографии; основан на том, что фронт хроматографической системы движется снизу-вверх; при этом в качестве хроматографической камеры используется любая емкость с плоским дном и герметично закрывающейся крышкой, в которую свободно помещаются полоски бумаги.

Гаптен (*hapten*) — вещество, являющееся антигеном (т. е. связывающееся обратимо и нековалентно с соответствующими специфическими антителами), но само по себе не обладающее иммуногенностью (способностью стимулировать образование антител).

Гетерогенность (*heterogeneity*) — разнообразие химического состава или молекулярных форм, или структур.

Двумерная хроматография (*two-dimensional chromatography*) — вариант бумажной или тонкослойной хроматографии; особенностью ее является применение двух различных растворителей, которые пропускают по бумаге поочередно во взаимно перпендикулярных направлениях.

Достоверность (*accuracy*) — мера близости или рассчитанного количества вещества к истинной величине. На практике достоверность анализа выражают два параметра: точность (*precision*) и отклонение (*bias*) или воспроизводимость (см. Точность, Воспроизводимость).

Жирные кислоты разветвленные (*branched fatty acids*) — терминально разветвленные жирные кислоты, обладающие изо-конфигурацией ($R-CH_3CH_2$) или антеизо-конфигурацией ($R-CH_3CH_2H_3$).

Жирные насыщенные кислоты (*saturated fatty acids*) — жирные кислоты, содержащие концевую метильную группу ($-CH_3$), разное число метиленовых групп ($-CH_2-$) и концевую карбоксильную группу ($-COOH$). Длина углеводородной цепи обычно варьирует от C_{14} до C_{22} . У бактерий встречаются разветвленные жирные кислоты и гидроксикислоты, например, полимеры гидроксимасляной кислоты.

Жирные ненасыщенные кислоты (*unsaturated fatty acids*) — жирные кислоты, содержащие одну (моноеновые) или более (полиеновые) двойных связей, которые, как правило, находятся в *цис*-конфигурации.

Идентификация (*identification*) — процесс определения систематического положения выделенной из какого-либо источника чистой бактериальной культуры до уровня вида. Другими словами, процесс установления того, принадлежит ли неизвестный объект к одному из уже определенных объектов. Это означает, что идентификация зависит от адекватной характеристики исследуемого бактериального штамма.

Иммуноанализ (*immunoassay*) — метод анализа, основанный на обратимом и нековалентном связывании антигена с антителами. С помощью иммуноанализа можно идентифицировать антитела, качественно и количественно определять антигены. Термин чаще всего используется для методик анализов, в которых меченое и немеченое определяемые вещества конкурируют между собой за связывание с ограниченным числом специфических центров антител.

Иммунореактивность (*immunoreactivity*) — термин, используемый для обозначения способности определенного антигена связываться с антителами или определенного антитела связываться с антигеном.

Иммунофлуоресцентный метод в микробной экологии (*immunofluorescence method in microbial ecology*) — метод, используемый в микробиологии для мониторинга за прокариотными организмами в природных местообитаниях (почве, воде, ризосфере и т. д.). Метод основан на адсорбции специфических антител, конъюгированных с флуоресцеином, на прокариотных клетках, что позволяет обнаруживать их с помощью флуоресцентного микроскопа при соответствующей длине волны и осуществлять количественный учет живых клеток.

Иммунофлуоресценция (*immunofluorescence*) — феномен, основанный на визуализации клеток, несущих антигены, с помощью антител, меченных флуорохромами. Феномен положен в основу иммунофлуоресцентного микроскопического анализа.

Инокуляция (*inoculation, seeding*) — внесение живых микроорганизмов в стерильную питательную среду.

Коллекционный штамм (*collection strain*) — популяция прокариотных клеток, являющаяся объектом долгосрочного хранения или исследования в результате однократного выделения из природного материала.

Коринеформные бактерии (*coryneform bacteria*) — неподвижные, грамположительные, не образующие спор актинобактерии с тенденцией к ветвлению. Имеют форму неправильных палочек, коккоидов или коротких нитей. Некоторые имеют морфогенетический цикл «палочки-кокки». Аэробы, факультативные анаэробы или облигатные анаэробы. Хемоорганогетеротрофы, получающие энергию за счет аэробного дыхания, брожения или фумаратного дыхания. В состав группы входят свободноживущие сапротрофные формы, являющиеся продуцентами аминокислот, витаминов и активно участвующие в разложении органических веществ (пластмасс, гербицидов, нефтяных углеводородов и др.), а также представители нормальной микрофлоры кожи человека, обитатели желудочно-кишечного тракта, рубца и ротовой полости. Отдельные виды патогенны для человека, например, возбудитель дифтерии (*Corynebacterium diphtheria*), фарингита, актинوميкоза и пародонтита (род *Actinomyces*) и для растений. К коринеформным бактериям (фила *Actinobacteria*) относят роды *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium* и др.

Красители (*dyes*) — химические вещества природного или синтетического происхождения, окрашивающие цитоплазму клетки прокариот и ее структуры. Для окрашивания применяют различные красители: основные (фуксин, сафранин, метиленовый синий, генциан фиолетовый, янус зеленый, хризоидин и др.) с ауксохромной группой NH_2 , реагирующие со структурами с отрицательными зарядами (нуклеоид, клеточная стенка), и кислые (эозин, эритрозин, нигрозин, конго, флуоресцин и др.), реагирующие со структурами, несущими положительный заряд (цитоплазма). В микробиологической практике чаще всего применяют основные анилиновые красители (метиленовый синий, кристаллический фиолетовый, основной фуксин и др.).

Красящий титр (*the optimum titre or dilution*) — то максимальное разведение флуоресцирующей сыворотки, которое обеспечивает яркое (4+ и 3+) иммунофлуоресцентное окрашивание микробных клеток.

Классификация (*classification*) — результат действия, позволяющего упорядоченное распределение множества организмов в классы эквивалентности (таксоны) на основании сходства. Предпосылкой классификации является адекватное описание штаммов, на основе которого проводят сравнение и разграничение рассматриваемых систематических единиц.

Культивирование периодическое (*batch cultivation*) — способ выращивания бактерий в жидкой питательной среде в закрытых сосудах от момента инокуляции до окончания роста без обновления питательной среды. В периодической культуре клеточная популяция проходит разные фазы роста, характеризующиеся определенными физиологическими параметрами: лаг-фаза, экспоненциальная (логарифмическая) фаза, фаза замедления роста, стационарная фаза, фаза отмирания.

Культура бактериальная (*bacterial culture*) — популяция клеток определенного вида бактерий, выращенных в контролируемых искусственных условиях в жидкой или на плотной питательных средах. Различают следующие культуры: первичную — свежеизолированную из природной популяции; субкультуру — полученную в результате клонирования первичной культуры; пассированную — культуру, прошедшую много пассажей в/на питательных средах; аэробную и анаэробную — культуры, выросшие соответственно в аэробных и анаэробных условиях; контаминированную — культуру, которая загрязнена посторонними, обычно воздушными, микроорганизмами; культуры с указанием времени инкубации (например, четырехчасовая, суточная, старая). Культуры бактерий одного и того вида могут различаться по отдельным признакам (по чувствительности к ионам тяжелых металлов, активности ферментов и т. д.).

Культуральная среда (*growth medium*) — жидкая или твердая питательная среда, используемая для выращивания микроорганизмов.

Люминесцентная микроскопия (*luminescent microscopy*) — микроскопия светящегося объекта на темном фоне. Первичное свечение объекта, как и свечение флуорохромированного препарата (вторичная люминесценция), происходит под действием ультрафиолетовых лучей или коротковолнового синего света.

Массовая концентрация (*mass concentration*) — концентрация вещества, выраженная в единицах массы на единицу объема, например г/л.

Матрикс (*matrix*) — раствор, содержащий стандартное вещество.

Метка (*label*) — частица или вещество, присоединенное к одному из реагентов для контроля иммунологической реакции или количественного определения иммунореагентов.

Меченые антитела (*labeled antibodies*) — антитела, содержащие метку, например флуорофор или радиоизотоп.

Миколовые кислоты (*mycolic acids*) — высокомолекулярные разветвленные жирные β -гидроксикислоты, замещенные в положении 2 и 3 алифатическими цепями различной длины. У актинобактерий группы «*mycolata*» миколовые кислоты связаны эфирной связью с арабиногалактаном, который связан с муреином клеточной стенки. Миколовые кислоты у актинобактерий различных таксонов различаются по длине углеродных цепей (от 20 до 80 атомов C), количеству двойных связей, природе заместителей (метильные, кето- и метоксигруппы, циклопропановые и эпокси- кольца), а также по соотношению длин алифатических цепей при C_2 - и C_3 -атомах жирной кислоты. Более консервативный радикал из 20–25 атомов углерода занимает 2-положение, а более вариативный из 50–65 атомов углерода занимает 3-положение.

Набор реагентов (*assay kit*) — специально подобранные компоненты (реагенты) и инструкции по проведению анализа, предназначенные

для одного или нескольких определений конкретного вещества или нескольких веществ.

Нокардиоформные бактерии (*nocardioform bacteria*) — неподвижные, палочковидные, грамположительные, в жизненном цикле которых присутствует мицелиальная стадия. Хорошо развитый, ветвящийся, слабо септированный мицелий по мере старения распадается на палочковидные или кокковидные элементы. Некоторые представители образуют слабо развитый воздушный мицелий. Аэробы или факультативные анаэробы. Хемоорганогетеротрофы с аэробным дыханием, реже брожением. Большинство свободноживущих нокардиоформ являются сапротрофами, обитающими в почвах разных типов и разлагающими органические соединения, в том числе гумус. Ряд нокардий является возбудителями нокардиозов человека (бронхопневмония с абсцессами или без них, системные абсцессы мозга, почек, поверхностные кожные и подкожные абсцессы, поражения глаз и проч.). Среди них описаны возбудители заболеваний растений (образование галлов на чернике). Нокардии вызывают биоповреждения подземных сооружений. К нокардиям относятся представители филы *Actinobacteria*, класса *Actinobacteria*, порядка *Actinomycetales*, подпорядка *Corynebacterineae*, семейства *Nocardiaceae*, родов *Dietzia*, *Gordonia*, *Millisia*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Tsukamurella*, *Williamsia* и др.

Номенклатура (*nomenclature*) — искусственная схема для наименования или обозначения организмов (маркирование объектов). Номенклатура бактерий регламентируется Международным кодексом номенклатуры бактерий (*International Code of Nomenclature of Bacteria*), представляющим собой собрание принципов, правил и рекомендаций, ставящих цель унификации научных названий и разработки точной системы номенклатуры бактерий.

Операция выделения (*extraction procedure*) — способ и средства, с помощью которых определяемое вещество выделяют из матрикса до проведения анализа.

Перекрестная реакция (*cross-reaction*) — способность веществ, отличных от определяемого соединения, связываться с антителами, и способность веществ, отличных от антител, связываться с определяемым соединением.

Повторный анализ (*replicate assay*) — анализ, в котором используются те же растворы реагентов, что и в первом анализе.

Полифазный подход (*polyphasic approach*) — подход в систематике прокариотных организмов, объединяющий много уровней (от молекулярного до экологического) информации и учитывающий наряду с фенотипическими и экологическими признаками генотипические характеристики, в том числе первичную структуру 16S рРНК.

Предел обнаружения (*detection limit*) — наименьшее количество или наименьшая концентрация определяемого вещества, которую можно

отличить от нулевого количества (или концентрации) с установленной достоверностью, обычно выраженной в виде двух стандартных отклонений или достоверных пределов.

Преципитация иммунная (*immune precipitation*) — формирование нерастворимых иммунных комплексов с образованием преципитата (осадка) при взаимодействии растворимых антигенов с антителами. Реакция преципитации широко используется в лабораторных исследованиях и является основой реакций иммунодиффузии.

Приготовление стандарта (*reference preparation*) — четкая и строгая методика получения стандартного материала, гарантирующая его пригодность и содержание конкретного определяемого вещества и предназначенная для качественного и количественного контроля аналитической системы.

Профиль точности (воспроизводимости) (*precision profile*) — точность анализа, представленная в виде кривой или таблицы, в которых статистически обработанные результаты отклонений (например, стандартное отклонение или коэффициент вариации) сравниваются с откликами на концентрацию измеряемого вещества.

Рабочий диапазон определяемого вещества (*effective assay range*) — диапазон концентраций определяемого вещества в пробах, в котором результаты аналитической системы достаточно точны (как правило, погрешность не превышает 10%).

Разброс (*bias*) — отклонение, арифметическая разность между усредненным результатом серии определений и истинной или принятой величиной. Разброс может зависеть от концентрации определяемого вещества.

Реакция преципитации (*precipitation reaction*) — адсорбция антител на поверхности микроорганизмов, обладающих соответствующими антигенами.

Род (*genus*) — центральная таксономическая категория в систематике прокариотных организмов, состоящая из одного или нескольких видов.

Свободная фракция (*free fraction*) — компоненты инкубационной смеси, не входящие в связанную фракцию (см. Связанная фракция).

Связанная фракция (*bound fraction*) — доля меченого реагента (антигена или антитела), которая связана с соответствующим немеченым компонентом. Связанная фракция может включать неспецифическое связывание (фоновый сигнал).

Связывающий центр (*binding site*) — часть молекулы (антитела, определяемого вещества или антигена), которая принимает участие в специфической реакции связывания.

Серия анализов (*assay series*) — серия измерений, выполненных в одинаковых условиях с одними и теми же реагентами и контролями.

Сорбция (*sorption*) — поглощение газов, паров или растворенных веществ твердыми и жидкими поглотителями.

Специфичность (*specificity*) — степень устойчивости антител к влиянию перекрестно реагирующих веществ или других факторов. Специфичность аналитической системы — это степень ее устойчивости к влиянию перекрестно реагирующих веществ или других факторов. Под диагностической специфичностью понимают способность теста давать правильные отрицательные результаты при определенных условиях.

Среда синтетическая (*synthetic medium*) — питательная среда, имеющая постоянный состав и содержащая чистые химические вещества в известных концентрациях, необходимых для роста и деления бактериальных клеток (например, глюкозосолевая питательная среда).

Среда элективная или селективная (*selective medium*) — питательная среда, обеспечивающая преимущественный рост и развитие бактерий определенного вида или физиологической группы. Используется для получения накопительных культур.

Срок годности набора (или партии реагентов) (*effective time of a kit or batch*) — период времени, в течение которого рекомендуется использовать набор реагентов (или партии реагентов).

Стабильность аналитической системы (*rugedness*) — нечувствительность аналитической системы к незначительным изменениям в реагентах или методике. Такую стабильность системы можно оценить путем сравнения точности (воспроизводимости) результатов при заданной концентрации определяемого вещества после изменения в допустимых пределах количества реагентов или методики анализа. На практике недостаточная стабильность системы приводит к большому разбросу результатов между сериями анализов и между лабораториями.

Стандартизация (*standardization*) — меры, предпринимаемые в целях уменьшения разброса результатов анализа между сериями анализов или между лабораториями и тем самым способствующие улучшению воспроизводимости результатов анализа и надежности сравнительных оценок. Одной из наиболее распространенных мер достижений этой цели является применение стандартных калибровочных материалов.

Стандартная сыворотка (*reference serum*) — сыворотка, содержащая конкретное определяемое соединение и считающаяся пригодной для сравнительной оценки характеристик различных аналитических систем. Такие сыворотки могут считаться стандартными внутри лаборатории, в регионе, стране или в международном масштабе.

Стандартный диапазон контроля определяемого вещества (*reference range of analyte concentrations*) — диапазон концентраций, который включает определенный процент (90, 95 или 99 %) рассчитанного или найденного для данной популяции.

Стандартный материал (*reference material*) — стандартный препарат. Данный материал может считаться стандартным внутри одной лаборатории, в регионе, государстве или в международном масштабе.

Стационарная фаза роста (*stationary growth phase*) — состояние бактериальной культуры, возникающее вслед за фазой экспоненциального роста, для которого характерно отсутствие или резкое снижение числа клеточных делений. Фаза роста культуры, в течение которой процессы деления и отмирания клеток в популяции находятся в динамическом равновесии. Для бактерий эта фаза достигается при концентрации в среднем 10^9 клеток/мл.

Сыворотка иммунная (*immune serum*) — сыворотка крови донора (человека или животного), иммунизированного каким-либо антигеном и содержащая специфические антитела против этого антигена.

Таксон (*taxon*) — группа организмов, обладающих заданной степенью однородности. Другими словами, группа организмов любого ранга, которая достаточно обособлена, чтобы ей можно было присвоить определенную таксономическую категорию.

Титр (*titre*) — доля объема или степень разбавления пробы или другого раствора, в которой наблюдается специфический эффект. Обычно титр численно равен обратному разбавлению. В иммуноанализе понятие титра используют для оценки такой степени разбавления антисыворотки, при которой в заданных условиях связывается определенная доля вещества.

Тонкослойная хроматография (*thin-layer chromatography*) — это эффективный метод быстрого разделения низкомолекулярных веществ (липидов, аминокислот, нуклеотидов, витаминов и др.). Исследуемый образец наносят на тонкий слой силикагеля, закрепленного на пластинке из фольги, пластика или стекла. Пластинку помещают в хроматографическую камеру с небольшим количеством растворителя. Фронт растворителя поднимается по пластинке под действием капиллярных сил, увлекая вещества, содержащиеся в образце. Скорость продвижения разделяемых веществ зависит от их распределения между неподвижной (гидрофильный силикагель) и подвижной (неполярный растворитель) фазами и растворимости в последней. Хроматографический процесс заканчивают в тот момент, когда растворитель достигает верхнего края пластинки. Пластинку с силикагелем высушивают, анализируемые вещества проявляют с помощью соответствующих красителей. Для каждого вещества разделенного образца рассчитывают величину R_f . Полученные значения R_f сравнивают со значениями R_f контрольных веществ («свидетелей») и идентифицируют соединения, присутствующие в образце.

Точность (воспроизводимость) (*precision*) — соответствие между повторными измерениями (см. Воспроизводимость, Достоверность).

Точность (воспроизводимость) в одном анализе (*within-assay precision or intra-assay precision*) — точность определения проб, найденная при проведении одного анализа.

Трайсер (*tracer*) — меченое вещество, введенное в аналитическую систему для определения направления или завершения реакции (см. Метка).

Физиологический раствор (*physiological saline*) — 0,85%-ный водный раствор хлорида натрия (NaCl).

Фила (*phyla*) — ветвь глобального филогенетического дерева жизни, соответствующая крупному филогенетическому таксону. Таксономическая категория введена в мегасистематику прокариот в 2001 г. и является интрадоменной категорией.

Флуоресценция (*fluorescence*) — излучение света с определенной длиной волны веществом, возбужденным светом с другой (обычно меньшей) длиной волны. При флуоресценции молекулы переходят из возбужденного синглетного состояния в исходное состояние. Спектральный диапазон, вызывающий свечение, называется спектром поглощения или возбуждения (excitation), а излучаемый — спектром испускания (*emission*).

Флуорофор (*fluorophore*) — группа атомов, обеспечивающая флуоресценцию молекулы вещества.

Флуорохромы (*fluorochromes*) — красители, применяемые для обработки объектов, не обладающих природной способностью люминесцировать; их отличительная особенность — способность светиться под воздействием ультрафиолетовых и сине-фиолетовых лучей.

Характеристики анализа (*assay characteristics*) — основные показатели выполняемого анализа. Характеристики достоверности анализа должны включать оценки точности (воспроизводимости), отклонения и чувствительности. Характеристики практичности анализа включают продолжительность выполнения, степень технической сложности, необходимые трудовые и материальные затраты.

Хемосистематика (*chemosystematics*) — подход в систематике, основанный на химическом анализе состава дифференцирующих клеточных компонентов — цитоплазмы, мембран, клеточных стенок.

Хемотаксономические маркеры (*chemotaxonomic markers*) — тип и состав липидов цитоплазматической мембраны, полисахариды и белки капсул, каротиноиды, полиамины, липополисахариды, муреин, миколовые и тейхоевые кислоты клеточных стенок, белки рибосом и др.

Хроматография (*chromatography*) — метод разделения смесей на составляющие их вещества, основанный на различиях в степени поглощаемости отдельных веществ при прохождении их через слой поглотителя; заключается в сорбции компонентов смеси твердым носителем и последовательном вымывании (элюировании) их.

Чувствительность (*sensitivity*) — термин, используемый в иммуноанализе как синоним термина предел обнаружения, диагностическая чувствительность. Под чувствительностью анализа понимают его спо-

собность давать правильный положительный результат в определенных условиях.

Чувствительность в одном анализе (*within-assay sensitivity*) — предел обнаружения вещества, определенный в одном анализе.

Штамм (*strain*) — чистая культура прокариотных организмов одного и того же вида, выделенная из определенного источника (организма, внешней среды). Разные штаммы обладают всеми основными признаками, характеризующими их как вид, они могут быть идентичными или различаться по отдельным признакам (например, по активности ферментов, чувствительности к тяжелым металлам, антибиотикам, способности синтезировать продукты метаболизма и др.). Обозначают штаммы произвольно: по месту выделения, времени выделения, порядковому номеру регистрации, отличительному признаку и др.

Экспоненциальная фаза роста (*exponential growth phase*) — стадия роста бактериальной культуры, при которой удвоение количества клеток происходит за одинаковые промежутки времени. Характеризуется постоянной максимальной скоростью деления бактериальных клеток в условиях периодического культивирования при благоприятных условиях. При этом число клеток увеличивается в геометрической прогрессии:

$$1, 2, 4, 8 \text{ и т. д. или } 2^0, 2^1, 2^2, 2^3 \dots 2^n,$$

где n — число генераций.

Указатель латинских названий

- Actinobacteria* 9, 10, 15, 82, 84, 93
Actinomyces 14, 82
Actinomyces israelii 14
Actinomycetales 10, 34, 84
Actinomycetes 14
Actinosynnemataceae 13
Agromyces 14, 96
Archaea 93, 94
Arthrobacter 96
Bacteria 10, 93, 94
Bifidobacterium 14, 82
Brachybacterium 96
Brevibacteriaceae 13
Brevibacterium 96
Cellulomonas 14, 41
Clavibacter 14, 96
Corynebacteriaceae 33
Corynebacterineae 14, 33, 84
Corynebacterium 6, 10, 13, 15, 18, 32, 33, 34, 67, 71, 72, 76, 82, 96, 98, 99
 – *ammoniogenes* 98, 99
 – *diphtheria* 82
 – *glutamicum* 36, 99
Curtobacterium 14, 96
Dermatococcus 96
Dermatophilaceae 13
Dietzia 6, 10, 13, 33, 42, 46, 48, 49, 96
 – *maris* 67, 68, 73, 98, 99, 101
Dietziaceae 33, 80
Escherichia coli 24
Frankiaceae 13
Gordonia 6, 10, 33, 34, 46, 48, 49, 96
 – *rubripertincta* 67, 68, 73, 98, 99, 101
 – *sputi* 99
 – *terrae* 99, 101
Gordoniaceae 33, 93
Kitasatosporia 14
Kocuria 96
Microbacterium 6, 14
 – *imperiale* 36, 99
Micrococcus 96
Micromonosporineae 13
Millisia 84
Mycobacteriaceae 33
Mycobacterium 6, 10, 13, 15, 18, 24, 32, 33, 34, 37, 42, 67, 71, 72, 76, 96, 98, 99
 – *chlorophenolicum* 98, 99
Nocardia 6, 10, 13, 15, 18, 24, 32, 33, 34, 37, 46, 48, 84, 96, 98, 99
 – *farcinica* 36, 98, 99
Nocardiaceae 33, 80, 84
Nocardioidaceae 13
Nocardioides 96
Oerskovia 14, 24, 41
Propionibacterium 82
Pseudomonas 67, 71, 72, 76, 99
Pseudonocardiaceae 14
Rhodococcus 6, 10, 13, 14, 15, 18, 24, 28, 29, 32, 33, 34, 42, 46, 48, 49, 61, 84, 94, 96, 100
 – *coprophilus* 58, 73, 99, 101
 – *erythropolis* 17, 20, 28, 29, 31, 58, 62, 67, 68, 72, 73, 78, 98, 99, 101
 – *fascians* 29, 99
 – *opacus* 28, 29, 31, 58, 62, 67, 68, 72, 73, 78, 98, 99, 101
 – *qingshengii* 99
 – *rhodii* 58, 62, 98, 99, 101
 – *rhodochrous* 17, 20, 28, 29, 31, 58, 62, 67, 68, 72, 73, 78, 80, 98, 99, 101
 – *ruber* 10, 19, 28, 29, 31, 36, 58, 62, 67, 68, 71, 72, 73, 78, 98, 99, 101
 – *yunnanensis* 99
 – *zopfii* 58, 62, 98, 99, 101
‘*R. longus*’ 28, 29, 31
Segniliparaceae 33
Segniliparus 34
Skermania 13, 34, 84
Streptomyces 11, 18
Streptomycineae 13
Streptosporangiaceae 13
Terrabacter 96
Thermomonosporaceae 13
Tsukamurella 10, 13, 34, 84
Tsukamurellaceae 33
Williamsia 34, 42, 84, 96
‘*Williamsiaceae*’ 33

Рекомендуемая литература

1. Воробьева Н. В. Иммунодиффузия и иммуноэлектрофорез. Теория и практика. — М. : Научный мир, 2006. — 80 с.
2. Захарова Н. Г., Вершинина В. И., Ильинская О. Н. Микробиология в определениях и иллюстрациях. — Казань : Изд-во «Фэн» Академии наук ТР, 2012. — 799 с.
3. Ившина И. Б., Пшеничников Р. А., Оборин А. А. Пропанокисляющие родококки. — Свердловск : УНЦ АН СССР, 1987. — 125 с.
4. Калакуцкий Л. В., Агре Н. С. Развитие актиномицетов. — М. : Наука, 1977. — 285 с.
5. Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Под ред. И. Б. Ившиной. — М. : Наука, 1994. — 163 с.
6. Кожевин П. А. Микробные популяции в природе. — М. : Изд-во Моск. ун-та, 1989. — 175 с.
7. Методы общей бактериологии: пер. с англ. // Под ред. Ф. Герхардта и др. — М. : Мир, 1983. — Т. 1—3.
8. Нестеренко О. А., Квасников Е. И., Ногина Т. М. Нокардиоподобные и коринеподобные бактерии. — Киев : Наук. думка, 1985. — 336 с.
9. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. — М. : Просвещение, 1987. — 815 с.
10. Осипенко М. А., Няшин Ю. И., Куюкина М. С., Ившина И. Б. Идентификация непатогенных актинобактерий на основе анализа антибиограмм. Программный комплекс *IDENTIFICATION*. Свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2010615181. Зарегистр. в Реестре программ для ЭВМ 11.08.2010.
11. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Eds. Y.-W. Tang, C. W. Stratton. 2006. Springer Science+Business. LLC.
12. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd Edition*. Springer, New York. The second edition is being published in 5 volumes: Vol. 1. (2001) *The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria*. Editor-in-Chief: George M. Garrity. Editors: David R.

- Boone, Richard W. Castenholz. Vol. 2. (2005) *The Proteobacteria*. Editor-in-Chief: George M. Garrity. Editors: Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Staley. Vol. 3. (2009) *The Firmicutes*. Editors: Paul De Vos, George Garrity, Dorothy Jones, Noel R. Krieg, Wolfgang Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman. Vol. 4. (2011) *The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. Editors: Noel R. Krieg, James T. Staley, Daniel R. Brown, Brian P. Hedlund, Bruce J. Paster, Naomi L. Ward, Wolfgang Ludwig and William B. Whitman. Vol. 5. (2012) *The Actinobacteria*. Editors: Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig, William B. Whitman
13. *Biology of Rhodococcus*. H. M. Alvarez (ed.). In *Microbiology Monographs*. A. Steinbüchel (series ed.). Vol. 16. 2010. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. — 365 pp.
14. *Clinical Laboratory Standards Institute*. 2006. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard — 9th ed. CLSI document M2-A9*. 26:1. *Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA*.
15. Collins M. D., Jones D. *Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications // Microbiol. Rev.* — 1981. — Vol. 45. — P. 316—354.
16. Delong E. F., Pace N. *Environmental diversity of Bacteria and Archaea // Syst. Biol.* — 2001. — Vol. 50 (4). — P. 470—478.
17. Dowhan W. *Molecular genetic approaches to defining lipid function // J. Lipid Res.* — 2009. — Vol. 50. — P. 305—310.
18. Goodfellow M., Alderson G. *The actinomycete-genus Rhodococcus: a home for the 'rhodochrous' complex // J. Gen. Microbiol.* — 1977. — Vol. 100. — P. 99—122.
19. Goodfellow M., Maldonado L. A. *The Families Dietziaceae, Gordoniaceae, Nocardiaceae and Tsukamurellaceae // In Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer-Verlag, New York. — 2006. — Vol. 3. — Chapter 1.1.17. — P. 843—888.
20. Goodfellow M., Minnikin D. E. *Introduction to chemosystematics // In Chemical Methods in Bacterial Systematics*. 1985. P. 1—15. Edited by M. Goodfellow, D. E. Minnikin. — London: Academic Press. — 410 pp.
21. *Methods for General and Molecular Microbiology, 3rd Edition*. 2007. Editors: C. A. Reddy, Terry J. Beveridge, John A. Breznak, George Marzluf, Thomas M. Schmidt, Loren R. Snyder. *Book ISBN or Item Number: 978-1-55581-223-2*.
22. *Methods in Microbiology. First edition*. Vol. 38. *Taxonomy of Prokaryotes*. Edited by F. Rainey, A. Oren. 2011. Elsevier Ltd.
23. *Modern Microbial Methods. Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. J. Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom. Edited by M. Goodfellow, A. G. O'Donnell. 1994. — 576 pp.

24. Sutcliffe I. C. *Cell envelope composition and organization in the genus Rhodococcus* // *Antonie van Leeuwenhoek*. — 1998. — Vol. 74. — P. 49–58.

25. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria. Third Edition. Vol. 3. Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes.* Edited by M. Dworkin, S. Falkow, S. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt. 2006. Springer Science Business. LLC.

26. Vandamme P. A. R. *Taxonomy and classification of bacteria* // *In Manual of Clinical Microbiology. 10th edition.* — 2011. — Vol. 1. Section II: Bacteriology. — P. 213–227.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Способ получения культур из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов

Предоставление культур, перечисленных в данном издании, осуществляется на основании официального запроса организации/заказчиков. Наименование вида и номер запрашиваемого коллекционного штамма следует указывать в соответствии с электронным каталогом (<http://www.iegm.ru/iegmcol/index.html>). Заказы на культуры должны быть адресованы: 614081, г. Пермь, ул. Голева, д. 13. Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН. Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов. Телефон: (342) 280-81-14. Факс: (342) 280-92-11. Электронная почта: ivshina@iegm.ru.



Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур 768, www.iegm.ru/iegmcol, Россия, г. Пермь, 614081, ул. Голева, 13. Тел.: (342) 280-81-14. Факс: (342) 280-92-11), действующая в Институте экологии и генетики микроорганизмов

Уральского отделения РАН специализируется на изучении и поддержании непатогенных актинобактерий, ведущих окисление природных и антропогенных углеводов. Аналоги такой коллекции отсутствуют. При разработке концепции профиля коллекции учитывался тот факт, что Пермский край — один из перспективных нефтегазопромысловых районов Российской Федерации, что сопряжено с экологическими проблемами, в том числе нефтяными загрязнениями.

Ресурсная коллекция является членом Всемирной Федерации коллекций культур (*World Federation for Culture Collections, WFCC*, <http://www.wfcc.info>) и Европейской организации коллекций культур (*European Culture Collections' Organization, ECCO*, <http://www.eccosite.org>), включена во Всемирный справочник коллекций культур (*World Directory of Collections of Cultures of Microorganisms, WDCM*, <http://wdcn.nig.ac.jp>), входит в сеть специализированных Российских коллекций немедицинского профиля, располагает компьютеризированной базой данных, функционирующей в опера-

ционной системе «*Oracle Standard Edition*» (версия 9i) и оборудованной диалоговой поисковой системой, современными методами полифазной таксономии, а также квалифицированным персоналом, имеющим навыки работы с углеводородокисляющими микроорганизмами, таксономический опыт и практику профессионального хранения биотехнологически ценных живых культур. Представление о коллекции дает электронный каталог штаммов, установленный в каналах сети Internet и во Всемирном центре данных о микроорганизмах (*WFCC–MIRCEN World Data Centre for Microorganisms*, www.wfcc.info/datacenter.html). Сведения о поддерживаемых коллекционных культурах включены в Сводный каталог российских коллекций (*Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections*, www.vkm.ru) и Глобальный каталог микроорганизмов (*WFCC Global Catalogue of Microorganisms, GCM*, <http://gcm.wfcc.info/>).

Объем генофонда составляет более двух тысяч чистых идентифицированных детально охарактеризованных культур, выделенных в результате многолетних экспедиций и полевых исследований из многих тысяч образцов почв, поверхностных и пластовых вод, снега, воздуха, керна, отобранных из контрастных эколого-географических регионов.

Ценность коллекции в том, что многие виды бактерий представлены в ней не единичными штаммами, а многочисленными природными изолятами из различных мест ареала с охватом основных климатических регионов РФ, что позволяет целенаправленно проводить отбор активных продуцентов ценных веществ и биодеструкторов органических загрязнителей. Среди коллекционных культур наряду с типовыми штаммами валидных видов актинобактерий широко представлены экстремотолерантные штаммы, имеющие значительный потенциал для промышленной эксплуатации; психроактивные штаммы с широким температурным диапазоном; штаммы-биопродуценты аминокислот, ферментов, липидов с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, биосурфактантов (поверхностно-активных веществ бактериального происхождения); штаммы-биодеструкторы различных поллютантов, в том числе сырой нефти и нефтепродуктов.

Коллекция располагает типовыми и референтными штаммами, принадлежащими к родам *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Dermatococcus*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Kocuria*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Nocardioides*, *Rhodococcus*, *Terrabacter*, *Williamsia* (всего 86 видов актинобактерий). В коллекции собран наиболее полный в стране и за рубежом фонд непатогенных штаммов родококков с высокой активностью оксигеназного ферментного комплекса. Собраный фонд культур родококков — удобный объект для изыскания новых продуцентов ценных веществ, деструкторов и трансформаторов ксенобиотиков и активных биоаккумуляторов ионов тяжелых металлов, а также для конструирования новых форм и создания новых биологических технологий.

На основе ресурсного потенциала коллекции разработан (Патент РФ 2180276) эффективный биопрепарат нового состава и новой (олеофильной) формы, пригодный для очистки нефтезагрязненных почв в регионах с холодными климатическими условиями. В результате междисциплинарной кооперации с коллегами из ОАО «ПермНИПИнефть» (Пермь, Россия), Напиер университета (Эдинбург, Великобритания) и Исследовательского центра оценки и ремедиации загрязненных земель (CLARCC) Эдинбургского университета (Эдинбург, Великобритания) разработаны оригинальный метод получения биосурфактантов и экологически безопасная экспресс-технология биоремедиации нефтезагрязненных почв и грунтов (Патент РФ 2193464), прошедшая испытания на территории Пермского края, предусматривающая использование бактериальных сурфактантов и гарантирующая получение экологического эффекта в течение одного вегетационного периода (в том числе в регионах с холодным климатом) и возможность широкого тиражирования на нефтедобывающих и нефтеперерабатывающих предприятиях. На базе коллекции совместно с коллегами из Института элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН (Москва, Россия) разработан способ получения носителя иммобилизованных микроорганизмов (Патент РФ 2298033), на основе которого получены лабораторные образцы устойчивых биокатализаторов многофункционального назначения, по основным технологическим параметрам отвечающие требованиям промышленной биотехнологии. Возможное применение созданных биокатализаторов заключается в получении практически ценных продуктов биосинтеза на углеводородном сырье, биоремедиации загрязненных нефтью и нефтепродуктами экосистем, производстве биологически активных интермедиатов для фармацевтической промышленности.

В настоящее время реально использование ресурсного потенциала коллекции в различных областях биотехнологии — от биологической индикации углеводородных залежей до интенсификации процессов биодegradации нефтяных загрязнений и биокатализа в тонком синтезе.

Деятельность коллекции ИЭГМ осуществляется в соответствии с основными задачами «Комплексной программы развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года (БИО-2020)». Программа последовательных действий развивающегося на Урале биологического ресурсного центра помимо аспектов фундаментальных исследований (комплексное изучение биологии алканотрофов, адаптационных механизмов их выживания в антропогенно нарушенных экосистемах) и собственно коллекционной работы (адекватный сбор природного материала, классификация и таксономическое описание выделенных культур; оценка их биотехнологической пригодности; разработка методов долгосрочного хранения культур и их функционального разнообразия; совершенствование информационного сопровождения культур в соответствии

с международными стандартами, обеспечение непрерывности в передаче реальным потребителям штаммов и накопленной научной информации о них) включает прикладные исследования с использованием коллекционного генофонда алканотрофов и способствует их практическому внедрению в различных областях биотехнологии (получение новых препаратов, разработка и совершенствование перспективных технологий).

Коллекция ИЭГМ — не только научно-исследовательский, но и научно-образовательный центр. На базе коллекции проходят подготовку студенты различных учебных заведений, выполняющие курсовые, дипломные работы, магистерские диссертации, а также аспиранты с последующей защитой кандидатских диссертаций. Работают краткосрочные обучающие курсы по выделению, культивированию и идентификации алканотрофных микроорганизмов. Коллекция предоставляет сервисные услуги исследователям, промышленным и учебным организациям: по запросу заинтересованных учреждений предоставление аутентичных культур актинобактерий и информации о свойствах штаммов и потенциальных сферах их применения; скрининговые работы по обнаружению микроорганизмов с заданными свойствами; консультации по вопросам выделения, таксономии, биологических особенностей и консервации алканотрофов; паспортизация микроорганизмов; осуществление договорных работ.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Наборы коллекционных бактериальных культур для обеспечения практических занятий

Вид, штамм	Исходный материал	Занятие номер
<i>C. ammoniagenes</i> ИЭГМ 862 [†] , <i>Corynebacterium</i> sp. ИЭГМ 866, <i>M. chlorophenolicum</i> ИЭГМ 559 [†] , <i>Mycobacterium</i> sp. ИЭГМ 828, <i>N. farcinica</i> ИЭГМ 621 [†] , <i>Nocardia</i> sp. ИЭГМ 855, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 270, <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 647, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 71	Кислый гидролизат целых бактериальных клеток	1
<i>C. ammoniagenes</i> ИЭГМ 862 [†] , <i>Corynebacterium</i> sp. ИЭГМ 866, <i>M. chlorophenolicum</i> ИЭГМ 559 [†] , <i>Mycobacterium</i> sp. ИЭГМ 828, <i>N. farcinica</i> ИЭГМ 621 [†] , <i>Nocardia</i> sp. ИЭГМ 855, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 270, <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 647, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 [†] , ИЭГМ 71, <i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 [†]	Кислый гидролизат целых бактериальных клеток	2
<i>D. maris</i> ИЭГМ 55 [†] , <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95 [†] , <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 270, <i>R. opacus</i> ИЭГМ 716 [†] , <i>R. rhodnii</i> ИЭГМ 555 [†] , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 647, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 71, <i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 [†]	Хлороформ-метанольные экстракты бактериальных клеток	3

Вид, штамм	Исходный материал	Занятие номер
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 270, <i>R. fascians</i> ИЭГМ 43, <i>R. globerulus</i> ИЭГМ 591 [†] , <i>R. opacus</i> ИЭГМ 716 [†] , <i>R. qingshengii</i> ИЭГМ 1016 [†] , <i>R. rhodnii</i> ИЭГМ 555 [†] , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 647, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 71, <i>R. yunnanensis</i> ИЭГМ 1071 [†] , <i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 [†]	Реакционная смесь общих липидов бактериальных клеток	4
<i>C. glutamicum</i> ИЭГМ 1861, <i>Micr. imperiale</i> ИЭГМ 827, <i>N. farcinica</i> ИЭГМ 621, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 [†]	Метанолизаты целых бактериальных клеток	5
<i>D. maris</i> ИЭГМ 55 [†] , <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95 [†] , <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 270, <i>R. opacus</i> ИЭГМ 716 [†] , <i>R. rhodnii</i> ИЭГМ 716 [†] , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 647, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 71, <i>R. yunnanensis</i> ИЭГМ 1071 [†] , <i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 [†]	Хлороформ-метанольные экстракты клеток	6, 7
<i>D. maris</i> ИЭГМ 55 [†] , <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95 [†] , <i>G. sputi</i> ИЭГМ 674 [†] , <i>G. terrae</i> ИЭГМ 143 [†] , <i>N. farcinica</i> ИЭГМ 621 [†] , <i>Nocardia</i> sp. ИЭГМ 855, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 270, <i>R. opacus</i> ИЭГМ 716 [†] , <i>R. rhodnii</i> ИЭГМ 555 [†] , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 647, <i>R. ruber</i> ИЭГМ 71, <i>R. yunnanensis</i> ИЭГМ 1071 [†] , <i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 [†]	Чистые культуры, выращенные на косяках с МПА	8
<i>D. maris</i> ИЭГМ 55 [†] , ИЭГМ 316, ИЭГМ 464, ИЭГМ 512, ИЭГМ 514, ИЭГМ 516, ИЭГМ 750, ИЭГМ 1172, <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95 [†] , ИЭГМ 106, ИЭГМ 518, ИЭГМ 721, ИЭГМ 722, ИЭГМ 730, ИЭГМ 732, ИЭГМ 734, ИЭГМ 735, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 [†] , ИЭГМ 18, ИЭГМ 26, ИЭГМ 188, ИЭГМ 199, ИЭГМ 200, ИЭГМ 203, ИЭГМ 209, ИЭГМ 682, ИЭГМ 691	Спектры антибиотикочувствительности актинобактериальных культур	9
<i>R. coprophilus</i> ИЭГМ 600 [†] , <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 [†] , <i>R. opacus</i> ИЭГМ 60, ИЭГМ 61, ИЭГМ 716 [†] , <i>R. rhodnii</i> ИЭГМ 555 [†] , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62 [†] , <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 [†] , <i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 [†]	Водорастворимые гомогенаты бактериальных клеток	10
<i>C. ammoniagenes</i> ИЭГМ 862 [†] , <i>Corynebacterium</i> sp. ИЭГМ 866, <i>D. maris</i> ИЭГМ 55 [†] , <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95 [†] , <i>M. chlorophenolicum</i> ИЭГМ 559 [†] , <i>Mycobacterium</i> sp. ИЭГМ 828, <i>Pseudomonas</i> sp. ИЭГМ 2036, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 [†] , <i>R. opacus</i> ИЭГМ 716 [†] , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62 [†] , <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 [†]	Суспензии (OD ₆₀₀ 2,0) в натрий-фосфатном буфере (рН 7,0) целых бактериальных клеток	11
<i>Corynebacterium</i> sp. ИЭГМ 866, <i>Mycobacterium</i> sp. ИЭГМ 828, <i>Pseudomonas</i> sp. ИЭГМ 2036, <i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 7 [†] , <i>R. opacus</i> ИЭГМ 716 [†] , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62 [†] , <i>R. ruber</i> ИЭГМ 70 [†]	Суспензии (OD ₆₀₀ 2,0) в натрий-фосфатном буфере (рН 7,0) целых бактериальных клеток	12

Примечание. ИЭГМ — официальный акроним Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (<http://www.iegm.ru/iegmcol/index.html>).
[†] — Типовой штамм.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3. Получение видоспецифических поликлональных иммунных сывороток

Для получения высокоактивных иммунных сывороток против типовых и типичных представителей известных видов актинобактерий учитываются следующие факторы, определяющие эффективность иммунизации: 1) физико-химическая природа вводимого антигена (корпускулярный или водорастворимый); 2) способ его введения; 3) кратность и интервалы между иммунизациями. Эффективность иммунизации существенно зависит и от иммуногенности каждого конкретного штамма, обусловленной специфическим антигенным составом клетки, активностью лизосомальных ферментов фагоцитов макроорганизма.

При иммунизации кроликов различными вакцинами отмечено (Ившина И. Б. Способы получения специфических иммунных сывороток против бактерий рода *Rhodococcus*. *Микробиол. журн.*, 1985, 48, с. 8–13), что наиболее интенсивно индуцируют антителообразование в организме подопытных животных водорастворимые антигены, эмульгированные в неполном адьюванте Фрейнда, тогда как интактные клетки вызывают слабый иммунный ответ. Это, по-видимому, связано с затрудненной переработкой антигенной информации в макрофагальном звене клеточных реакций иммунитета, обусловленной биологическими особенностями родококков, а именно наличием в их стенках большого количества липидов. В ходе построения рациональных схем иммунизации экспериментально обосновано, что максимальное накопление антител в крови животных имеет место при внутривенной аппликации вакцины. Повышению иммунологической активности кроликов способствует комбинация внутривенной и внутримышечной аппликаций гомогенатов дезинтегрированных клеток с адьювантом. В ряде случаев схема получения активных антисывороток предполагает увеличение интервала между иммунизациями и отдаленную ревакцинацию (табл. 13).

Культуры выращивают на МПА при 30 °С в течение 96 ч. Выращенные бактериальные клетки отмывают 3–4 раза стерильным физиологическим раствором, забуференным 1,15М фосфатным буфером (рН 7,2), с помощью центрифугирования при 4000 об/мин в течение 15 мин.

Разрушение бактерий для получения водорастворимых белковых гомогенатов осуществляют ультразвуком с использованием низкочастотного дезинтегратора модели *Soniprep 150 MSE* («SANYO», Япония, 22 кГц, 15 мин) в условиях обязательного охлаждения суспензии. Количественное содержание белка в гомогенатах определяют колориметрическим методом (методом Лоури–Фолина). Исходная концентрация белка в гомогенатах должна составлять 25 мг/мл.

Таблица 13
Получение гипериммунных сывороток против типовых и типичных штаммов *Dietzia* spp., *Gordonia* spp., *Rhodococcus* spp.*

Водорастворимый белковый гомогенат бактериальных клеток	Схема иммунизации	Титр антител в нМФА
<i>D. maris</i> ИЭГМ 55 ^Т , <i>G. rubripertincta</i> ИЭГМ 95 ^Т , <i>R. erythropollis</i> ИЭГМ 7 ^Т , <i>R. luber</i> ИЭГМ 70 ^Т , ИЭГМ 333	0,5–1,5 мл с неполным адьювантом Фрейнда (1:1), ежедневно в течение 3-х дней, интервал 14 дней, внутримышечно; 1,0 мл без адьюванта, один день, подкожно; интервал 30 дней; 0,25–1,0 мл без адьюванта, в течение 3-х дней, внутривенно	1:128–1:512
<i>G. terrae</i> ИЭГМ 143 ^Т , <i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62 ^Т , <i>R. orascus</i> ИЭГМ 716 ^Т	0,5–1,5 мл в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (1:1), в течение 4-х дней, интервал 7 дней, внутримышечно; 0,25–0,50 мл без адьюванта, в течение 3-х дней, внутривенно	1:128–1:256
<i>R. sorghophilus</i> ИЭГМ 600 ^Т <i>R. rhodii</i> ИЭГМ 555 ^Т <i>R. zopfii</i> ИЭГМ 673 ^Т	0,3 мл, один день, подкожно; 0,3–0,5 мл, 2 дня, внутримышечно, интервал 7 дней; 0,2–0,5 мл, ежедневно в течение 3-х дней, внутривенно, интервал 7 дней; 0,5–0,8 мл, ежедневно в течение 3-х дней, внутривенно, интервал 7 дней; 0,8–1,0 мл, ежедневно в течение 3-х дней, внутривенно, интервал 30 дней; 0,5–1,0 мл, ежедневно в течение 3-х дней, внутривенно	1:128–1:512

*Антисыворотки приготовлены и хранятся в лаборатории алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН.

Для получения преципитирующих антисывороток использовать усовершенствованный способ получения высокодисперсной эмульсии антигенов бактериальных культур в адьюванте. Данный способ предусматривает дезинтеграцию микробных клеток и создание эмульсии в адьюванте в одной пробе. С этой целью бактерии обработать ультразвуком в течение 15 мин, затем в пробу добавить адьювант, и смесь дополнительно озвучивать на протяжении 5 мин. В то время как известные методы приготовления антигенного материала с использованием адьюванта Фрейнда предполагают длительный и трудоемкий процесс эмульгирования антигена в адьюванте путем тщательного растирания его в фарфоровой ступке или блендере в течение 1,0–1,5 и более часов, разработанный методический прием позволяет получать высокодисперсные ультразвуковые эмульсии антигенов в неполном адьюванте Фрейнда без дополнительных затрат труда и времени.

Для иммунизации используют кроликов от 3 до 5 кг (по пять животных для получения антисывороток каждой специфичности), у которых до иммунизации предварительно проверяют наличие или отсутствие в сыворотке крови нормальных антител к исследуемым бактериям. Ввиду различной степени иммуногенности использованных бактерий для получения антисывороток высокой активности кроликов иммунизируют по различным оптимальным схемам (по аппликации антигена, срокам и кратности его введения, см. табл. 13).

Антисыворотки получают на седьмой день после завершающего цикла иммунизации. Готовые сыворотки разливают в ампулы по 1 мл или пенициллиновые флаконы по 2–5 мл и лиофилизируют. Сухую антисыворотку перед употреблением растворяют в дистиллированной воде до первоначального объема. В отдельных случаях ограничиваются консервацией полученных антисывороток мертиолатом (1:5000). Титр антисывороток определяют в реакции непрямой иммунофлуоресценции. Антигенами служат бактериальные культуры, находящиеся в ранней стационарной фазе роста на МПА.

ПРИЛОЖЕНИЕ 4. Количественное определение общего белка по модифицированному методу Лоури–Фолина

Колориметрический метод сочетает использование специфической биуретовой реакции на пептидные связи и реакции восстановления фенольного реагента (Фолина) ароматическими аминокислотами (тирозином, триптофаном, фенилаланином). Чувствительность метода — от

5 до 150 мкг белка/мл. Метод применим для количественного определения белка, растворимого в воде, поэтому клетки микроорганизмов предварительно подвергают гидролизу.

Реактивы

1. 5 %-ный раствор карбоната натрия (Na_2CO_3), приготовленный на 0,1М натриевой щелочи (NaOH).

2. 0,5 %-ный раствор сернокислой меди ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), приготовленной на 1 %-ном растворе цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$).

3. Перед определением белка 1 мл реактива 2 смешивают с 50 мл реактива 1.

4. Реактив Фолина. В круглодонную колбу объемом 1500 мл вносят 700 мл дистиллированной воды, 100 г вольфрамвокислого натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25 г молибденовокислого натрия ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) и перемешивают до полного растворения.

К полученному раствору добавляют 50 мл 85 %-ной фосфорной кислоты (H_3PO_4) и 100 мл концентрированной HCl. Полученную смесь кипятят на слабом огне в течение 10 ч с обратным водяным холодильником. К охлажденной смеси добавляют 150 г сернокислого лития (Li_2SO_4), 50 мл дистиллированной воды и 15 капель брома. Избыток брома удаляют кипячением в течение 15 мин под тягой, но уже без холодильника. Раствор охлаждают до комнатной температуры. Он должен быть желтым. Если раствор зеленый, добавляют еще несколько капель брома и вновь выпаривают избыток последнего. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 1000 мл и сохраняют в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой. Основной раствор обычно бывает 2н. Для определения белка требуется 1н раствор Фолина. Для этого титрованием 0,1н NaOH с фенолфталеином определяют концентрацию основного раствора и разбавляют его дистиллированной водой до 1н. *Следует помнить:* реактив необходимо предохранять от прямого солнечного света.

Материалы. Пипетки на 0,1, 1,0 и 2,0 мл. Мерные цилиндры или колбы вместимостью 100, 500 и 1000 мл. Штатив для пробирок. Пробирки стеклянные.

Гидролиз бактериальных клеток. К 5 мл бактериальной суспензии (OD_{600} 0,2) добавляют 5 мл 1М NaOH и выдерживают в три приема по 20 с в микроволновой печи (Samsung, Корея) при мощности 70 %. Затем суспензию центрифугируют при 3500 об/мин в течение 15 мин.

Определение белка. К 0,5 мл гидролизата добавляют при постоянном встряхивании 2,0 мл свежеприготовленного реактива 3 и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. После чего к смеси добавляют 0,5 мл реактива Фолина, немедленно перемешивают и выдерживают 30 мин (или немного дольше) при комнатной температуре в темном месте. В присутствии белка жидкость окрашивается в синий цвет. Оп-

тическую плотность раствора измеряют с использованием спектрофотометра *Lambda EZ201* («Perkin-Elmer», США) при длине волны 750 нм (кювета с толщиной слоя 1,0 мм) против контрольного раствора, который получают, сливая двойные объемы тех же реактивов, но вместо гидролизата белка используют дистиллированную воду.

Калибровочный график. Количество белка, содержащегося в 1 мл исследуемого образца, определяют по калибровочной кривой. *Следует помнить:* калибровочную кривую для расчета количества белка строят с использованием каждой новой партии реактива Фолина. Калибровочный график строят в пределах концентраций от 0,5 до 2,5 мг стандартного образца известного белка (альбумина яичного или альбумина бычьего сывороточного). Добавив к стандартным растворам реактивы 3 и Фолина, определяют их оптическую плотность в условиях, описанных выше, и на основании полученных результатов строят калибровочную кривую, откладывая на оси абсцисс значения концентрации стандартных растворов белка (в мкг), на оси ординат — соответствующие им показания спектрофотометра.

Литература

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *Protein measurement with Folin phenol reagent* // *J. Biol. Chem.* — 1951. — Vol. 193. — N 1. — P. 265–275.

ПРИЛОЖЕНИЕ 5. Правила работы с дозаторами (пипетками) переменного объема

При работе с пипетками необходимо производить отбор образца под правильным углом; требуется предварительная промывка наконечников, правильное заполнение и соответствующая глубина погружения.

Следует помнить:

1. Угол погружения пипетки должен быть максимально приближен к 90° и не должен отклоняться более чем на 20° от вертикали. Если угол будет больше, уровень жидкости будет ниже, чем при калибровке пипетки. Это может привести к тому, что в наконечник попадет слишком много жидкости, а это повлияет на точность.

2. Дозируйте образцы с одинаковым стабильным темпом. Не спешите и размеренно выполняйте каждый этап цикла дозирования.

3. При работе с большими объемами (от 1 мл), делайте паузу около 1 с или больше после отбора образца, не вынимая наконечник из жид-

кости. Это позволит полностью вобрать образец. Вынимайте наконечник только после завершения отбора образца.

4. Нажимайте и отпускайте поршень плавно, сохраняя одну скорость. Неконтролируемый забор жидкости может привести к образованию пузырьков, брызг и загрязнению ствола и поршня пипетки.

5. Дозируемая жидкость оставляет на наконечнике тонкий слой, поэтому получаемый объем всегда оказывается чуть меньше положенного. При использовании нового наконечника его следует предварительно промыть не менее двух раз в той жидкости, которую будут дозировать, чтобы компенсировать эту пленку. *Следует помнить:* предварительная промывка может отрицательно сказаться на результатах при дозировании очень теплых или холодных растворов. Предварительная промывка не рекомендуется в случае очень холодных растворов, например, растворов с температурой выше 37°C, так как это может привести к погрешности.

6. Можно добиться высочайшей точности и воспроизводимости результатов от образца к образцу, если жидкость будет полностью выходить из пипетки, вся до последней капли, не оставаясь на наконечнике. В большинстве случаев при дозировании необходимо, чтобы кончик наконечника опирался на стенку сосуда, так как это уменьшает или полностью устраняет удержание образца в наконечнике. Вынимайте пипетку, скользя наконечником вдоль боковой стенки, чтобы удалить последние капли с отверстия наконечника.

7. Рекомендуемый диапазон объемов дозирования составляет от 35 до 100 % номинального объема.

8. В зависимости от размера наконечника его следует погружать в образец на глубину 1–2 мм для пипеток, предназначенных для микрообъемов, и на 6–10 мм для пипеток, рассчитанных на большие объемы. Если погрузить наконечник слишком глубоко, то это может привести к всасыванию излишнего количества жидкости. Жидкость, задержавшаяся на поверхности наконечника, также может нарушить точность результатов. Если не погрузить наконечник на достаточную глубину, в него может попасть воздух.

ПРИЛОЖЕНИЕ 6. Средства для мытья лабораторной посуды

Хромовая смесь № 1. В концентрированную серную кислоту добавляют около 5 % (от объема серной кислоты) размельченного в порошок кристаллического двуххромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$) и осторожно нагревают в фарфоровой чашке на водяной бане до его растворения.

Хромовая смесь № 2. Двуххромовокислый калий растворяют в воде, затем в раствор осторожно добавляют серную кислоту. Смесь готовят из расчета: вода — 100 мл, двуххромовокислый калий — 6 г, серная кислота (плотность 1,84) — 100 мл.

После многократного употребления темно-оранжевый цвет хромовой смеси меняется на темно-зеленый. Такая смесь не обладает моющими свойствами. Хромовой смесью не следует мыть посуду, загрязненную углеводородами.

Хромовая смесь сильно разрушает ткани животного и растительного происхождения, поэтому работать с ней следует осторожно. Если она попала на руки или одежду, то пораженное место немедленно обмывают большим количеством воды, затем разбавленным раствором аммиака или соды, а затем снова водой.

Спиртовой раствор КОН — хорошее моющее средство. Его готовят растворением 40–50 г КОН в 500 мл воды. После остывания раствора к нему добавляют спирт-сырец в таком количестве, чтобы общий объем составил 1000 мл.

ПРИЛОЖЕНИЕ 7. Средства для обработки рабочего стола

Водный раствор хлорамина. Для приготовления одного литра 3%-ного водного раствора хлорамина в литр водопроводной воды вносят 30 г хлорамина и перемешивают жидкость до полного растворения препарата.

Водный раствор лизола (препарат фенола с добавлением зеленого мыла). Для приготовления одного литра 3%-ного раствора лизола смешивают 30 г лизола и 970 мл воды.

ПРИЛОЖЕНИЕ 8. Обработка предметных стекол

Стекла кипятят в течение 10 мин в растворе следующего состава: биохромат калия — 20 г, дистиллированная вода — 200 мл, концентрированная серная кислота — 20 мл. Затем промывают в течение 5 мин слабым раствором едкого натра. Тщательно промывают в проточной водопроводной воде. Погружают в дистиллированную воду на 12 ч. Высушивают в вертикальном положении. Для долгосрочного хранения стекла помещают в банку с притертой пробкой, содержащую смесь

Никифорова (смесь (1:1) этилового эфира и этилового спирта). Перед работой стекла извлекают пинцетом и протирают чистой сухой полотняной салфеткой. На стеклах не должно быть пятен от пальцев. Подготовленные стекла можно хранить неопределенно долгое время, сложив в пакеты по 10–20 штук и завернув в бумагу.

При отсутствии заранее приготовленных обезжиренных стекол можно быстро подготовить стекла, натирая их в сухом виде хозяйственным мылом и очищая затем чистой хлопчатобумажной тканью.

ПРИЛОЖЕНИЕ 9. Методические инструкции по подготовке исследовательского отчета по лабораторной работе

Лабораторная работа должна иметь вид законченного научного эксперимента и оформляется в виде исследовательского отчета. Отчет по конкретной лабораторной работе должен содержать соответствующие разделы.

Титульный лист: указание ведомственной принадлежности, названия работы, список исполнителей, место и дата проведения.

Оглавление: с перечнем ниже приведенных глав и разделов, указанием их страниц.

Введение: раскрывает основное содержание работы, суть используемых методов и их возможности, обоснование научной проблемы, на решение которой направлена данная работа.

Объект: указывается выбранный для эксперимента объект (объекты), схема отбора проб или схема постановки эксперимента.

Оборудование и реактивы: указывается список приборов и аналитического оборудования, перечень реактивов (с расчетом концентраций, ходом приготовления).

Общие требования безопасности при выполнении работы: указывается, с какими реагентами, какой лабораторной посудой и на каких этапах эксперимента следует проявлять особую осторожность и внимание.

Ход работы: указывается способ подготовки проб к анализу (измерению), последовательность действий при выполнении анализа.

Выше указанные разделы готовятся студентами до начала лабораторной работы (т. е. входят в перечень заданий для самостоятельной работы см. ниже) и сдаются преподавателю перед началом лабораторной работы.

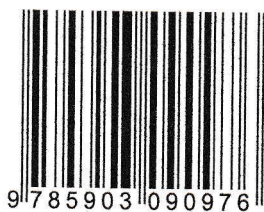
Ниже приведенные разделы отчета выполняются студентами после проведения лабораторной работы и сдаются преподавателю в печатной форме.

Результаты: в табличной форме приводятся экспериментальные данные с расчетом необходимых статистических показателей (диапазон измерений, точность, погрешности, характер распределения) в зависимости от характера эксперимента и использованного оборудования.

Обсуждение: проводится интерпретация экспериментальных данных, сведений из научной литературы, теоретических данных по проблеме исследования.

Заключение: обобщение полученных результатов.

Литература: приводится список литературы, использованной при подготовке лабораторной работы, обработке и интерпретации результатов.



Учебное издание

Ившина Ирина Борисовна

**БОЛЬШОЙ ПРАКТИКУМ
«МИКРОБИОЛОГИЯ»**

Учебное пособие

Верстка *П.Б. Коробова*
Корректор *О. Д. Камнева*
Дизайн обложки *П.Б. Коробова*

Издательство
ООО «Проспект Науки»
www.prospektnauki.ru
E-mail: info@prospektnauki.ru

Подписано в печать 28.10.2013. Формат 60×90/16. Объем 7 печ. л.
Тираж 1000 экз. Заказ 4230.

Отпечатано способом ролевой струйной печати
в ОАО «Первая Образцовая типография»
Филиал «Чеховский Печатный Двор»
142300, Московская область, г. Чехов, ул. Полиграфистов, д. 1
Сайт: www.chpd.ru, E-mail: sales@chpd.ru,
8(495)988-63-76, т/ф. 8(496)726-54-10