

УДК 541.13.620.193.8

ЛЕКТИНСВЯЗЫВАЮЩИЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДНОГО СОСТАВА ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ КОРРОЗИОННО-АГРЕССИВНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2013 г. Л. М. Пуриш, Л. Г. Асауленко, Д. Р. Абдулина, С. И. Войчук, Г. А. Иутинская

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев, Д 03680

e-mail: purish@serv.imv.kiev.ua

Поступила в редакцию 15.11.2012 г.

Методом трансмиссионной электронной микроскопии исследованы углеводные компоненты биопленок коррозионно-агрессивных бактерий с использованием лектинов, меченных коллоидным золотом. В составе экзополимеров выявлены аминоксахара – N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин и нейтральные углеводы D-глюкоза и D-манноза. Установлено, что лектины с одинаковой углеводной специфичностью в разной степени взаимодействовали с углеводными компонентами биопленок бактерий. Показано, что для выявления N-ацетил-D-галактозамина в биопленке *Desulf vibrio* sp. 10 и *Bacillus subtilis* 36 наиболее специфичен лектин LBA, а для N-ацетил-D-глюкозамина в биопленке *B. subtilis* 36 и *Pseudomonas aeruginosa* 27 – WGA. Для визуализации нейтральных углеводов в исследуемых культурах наиболее специфичен лектин PSA. Доказано, что лектины, меченные коллоидным золотом, можно применять как экспресс метод для выявления и локализации углеводов в составе гликополимеров экзополимерного матрикса биопленок.

DOI: 10.7868/S0555109913050103

В последнее десятилетие значительное внимание исследователей направлено на изучение биопленок, так как большинство важных природных и инженерных систем находятся под их воздействием [1–3]. Биопленки, сформированные сульфатредуцирующими бактериями и их гетеротрофными спутниками на поверхности стали, являются также факторами микробной коррозии [4, 5]. Установлено, что ведущую роль в формировании биопленок играют экзополисахариды (ЭПС), продуцируемые бактериями в экзополимерном матриксе [6–8]. В составе ЭПС обнаружены нейтральные углеводы, а также уроновые кислоты и аминоксахара, которые, взаимодействуя с другими компонентами матрикса с помощью карбоксильных и аминокгрупп, участвуют в формировании структуры биопленки [9, 10]. Помимо этого, полисахариды способны связывать в матриксе ионы металлов и сульфиды, активизируя таким образом коррозионный процесс [5]. Поэтому всестороннее исследование различными методами углеводного состава экзополимерного матрикса биопленок является актуальным.

Ранее нами был исследован состав экзополимерного матрикса, продуцируемого коррозионно-агрессивным микробным сообществом при формировании биопленки на стали. Методом газожидкостной хроматографии проведен анализ моносахаридного состава углеводных компонентов экзополимерного матрикса биопленки. Установлено наличие в его составе нейтральных

углеводов, а также уроновых кислот и аминоксахаров [11].

В настоящее время в научных исследованиях все большее распространение завоевывает полифазный анализ, при котором сопоставляются результаты, полученные разными методами, с целью их дополнения или детализации. Одним из таких подходов при исследовании поверхности бактериальных клеток, наряду с биохимическими методами, является применение в качестве молекулярных зондов меченых лектинов.

Меченые лектины успешно используются при исследовании микробных культур для зондирования структур клеточной поверхности, изучения бактериальных капсул [12, 13] и локализации углеводов на поверхности клетки [14]. Свойство лектинов проявлять максимальное сродство к олигосахаридам строго определенной структуры дает также возможность изучения определенных углеводных компонентов, продуцируемых бактериями при формировании биопленки.

Лектины, меченные флуоресцентными красителями, применяются как маркеры для исследования пространственной локализации гликополимеров, продуцируемых *in situ* в модельных биопленках с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) [15–19]. Применение этой *in situ* техники позволяет оценить ЭПС-специфичные гликоконъюгаты и даже дифференцировать несколько их типов [20]. Однако этот метод не всегда доступен.

Таблица 1. Характеристика лектинов, используемых в работе (НПО “Лектинтест”)

Лектин	Источник получения лектина	Название	Углеводная специфичность	Молекулярная масса, кДа	Количество субъединиц в молекуле	Количество центров связывания углеводов*
Конканавалин А	<i>Canavalia ensiformis</i> , семена	Con A	α -D-глюкоза α -D-манноза	102	4 α	4
Лектин завязей пшеницы	<i>Triticum vulgare</i> , завязи	WGA	N-ацетил-D-глюкозамин, сиаловая кислота	36	2 α	2
Лектин картофеля	<i>Solanum tuberosum</i> , клубни	STA	N-ацетил-D-глюкозамин	105	2	—
Лектин чечевицы	<i>Lens culinaris</i> , семена	LCA	α -D-глюкоза α -D-манноза	48	2 α 2 β	2
Лектин гороха	<i>Pisum sativum</i> , семена	PSA	α -D-глюкоза-D-манноза	48	4 α β	—
Лектин сои	<i>Glycine max</i> , бобы	SBA	N-ацетил-D-галактозамин	110	4 α	2
Лектин фасоли	<i>Phaseolus limensis</i> , семена	LBA	N-ацетил-D-галактозамин	127	4	—

* “—” — нет данных.

Цель работы — исследование возможности использования лектинов, меченных коллоидным золотом, для определения углеводных компонентов биопленки, образуемой на поверхности стали коррозионно-агрессивными бактериями, методом трансмиссионной электронной микроскопии.

МЕТОДИКА

Объекты исследования. В работе использованы ранее выделенные нами из коррозионно-агрессивного сульфидогенного микробного сообщества бактерии *Desulfovibrio* sp. 10, *Bacillus subtilis* 36, *Pseudomonas aeruginosa* 27, а также искусственно созданная из этих монокультур ассоциация [21].

Методы культивирования. Моно- и ассоциативные культуры выращивали на жидкой среде Постгейта “В” [21] во флаконах объемом 50 мл, инокулированной в зависимости от варианта опыта культурами бактерий в экспоненциальной фазе роста. Количество посевного материала составляло 10% от объема среды, начальный титр монокультур — 10^7 кл./мл. Биопленку наращивали на образцах стали 3. Стальные образцы предварительно обрабатывали согласно методике, описанной в [11], затем погружали во флаконы и герметически закрывали резиновыми пробками. Инкубировали при 28°C в течение 10 сут. Каждый опыт ставили в 3 повторностях.

Коммерческие препараты лектинов. Использованные в опыте препараты лектинов, меченные коллоидным золотом (НПО “Лектинтест”, Львов), приведены в табл. 1. Выбор лектинов для данного исследования обусловлен предварительно проведенным нами биохимическим анализом моносахаридного состава экзополимерного матрикса вышеуказанных бактерий [11], а также данными литературных источников о составе углеводов в биопленке [6, 8–10].

Лектины использовали в виде золь, который содержал в качестве консерванта 0.02% азида натрия, 10–20% этиленгликоля в 0.01 М фосфатном буферном растворе (рН 6.5–8.5). Размер частиц коллоидного золота составлял 8–12 нм. Концентрация лектинов по $A_{520} = 5.0 \pm 0.2$. Растворы лектинов готовили согласно инструкции производителя.

Подготовка образцов для электронной микроскопии. Препараты биопленки для электронной микроскопии получали методом отпечатков. Для этого после окончания экспозиции стальные образцы с образованной на них биопленкой вынимали из флаконов, затем на поверхность биопленки накладывали медные сеточки, покрытые формваровой пленкой. После 1 мин экспозиции, сеточки с отпечатком биопленки осторожно снимали и высушивали на воздухе. Для получения препаратов суспензионных культур на сеточки наносили суспензию бактерий (10–20 мкл) и также высушивали на воздухе.

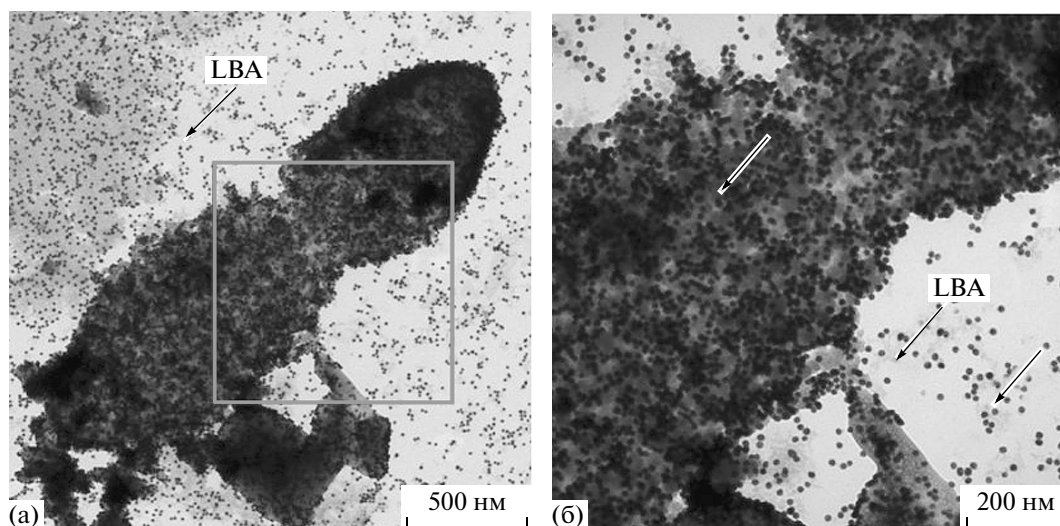


Рис. 1. Связывание лектинов с углеводами *Desulfovibrio* sp. 10 в биопленке. Масштабная метка: а – 500 нм, б – 200 нм. На рис. 1–3 локализация частиц коллоидного золота на поверхности клетки и во внеклеточном матриксе выборочно указана стрелками.

На сеточки с образцами биопленки и суспензионных культур наносили раствор соответствующего лектина, меченного коллоидным золотом, и выдерживали 1 ч для связывания лектина с углеводами экзополимерного матрикса. После экспозиции, для удаления остатков раствора лектинов, сеточки трижды промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Микроскопические исследования. Приготовленные образцы исследовали с использованием трансмиссионного электронного микроскопа JEM-1400 (“JEOL”, Япония) при ускоряющемся напряжении 80 кВ и общем инструментальном увеличении $\times 3000$ – 12000 . Методом рандомизированного отбора просматривали не менее 20 полей зрения. Количество коллоидных частиц золота, связанных с углеводными компонентами экзополимерного матрикса биопленки и суспензии, подсчитывали в 1 мкм^2 площади поля зрения, используя программу ImageJ ver. 143u (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Статистическую обработку полученных результатов проводили, используя стандартное отклонение по выборке связанных частиц коллоидного золота в поле зрения с помощью программы MS Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Способность лектинов специфически взаимодействовать с различными углеводами позволяет использовать их при изучении свойств, структуры и локализации углеводсодержащих биополимеров, а также для идентификации биологических объектов. Используя лектинсвязывающий анализ

для биохимической характеристики биопленок, необходимо знать полный спектр углеводного связывания данного лектина. Однако стандартные лектины из каталога, по данным производителя, испытываются только относительно некоторых углеводов. Как правило, эти углеводы имеют важное значение для биологических исследований клетки, но не обязательно могут присутствовать в экзополимерах природных биопленок. Кроме того, некоторые специфические гликоконъюгаты, например альгинат, могут быть уникальными для бактерий и биопленок [8].

Учитывая это, мы сочли целесообразным исследовать специфичность ряда коммерческих лектинов относительно углеводов, продуцируемых в экзополимерном матриксе бактериями компонентами коррозионно-агрессивного сообщества.

С помощью трансмиссионной электронной микроскопии нами было показано, что связывание лектинов с углеводами происходило непосредственно в экзополимерном матриксе, а также на поверхности бактериальных клеток, о чем свидетельствовало наличие частиц коллоидного золота. Меченные коллоидным золотом лектины визуализировались на снимках как небольшие округлые электронно-плотные частицы размером 8–12 нм (рис. 1–3).

Для определения в биопленке N-ацетил-D-галактозамина были использованы меченые лектины фасоли LBA и сои SBA, имеющие соответствующую углеводную специфичность (табл. 2). В биопленке *Desulfovibrio* sp. 10 и *B. subtilis* 36, а также ассоциативной культуры отмечено связывание вышеуказанных лектинов с углеводами, о чем свидетельствовало наличие частиц коллоидного золо-

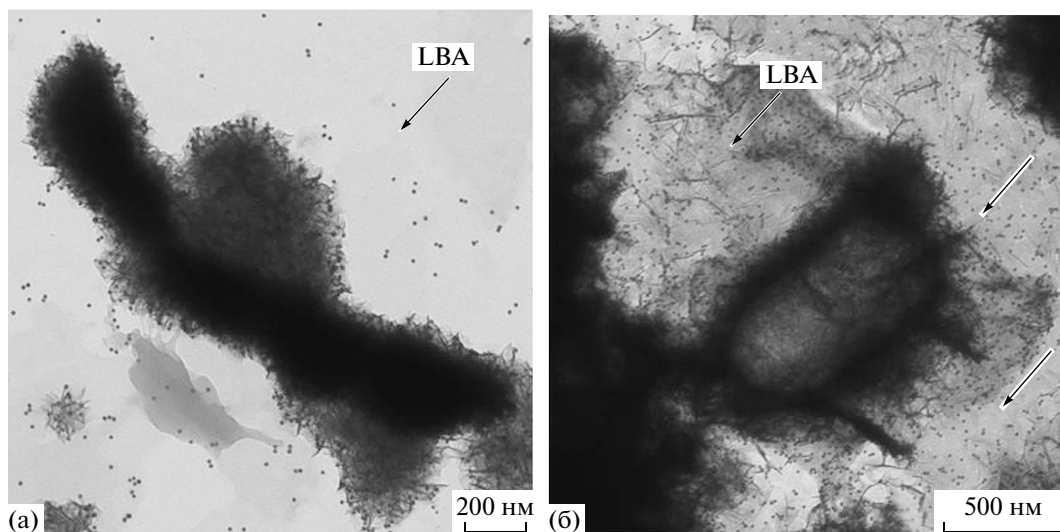


Рис. 2. Связывание лектина LBA с углеводами в био пленке: а – *B. subtilis* 36, в – *P. aeruginosa* 27. Масштабная метка: а – 200 нм; б – 500 нм.

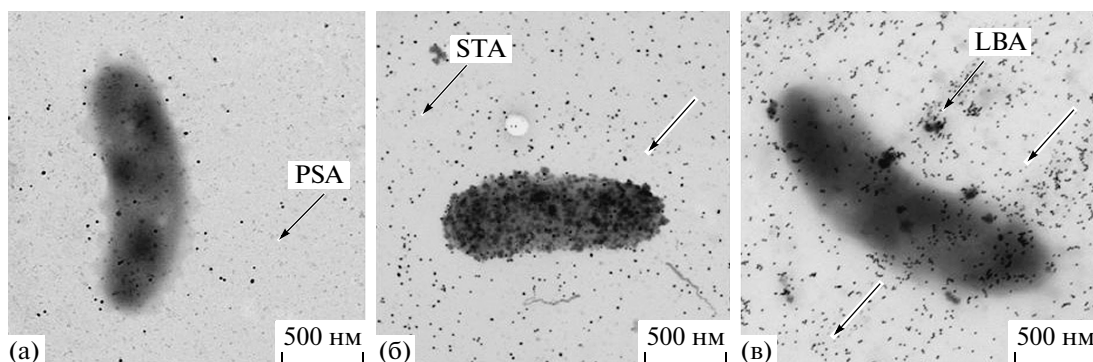


Рис. 3. Связывание лектинов с углеводами в суспензионной культуре *Desulfovibrio* sp. 10: а – лектин PSA, б – лектин STA, в – лектин LBA. Масштабная метка – 500 нм.

та. Количество лектина LBA, связанного с N-ацетил-D-галактозамином в био пленке *Desulfovibrio* sp. 10 и *B. subtilis* 36, было в 3.8 и 6 раз соответствен-

но больше по сравнению с лектином SBA, что свидетельствовало о необходимости исследования матрикса этих культур с наиболее для них специ-

Таблица 2. Связывание лектинов с углеводными компонентами в био пленке*

Био пленка, сформированная бактериями	Лектин						
	LBA	SBA	STA	WGA	LSA	PSA	Con A
	Специфичность						
	N-ацетил-D-галактозамин		N-ацетил-D-глюкозамин		D-глюкоза, D-манноза		
<i>Desulfovibrio</i> sp.10	178 ± 15*	47 ± 17	109 ± 30	69 ± 32	21 ± 7	136 ± 30	13 ± 2
<i>Bacillus subtilis</i> 36	384 ± 33	65 ± 15	24 ± 7	100 ± 7	22 ± 6	51 ± 20	32 ± 12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27	53 ± 24	47 ± 18	46 ± 16	132 ± 11	15 ± 2	20 ± 11	11 ± 5
Искусственная ассоциация	151 ± 40	13 ± 6	64 ± 15	33 ± 8	29 ± 6	25 ± 6	4 ± 1

* Количество частиц коллоидного золота/мкм².

Таблица 3. Связывание лектинов с углеводными компонентами в суспензионных культурах*

Суспензия бактерий	Лектин						
	LBA	SBA	STA	WGA	LSA	PSA	Con A
	Специфичность						
	N-ацетил-D-галактозамин		N-ацетил-D-глюкозамин		D-глюкоза, D-манноза		
<i>Desulfovibrio</i> sp. 10	494 ± 117	133 ± 18	118 ± 33	10 ± 3	10 ± 2	16 ± 4	12 ± 6
<i>Bacillus subtilis</i> 36	128 ± 21	41 ± 8	33 ± 12	29 ± 14	8 ± 3	11 ± 6	3 ± 1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27	87 ± 7	16 ± 5	28 ± 9	12 ± 5	7 ± 3	26 ± 14	2 ± 1
Искусственная ассоциация	291 ± 91	85 ± 21	68 ± 21	17 ± 9	8 ± 2	10 ± 3	4 ± 1

* – Количество частиц коллоидного золота/мкм².

фичным лектином LBA. В биопленке, образованной *P. aeruginosa* 27, количество частиц коллоидного золота не зависело от вида лектина и было почти одинаковым для SBA и LBA, мишенями для которых был N-ацетил-D-галактозамин, поэтому для выявления в биопленке псевдомонад этого углевода могут быть использованы оба лектина.

Визуализация связывания лектина LBA с N-ацетил-D-галактозамином, продуцируемом бактериями в биопленке, представлена на рис. 1, 2. На выделенном (рис. 1а) и увеличенном (рис. 1б) участке отпечатка биопленки *Desulfovibrio* sp. 10 четко видна локализация меченого лектина LBA непосредственно на поверхности клетки и во внеклеточном матриксе. На препаратах отпечатков биопленки *Bacillus subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27 также зафиксировано разное количество связанных лектином частиц коллоидного золота, что подтверждает наличие N-ацетил-D-галактозамина (рис. 2).

Для выявления N-ацетил-D-глюкозамина использованы лектины картофеля STA и завязей пшеницы WGA. Согласно полученным результатам с углеводами биопленки *Desulfovibrio* sp. 10, активнее всего взаимодействовал лектин STA, а для *B. subtilis* 36 и *P. aeruginosa* 27 более специфичен лектин WGA.

Для определения нейтральных углеводов, а именно D-маннозы и D-глюкозы, применяли лектины чечевицы – LSA, гороха – PSA и конканавалин А. Наибольшее количество частиц коллоидного золота в экзополимерном матриксе всех исследуемых биопленок было выявлено при использовании лектина PSA. Лектины LSA и конканавалин А в незначительном количестве связывались с D-маннозой и D-глюкозой. Так, количество частиц коллоидного золота лектина PSA, связанных в биопленке *Desulfovibrio* sp. 10, было в 6.5 и 10.5 раз больше, чем при использовании лектинов LSA и Con A соответственно.

Следует отметить, что конканавалин А является наиболее распространенным и широко употребляемым лектином в биологических исследованиях [12]. Однако, используя его для изучения углеводного состава ЭПС бактерий – компонентов коррозионно-агрессивного сообщества, мы установили, что Con A проявлял наименьшее сродство к углеводам во всех вариантах опыта. Возможно, в исследуемых экзополимерных комплексах было мало мишеней именно для этого лектина.

Результаты лектинсвязывающего анализа для визуализации гликоконъюгатов, продуцируемых суспензионными культурами, практически не отличались от таковых в биопленке. Наиболее специфичным для идентификации N-ацетил-D-глюкозамина был лектин STA, N-ацетил-D-галактозамина – лектин LBA, а для определения D-глюкозы и D-маннозы больше всего подходил лектин PSA (табл. 3). Например, в биопленке и суспензионной культуре *Desulfovibrio* sp. 10 лектин LBA связывал наибольшее количество N-ацетил-D-галактозамина 178 ± 14.9 и 494 ± 117 частиц коллоидного золота соответственно. Визуализация связывания лектинов PSA, STA и LBA с углеводами, продуцируемыми в экзополимере суспензионной культуры *Desulfovibrio* sp. 10, представлена на рис. 3. Частицы коллоидного золота в разном количестве обнаружены на поверхности клетки и во внеклеточном матриксе.

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что лектины с одинаковой углеводной специфичностью в разной степени взаимодействовали с углеводами, содержащимися в экзополимерах бактерий – компонентов сульфидогенного микробного сообщества. Полученные результаты, по всей вероятности, можно объяснить как свойствами лектинов, так и структурой углеводов, являющихся мишенью в изучаемой системе. Ранее [22–24] исследователями было показано, что взаимодействие лектинов с углеводами зависит от

структуры последних: от конформации пиранозных и фуранозных форм моносахаридных остатков, входящих в состав углеводной части биополимеров, от конфигурации аномерного центра моносахаридов (D- или L-формы пиранозного кольца углевода), от α - или β -положения гликозидной связи при C₁-позиции моносахарида. Следовательно, к наиболее важным факторам взаимодействия лектинов с углеводами следует отнести такие, как стереоспецифичность при связывании моносахаридов с лектинами, присутствие или отсутствие координационных связей, водородных, а также гидрофобных и Ван дер Ваальсовы взаимодействия.

Кроме того, при исследовании гликоконъюгатов ЭПС биопленки *in situ*, методом флуоресцентного лектинсвязывающего анализа, авторами также было установлено, что специфичность лектина зависит от применяемого красителя, используемого для маркировки лектина. Показано, что на специфичность лектинов влияет как присутствие, так и природа флуорохрома [16, 17].

Можно сделать заключение, что выбирая лектины для визуализации углеводов в составе экзополимерного матрикса, продуцируемого бактериями, необходимо основываться на биохимических исследованиях экзополимеров и особенностях бактериальной культуры, а также учитывать углеводную специфичность лектина. На основании специфичности лектинов, меченных коллоидным золотом, нами были визуализированы в составе ЭПС исследуемых бактерий нейтральные углеводы – D-глюкоза, D-манноза и аминсахара – N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин. Подобные результаты были получены с применением флуоресцентного лектинсвязывающего анализа [19]. Исследователями было установлено, что в составе ЭПС, продуцируемых цианобактериями, содержатся нейтральные углеводы, такие, как фруктоза и галактоза, аминсахара N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин и сиаловые кислоты. С помощью меченных флуорохромами лектинов показано, что биопленка, образующаяся *Deinococcus geothermalis* на нержавеющей стали, интенсивно взаимодействовала с лектином WGA, что свидетельствовало о наличии N-ацетил-D-глюкозамина и N-ацетилсиаловой кислоты [25].

Таким образом, сравнивая полученные ранее результаты биохимического исследования экзополимерного матрикса, продуцируемого компонентами сульфидогенного микробного сообщества [11] с данными лектинсвязывающего анализа, можно констатировать, что использование лектинов, меченных коллоидным золотом, возможно для предварительного выявления и локализации углеводов в составе гликополимеров экзополимерного матрикса. Дополнительными помехами

применения лектинсвязывающего анализа является, в первую очередь, сложная природа матрикса биопленки, а также вероятность отсутствия мишени для используемого лектина, огромное разнообразие потенциальных комбинаций углеводов. Чтобы исключить некоторые неопределенности, каждая биопленочная система должна быть протестирована набором различных лектинов.

В то же время, в отличие от биохимического метода, лектинсвязывающий анализ позволяет исследовать полностью гидратированные (нативные) матриксы в моно- и ассоциативных культурах биопленок для выявления качественного углеводного состава, без выделения индивидуальных полисахаридов. Таким образом, лектинсвязывающий анализ может быть использован *in situ* для исследования распределения гликополимеров в микробных сообществах.

Использование углеводной специфичности лектинов, меченных коллоидным золотом, при изучении углеводов, продуцируемых бактериями, является наиболее удобной, доступной и быстрой условной тест-системой, не дающей, однако, полной характеристики состава экзополимерного матрикса.

Естественно, для изучения биопленок целесообразно, наряду с лектинсвязывающим анализом, применять биохимические методы исследования, что позволит не только визуализировать локализацию гликополимеров в ЭПС, но и определить их углеводный состав. В этом аспекте доступные в настоящее время лектины могут быть ценным инструментом для оценки распределения гликополимеров в сложных системах биопленок. Лектинсвязывающий анализ можно также рассматривать как экспресс-метод определения состава экзополимерного матрикса в полностью гидратированных и сложных биопленочных системах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Watnick P., Kolter R.* // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 10. P. 2675–2679.
2. *Davey M.E., O'Toole G.A.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V. 64. № 4. P. 847–867.
3. *Смирнова Т.А., Дибенко Л.В., Азизбекян Р.Р. Романова Ю.М.* // Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 435–446.
4. *Hamilton W.A.* // Biofouling. 2003. V. 19. № 1. P. 65–76.
5. *Beech I., Summer J.* // Current Opinion Biotechnol. 2004. V. 15. № 3. P. 181–186.
6. *Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P.* // Molecules. 2009. V. 14. № 7. P. 2535–2554.
7. *Flemming H.C., Neu T.R., Watnick D.* // J. Bacteriol. 2007. V. 189. № 22. P. 7945–7947.
8. *Christensen B.E.* // J. Biotechnol. 1989. V. 10. № 3–4. P. 181–202.

9. Lewandowski Z. Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control. / Ed L.V. Evans. Harwood: Acad. Publishers, 2000. P. 1–17.
10. Sutherland I.W. // Microbiology. 2001. V. 147. № 1. P. 3–9.
11. Пуриш Л.М., Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Васильев В.Н., Иутинская Г.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 3. С. 294–301.
12. Лахтин В.М. // Биохимия. 1995. Т. 60. № 2. С. 87–217.
13. Vasse J.M., Dazzo F.B., Truchet G.L. // J. Gen. Microbiol. 1984. V. 130. № 11. P. 3037–3047.
14. Jones A.H., Lee C.–C., Moncla B.J., Robinovitch M.R., Birdsell D.C. // J. Gen. Microbiol. 1986. V. 132. № 12. P. 3381–3391.
15. Sanford B.A., Thomas V.L., Mattingly S.J., Ramsay M.A., Miller M.M. // J. Ind. Microbiol. 1995. V. 15. № 3. P. 156–161.
16. Neu T.R., Swerhone D.W., Lawrence J.R. // Microbiology. 2001. V. 147. № 2. P. 299–313.
17. Neu T.R., Manz B., Volke F., Dynes J.J., Hitchcock A.P., Lawrence J.R. // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. № 72. P. 1–21.
18. Lawrence J.R., Swerhone G.D.W., Leppard G.G., Araki T., Zhang X., West M.M., Hitchcock A.P. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 9. P. 5543–5554.
19. Zippel B., Neu T.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2011. V. 77. № 2. P. 505–516.
20. Lawrence J.R., Swerhone G.D.W., Neu T.R. // Can. J. Microbiol. 2007. V. 53. № 3. P. 450–458.
21. Асауленко Л.Г., Абдулина Д.Р., Пуриш Л.М. // Микробиол. журн. 2009. Т. 72. № 4. С. 3–10.
22. Liener I.E., Sharon N., Goldstein I.J. The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Orlando: Acad. Press, 1986. 600 p.
23. Weiss W.I., Drickamer K. // Annu. Rev. Biochem. 1996. V. 65. P. 441–473.
24. Elgavish S., Shaanan B. // Trends Biochem. Sci. 1997. V. 22. № 12. P. 462–467.
25. Kolari M. // Academic Dissertation in Microbiology. University of Helsinki. 2003 ISBN 952-10-0345-6.

Lectin-Binding Analysis of the Biofilm Exopolymeric Matrix Carbohydrate Composition of Corrosion-Aggressive Bacteria

L. M. Purish, L. G. Asaulenko, D. R. Abdulina, S. I. Voychuk, and G. A. Iutynskaya

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine

e-mail: purish@serv.imv.kiev.ua

Received November 15, 2012

Abstract—The carbohydrate components of biofilms of corrosion-aggressive bacteria were studied by transmission electron microscopy using lectins labeled with colloidal gold. N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-D-galactosamine, and neutral carbohydrates D-glucose and D-mannose were found within the exopolymeric matrix. Lectins with equal carbohydrate specificity demonstrated different degrees of interaction with the carbohydrate components of bacterial biofilms. To identify N-acetyl-D-galactosamine in biofilms of *Desulfovibrio* sp. 10 and *Bacillus subtilis* 36, the LBA lectin appeared to be most specific; in the case of N-acetyl-D-glucosamine in biofilms of *B. subtilis* 36 and *Pseudomonas aeruginosa* 27, the WGA lectin. During visualization of neutral carbohydrates in the studied cultures, the PSA lectin was most specific. We have shown that lectins labeled with colloidal gold could be used as an express method for the identification and localization of carbohydrates in glycopolymers of the biofilm exopolymeric matrix.