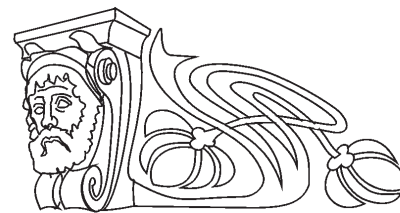




УДК 579.233/234+577.114

## ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ НА СТРУКТУРУ ГЛИКОПОЛИМЕРОВ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp7



С. С. Евстигнеева<sup>1</sup>, Я. В. Халэпа<sup>2</sup>, Е. Н. Сигида<sup>1</sup>,  
Ю. П. Федоненко<sup>1</sup>, С. А. Коннова<sup>1,2</sup>, В. В. Игнатов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

<sup>2</sup>Саратовский государственный университет

E-mail: room308@ibppm.sgu.ru

Проведено исследование влияния различных условий выращивания на структуру гликополимеров поверхности бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 – липополисахаридов внешних мембран и капсульных полисахаридов. Показано, что увеличение продолжительности культивирования (до 120 ч), природа источника углерода, соотношение углерода к азоту (С/Н) в жидкой среде, а также культивирование на агаризованной питательной среде вызывают изменения биополимерного состава, перераспределение соотношения жирных кислот в липидах А и моносахаридных остатков в исследуемых биогликанах. Отмечены значительные модификации в структуре капсульного полисахарида исследуемого штамма при культивировании на плотной малатно-солевой среде, проявляющиеся в трёхкратном увеличении содержания галактозы и наличии ундекановой жирной кислоты.

**Ключевые слова:** *Azospirillum*, липополисахарид, капсульный полисахарид, условия культивирования.

### The Influence of Different Growth Conditions on the Structure of the Bacterial Surface Glycopolymers of *Azospirillum brasilense* Sp7

S. S. Yevstigneeva, Ya. V. Khalepa, E. N. Sigida,  
Yu. P. Fedonenko, S. A. Konnova, V. V. Ignatov

The effect of different growth conditions on the structure of the bacterial surface glycopolymers of *Azospirillum brasilense* Sp7 (lipopolysaccharides from outer membranes and capsular polysaccharides) was investigated. Changes in the biopolymer composition, ratio of fatty acids of the lipid A and monosaccharide composition of the O-polysaccharide were detected when bacteria were cultivated in the agaric nutrient medium as well as in liquid media depend on the time of bacteria cultivation (120 h), the carbon source and carbon/nitrogen (C/N) content. The cultivation of the bacteria in a solid malate-salt medium resulted in essential modifications in the structure of the capsular polysaccharide, namely threefold increase of the content of galactose and the presence of undecanoic acid.

**Key words:** *Azospirillum*, lipopolysaccharide, capsular polysaccharide, growth conditions.

Ризосфера представляет собой один из крупнейших резервуаров микроорганизмов в природе, которые подвержены влиянию постоянно меняющихся абиотических и биотических факторов среды, что определяет их высокий

адаптационный потенциал. Первым рубежом защитной системы бактерий является поверхность клетки, непосредственно контактирующая с окружающей средой. У грамтрицательных бактерий преобладающими компонентами поверхности являются липополисахариды (ЛПС), которые занимают до 75% поверхности внешней мембраны [1, 2]. Они представляют собой макромолекулы, состоящие из трех различных по строению и функциям частей: липида А, корового олигосахарида и О-специфических полисахаридных цепей (ОПС). Также значительный вклад во взаимодействие с объектами окружающей среды вносит капсула – органоид бактериальной клетки, в состав которого входят белки и капсульный полисахарид (КПС) [3]. Эти важнейшие гликополимеры поверхности играют ключевую роль в установлении ассоциативных отношений с растениями [4].

Одним из интенсивно исследуемых объектов почвенной микрофлоры являются diaзотрофные грамтрицательные бактерии рода *Azospirillum*, принадлежащие к  $\alpha$ -субклассу протеобактерий. Азоспириллы широко распространены в почвах различных климатических зон, образуют растительно-микробные ассоциации с ценными зерновыми культурами, такими как пшеница, просо, сорго, рис, кукуруза, овёс и т.п. [5, 6], что позволяет использовать их в качестве компонента многих микробных удобрений [7]. Для повышения эффективности их применения необходимо выявить закономерности изменения состава и структуры гликополимеров поверхности бактерий рода *Azospirillum* под влиянием различных факторов среды.

Ранее для бактерий р. *Azospirillum* установлены изменения состава и свойств экстракционных полисахаридов при варьировании в питательной среде значений рН, отношения углерод/азот (С/Н), характера источников углерода и азота, концентрации солей и продолжительности



выращивания [8–12]. Применительно к ЛПС и КПС подобные исследования носят фрагментарный характер.

Цель настоящего исследования – выявление влияния на состав ЛПС и КПС культуры *A. brasiliense* Sp7 продолжительности роста бактерий, использования различных источников углерода и соотношения C/N в питательной среде, а также культивирования на поверхности агаризованной среды.

### Материалы и методы

Бактерии *A. brasiliense* Sp7 культивировали в синтетической жидкой питательной среде (планктонная культура) [13] при 30°C в течение 24 и 120 ч, то есть до окончания экспоненциальной и стационарной фаз роста, соответственно, либо на поверхности той же среды с добавлением 2 %-го агара – синтетическая твёрдая среда в течение 72 ч. В качестве источников углерода использовали натриевую соль яблочной кислоты или фруктозу при стандартном (3 : 1) и увеличенных (10 : 1 и 40 : 1) значениях C/N.

С поверхности бактериальных клеток капсульный материал удаляли отмытием при механическом перемешивании 0.15 М NaCl с добавлением 0.02%-го NaN<sub>3</sub> в течение шести суток с ежедневной заменой отмывающего раствора [14].

Из внешней мембраны высушенных ацетоном бескапсульных клеток ЛПС выделяли 45%-ным горячим водным фенолом по методу Вестфала [15]. Экстракты диализовали, концентрировали, освобождали от белковых примесей 40%-ной ТХУ (до pH 2.7), вновь диализовали и лиофилизировали. Капсульный материал, собранный в течение первых двух дней отмывания клеток, концентрировали, диализовали против дистиллированной воды, центрифугировали при 13000×g и лиофилизировали. КПС подвергали хроматографическому разделению на колонке с Sepharose CL-4B (45 × 1.8 см, V<sub>0</sub>=35 мл), используя для элюции 0.025 М бикарбонатаммонийный буфер (pH 8.3).

Мягкий кислотный гидролиз ЛПС и КПС выполняли 2%-ной уксусной кислотой при 100°C в течение 4–5 ч. Гидролизаты центрифугировали при 13000×g для отделения нерастворимых в воде липидов А. Углеводсодержащие супернатанты разделяли гель-проникающей хроматографией на колонках с носителем Sephadex G-50 (46×1.6 см, V<sub>0</sub>=35 мл) с 0.025 М пиридин-ацетатным буфером (pH 4.5) в качестве элюента. Профили элюции строили, определяя спектрофотометрически поглощение продуктов реакции элюата с фенолом

и серной кислотой при  $\lambda = 490$  нм на приборе Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия).

Биополимерный состав гликополимеров поверхности устанавливали с использованием общепринятых колориметрических методов, описанных ранее [13]. Измерения оптической плотности продуктов реакций проводили на спектрофотометре Specord 40.

Электрофорез препаратов ЛПС и КПС осуществляли в 15%-ном Ds-Na-ПААГ [16]. Визуализацию образцов выполняли окрашиванием гелей красителем на основе азотнокислого серебра, как описано в работе [17].

Двойную радиальную иммунодиффузию образцов ЛПС в 1%-ном агарозном геле выполняли в соответствии со стандартной методикой [18].

Анализ моносахаридного состава проводили методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) ацетатов полиолов [19] на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабжённым капиллярной колонкой DB-5 (Hewlett-Packard, США), в градиенте температур от 160°C (1 мин) до 290°C со скоростью нагрева 7°C/мин.

Анализ состава и соотношения жирных кислот липидов А в виде их метиловых эфиров (МЭЖК) выполняли ГЖХ с использованием хроматографа GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабжённого капиллярной колонкой EQUITY-1 в градиенте температур от 130 до 250°C со скоростью нагрева 4°C/мин. Метилирование жирных кислот осуществляли согласно [20].

### Результаты и их обсуждение

Для реализации цели исследования получены разные варианты культуры бактерий *A. brasiliense* Sp7 в результате выращивания в течение 120 ч в синтетических жидких средах с малатом натрия либо фруктозой при варьировании C/N. Скрининг антигенных свойств ЛПС полученных вариантов культур проводили методом встречной радиальной иммунодиффузии с использованием полученных нами ранее анти-ЛПС антител (гомологичных) *A. brasiliense* Sp7. Изменение антигенных свойств и как следствие отсутствие взаимодействия с гомологичными антителами, было отмечено только для ЛПС, экстрагированного из бактерий, рост которых осуществлялся в синтетической жидкой среде с фруктозой (5 суток) и C/N = 40 : 1.

Для детального анализа возникших изменений в составе поверхностных гликополимеров *A. brasiliense* Sp7 были проведены сравнительные исследования ЛПС и КПС названных выше вариантов культуры. Выходы ЛПС составили от 3.4 до 10.3% от массы сухих клеток, а высоко-



молекулярных фракций КПС, полученных при гель-хроматографии, достигали в среднем 5% от веса бактериальных клеток.

Выделенные гликополимеры поверхности бактерий *A. brasilense* Sp7 подвергали электрофоретическому разделению. Все препараты ЛПС показали сходный характер миграции макромолекул в ПААГ (рис. 1, а). При очевидном преобладании высокомолекулярных фракций S-форм (молекулы ЛПС, в которых представлены все три компонента: липид А, кор и ОПС), во всех образцах ЛПС присутствовали также и R-формы молекул (ЛПС, в которых нет О-полисахарида). Известно, что высокомолекулярная фракция КПС азоспирилл представлена липополисахарид-белковым комплексом (ЛПБК) [4]. Ранее

для бактерий *A. brasilense* Sp7 была показана антигенная идентичность О- и К-антигенов [21], что позволяет предположить схожесть структурной организации как самих полимеров, так и их полисахаридных компонентов. Однако наличие белковой составляющей в КПС, очевидно, существенно отразилось на их электрофоретических профилях (см. рис. 1, б). Исследуемые КПС характеризовались большей микрогетерогенностью, и между препаратами видны различия по количеству молекул, по длине полисахаридной цепи, а также по количеству и интенсивности отдельных фракций. Депротеинизированные КПС имели сходные электрофоретические профили с таковыми ЛПС, но при явном преобладании высокомолекулярных фракций (см. рис. 1, в).

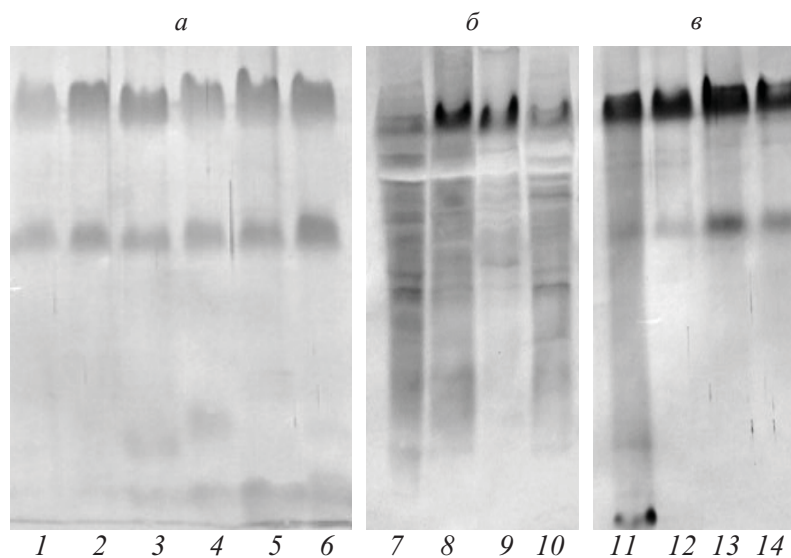


Рис. 1. ПААГ-электрофорез препаратов ЛПС (а), интактных и депротеинизированных КПС (б, в) бактерий *A. brasilense* Sp7, рост которых осуществлялся на среде с малатом натрия 24 ч (1) и 120 ч (2, 7, 11); – на среде с фруктозой 24 ч (3, 8, 12) и 120 ч (4); – на среде с фруктозой при C/N = 40 : 1 120 ч (5, 9, 13); – на агаризованной среде с маламом натрия 72 ч (6, 10, 14). Окраска азотнокислым серебром после периодатного окисления

В составе всех выделенных лиофилизированных препаратов гликополимеров было выявлено присутствие характерных для них компонентов: углеводов, КДО, фосфора и белков (табл. 1). Анализ результатов табл. 1 показал, что накоплению углеводов в составе ЛПС, а по сути удлинению цепи О-специфических полисахаридов, способствуют увеличение продолжительности выращивания в жидкой маламной среде, либо добавление фруктозы в среду вместо малама, либо увеличение значения C/N. В большинстве исследуемых препаратов количество белков и фосфора не претерпевало

существенных изменений. Исключение составили образцы ЛПС (как, впрочем, и КПС) пятисуточных бактерий, выращенных в среде с фруктозой с соотношениями C/N 3 : 1 и 40 : 1, в их составе содержание фосфора увеличилось примерно в три раза. Возможно, увеличение количества фосфора в составе препарата повлияло на физико-химические свойства молекул, что и привело к изменению их антигенных свойств и как следствие отсутствию взаимодействия с гомологичными антителами.

Содержание углеводов в КПС бактерий планктонных культур было ниже по сравнению



Таблица 1

Химический состав образцов ЛПС и КПС бактерий *A. brasilense* Sp7, выращенных при различных условиях

Компонент	Вариант	Жидкая среда с малатом натрия				Жидкая среда с фруктозой					Твёрдая среда с малатом натрия			
		1 сут		5 сут		1 сут		5 сут						
		ЛПС <sup>1</sup>	КПС <sup>2</sup>	ЛПС	КПС	ЛПС	КПС	ЛПС	ЛПС	КПС	3 : 1*	40 : 1	ЛПС	КПС
Выход, % от массы сухих клеток		5.7	н.о.	6.7	4.2	3.4	5.4	3.6	4.1	5.0	10.3	5.4		
Содержание, весовые %	%, от МЭЖК	Углеводы	21.9±0.3	27.0	81.6±8.6	18.5±1.1	76.5±9.0	49.2±1.3	39.7±2.7	60.7±2.9	50.7±2.4	28.1±1.5	57.6±4.1	
		Белок	0.6±0.1	19.3	1.1±0.03	3.1±0.2	сл.	2.2±0.3	1.8±0.2	сл.	1.4±0.1	2.0±0.1	2.3±0.3	
		КДО	0.6±0.1	3.0	2.6±0.1	1.0±0.02	2.1±0.1	1.4±0.1	1.9±0.1	1.7±0.1	1.2±0.1	2.8±0.2	0.9±0.1	
		Фосфор	2.5±0.2	0.5	0.9±0.3	1.2±0.2	0.4±0.2	1.6±0.2	4.6±0.3	5.0±0.8	3.6±0.9	0.6±0.1	0.6±0.2	
		C <sub>11:0</sub>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	8
		3-ОН-C <sub>14:0</sub>	40.9	24.7	28	16	37	16	22	35	42	46	13	
		C <sub>16:1</sub>	–	11.0	3	5	3	7	6	4	–	–	–	7
		C <sub>16:0</sub>	4.9	12.6	3	–	5	8	7	4	–	–	4	6
3-ОН-C <sub>16:0</sub>	30.3	20.5	17	13	20	13	19	18	30	21	10			
C <sub>18:1</sub>	8.7	24.1	46	49	31	50	41	35	8	24	50			
C <sub>19:0</sub>	–	7.1	3	17	4	6	5	4	20	5	6			

Примечание. «<sup>1</sup>», «<sup>2</sup>» – данные из работ [22] и [13]; «\*» – анализ КПС не осуществляли; «н.о.» – не определяли; «–» – ЖК отсутствовала; «сл.» – содержание компонента менее 0.1%.

с ЛПС при всех условиях, за исключением суточных культур, выращенных в жидкой малатной среде. Культивирование азоспирилл на агаризованной среде также способствовало накоплению углеводов в КПС.

Методом ГЖХ в составе липидов А, как ЛПС, так и КПС, планктонных культур *A. brasilense* Sp7 были идентифицированы насыщенные, ненасыщенные, а также 3-гидроксилированные жирные кислоты, имеющие длину углеродной цепи от C<sub>14</sub> до C<sub>19</sub> (см. табл. 1). В ЛПС и КПС всех вариантов изучаемого штамма преобладали 3-гидрокситетрадекановая (3-ОН-C<sub>14:0</sub>), 3-гидроксигексадекановая (3-ОН-C<sub>16:0</sub>) и октадеценная (C<sub>18:1</sub>) жирные кислоты, на долю которых приходилось 69–92% от суммы площадей всех пиков. Полученные сведения согласуются с данными по составу жирных кислот ЛПС представителей бактерий рода *Azospirillum*, освещенными в работе [23]. В то же время в препаратах КПС бактерий, рост которых осуществлялся на агаризованной питательной среде, была идентифицирована ундекановая жирная кислота (8%), появление которой коррелировало с уменьшением

доли гидроксикислот. Отмечена вариабельность в зависимости от условий культивирования соотношения маркерных жирных кислот 3-ОН-C<sub>14:0</sub> и 3-ОН-C<sub>16:0</sub> к C<sub>18:1</sub> в составе липидов А ЛПС исследуемых бактерий. Так, в ЛПС азоспирилл, рост которых осуществлялся в течение 5 суток в средах с фруктозой и малатом натрия при стандартном C/N, данное соотношение составляло ~1 : 1. Однако доля гидроксикислот возрастала до ~2 : 1 в составе липидов А ЛПС при выращивании бактерий до окончания экспоненциальной фазы роста в среде с фруктозой при C/N=3 и до ~3 : 1 на агаризованной малатной среде; а также до ~1.5 : 1 при культивировании на среде с фруктозой (5 суток) при C/N=40.

В составе гидрофобной части КПС соотношение маркерных гидроксикислот к предельной жирной кислоте в большинстве вариантов составляло ~1 : 2, однако у препарата КПС бактерий, выращенных в среде с фруктозой при 40 : 1, достигало ~9 : 1 за счёт снижения содержания C<sub>18:1</sub>. Также следует отметить, что количество предельной жирной кислоты C<sub>19:0</sub> в составе гидрофобной части КПС возрастало с



увеличением продолжительности культивирования бактерий, независимо от источника углерода и соотношения С/Н.

Анализ моносахаридного состава исследуемых гликополимеров позволил обнаружить нейтральные моносахариды Rha, Fuc, Gal примерно в равных процентных долях, в то время как содержание GlcN было приблизительно в два раза ниже (табл. 2). Это объясняется пониженной чувствительностью детектора ГЖХ к

аминосахарам, что определяет необходимость введения поправочного коэффициента. С учетом полученных данных было определено соотношение моносахаридов в исследуемых биогликанах ~1 : 1 : 1 : 1, которое согласуется с полученными ранее сведениями о структуре ОПС *A. brasilense* Sp7 [24]. Для КПС бактерий, выращенных на агаризованной питательной среде с малатом натрия, было показано возрастание содержания Gal примерно в три раза.

Таблица 2

Моносахаридный состав гликополимеров поверхности бактерий *A. brasilense* Sp7, культивируемых при различных условиях, % от суммы площадей всех пиков

Моносахарид	Жидкая среда с малатом натрия				Жидкая среда с фруктозой					Твёрдая среда с малатом натрия	
	1 сут		5 сут		1 сут		5 сут				
	ЛПС <sup>1</sup>	КПС <sup>2</sup>	ЛПС	КПС	ЛПС	КПС	3 : 1*	ЛПС	ЛПС	КПС	ЛПС
Rha	27	47	25	32	23	30	37	27	38	26	14
Fuc	25	15	31	27	33	25	26	30	26	26	13
Gal	22	21	21	23	22	24	16	19	22	24	60
GlcN	16	1	12	9	10	7	10	1	4	10	3

Примечание. «<sup>1</sup>», «<sup>2</sup>» – данные из работ [24] и [13]; «\*» – анализ КПС не осуществляли.

Увеличение содержания Gal в моносахаридном составе могло быть обусловлено синтезом нового полисахарида в составе КПС либо наличием в образце примесей. Хроматографическое разделение КПС бактерий *A. brasilense* Sp7, выращенных на агаризованной среде, на колонке с носителем Sepharose CL-4В продемонстрировало наличие двух пиков, соответствующих ЛПБК и полисахарид-липидному комплексу (ПСЛК) (рис. 2, а, фракции 1 и 2). Состав ЛПБК по соотношению отдельных моносахаридов совпадал с

проанализированным ранее суммарным препаратом КПС. Углеводную часть ЛПБК, полученную мягким кислотным гидролизом, фракционировали гель-фильтрацией на колонке с носителем Sephadex G-50 (см. рис. 2, б). Повышенное содержание Gal было выявлено только в составе фракции 1, соответствующей О-полисахариду (см. рис. 2, б), что подтвердило наше предположение об индукции синтеза нового полисахарида в составе КПС *A. brasilense* Sp7 при культивировании бактерий на плотной среде.

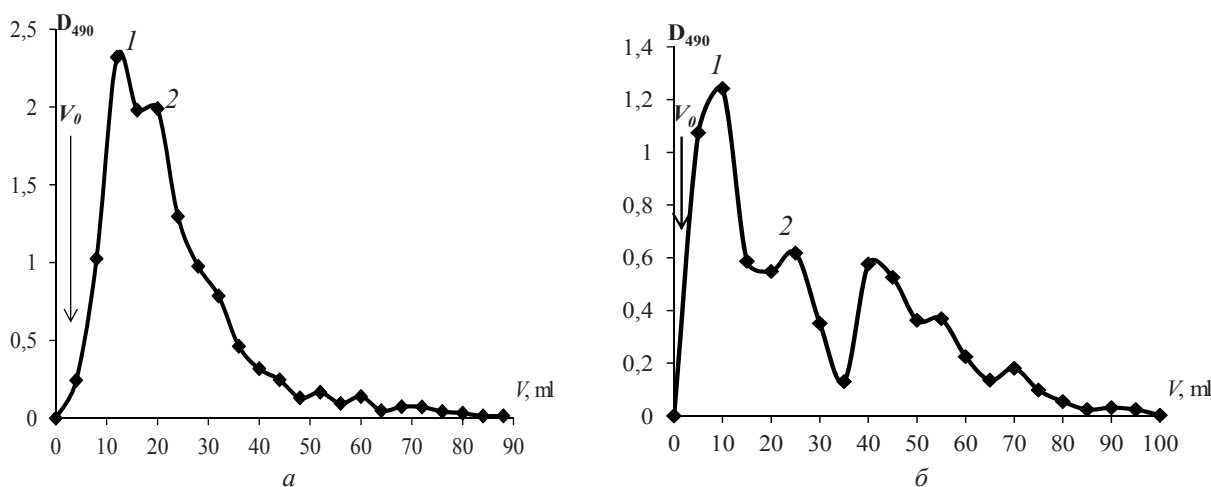


Рис. 2. Гель-хроматография КПС *A. brasilense* Sp7 на колонке с Sepharose CL-4В (а) и водорастворимой части гидролизата КПС на колонке с Sephadex G-50 (б) (пояснения в тексте)



Результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод о том, что возраст культуры, природа источника углерода и соотношение С/Н в среде культивирования бактерий способны вызывать изменения в биополимерном составе как ЛПС, так и КПС бактерий *A. brasilense* Sp7, в том числе выражающиеся в изменении соотношения 3-гидроксилированных и непредельных жирных кислот липидных компонентов исследуемых гликополимеров. Наибольшие изменения были отмечены в составе КПС при культивировании бактерий на агаризованной малатно-солевой среде в течение 72 ч. Очевидно, подобные модификации связаны с тем, что капсула бактериальной клетки, выполняя защитную функцию, в первую очередь реагирует на резкую смену условий существования. Полученные в ходе проведенных исследований представления о закономерностях модификации гликополимеров азоспирилл позволяют прогнозировать и индуцировать изменения поверхности бактерий, способствующие их адаптации и повышающие конкурентоспособность при формировании ассоциации с растениями.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 14-04-01658).

#### Список литературы

1. Silipo A., De Castro C., Lanzetta R., Parrilli M., Molinaro A. Lipopolysaccharides // Prokaryotic cell wall compounds – structure and biochemistry / eds. H. König, H. Claus, A. Varma. Springer, Heidelberg, 2010. P. 133–154.
2. Raetz C. R., Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins // Ann. Rev. Biochem. 2002. Vol. 71. P. 635–700.
3. Оводов Ю. С. К-антигены бактерий. Строение К-антигенов бактерий (обзор) // Биохимия. 2006. Т. 71, № 9. С. 1155–1174.
4. Коннова С. А., Федоненко Ю. П., Игнатов В. В. Структура и функции гликополимеров поверхности азоспирилл // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / под ред. В. В. Игнатова. М. : Наука, 2005. С. 46–69.
5. Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L. E. *Azospirillum*-plant relationships : physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) // Can. J. Microbiol. 2004. Vol. 50. P. 521–577.
6. Steenhoudt O., Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects // FEMS Microbiol. Rev. 2000. Vol. 24. P. 487–506.
7. Завалин А. А. Биопрепараты, удобрения и урожай. М. : Изд-во ВНИИА, 2005. 302 с.
8. Коннова С. А., Федоненко Ю. П., Макаров О. Е., Игнатов В. В. Исследование влияния условий выращивания бактерий *Azospirillum brasilense* на состав их внеклеточных полисахаридосодержащих материалов // Изв. РАН. Сер. Биол. 2003. Вып. 4. С. 430–437.
9. Bahat-Samet E., Castro-Sowinski S., Okon Y. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2004. Vol. 237. P. 195–203.
10. Burdman S., Jurkevitch E., Schwartsburd B., Hampel M., Okon Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense* : effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components // Microbiology. 1998. Vol. 144. P. 1989–1999.
11. Del Gallo M., Haegi A. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* // Symbiosis. 1990. Vol. 9. P. 155–161.
12. Fischer S. E., Miguel M. J., Mori G. B. Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress // FEMS Microbiol. Lett. 2003. Vol. 219. P. 53–62.
13. Konnova S. A., Makarov O. E., Skvortsov I. M., Ignatov V. V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound form by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interactions // FEMS Microbiol. Lett. 1994. Vol. 118. P. 93–100.
14. Егоренкова И. В., Коннова С. А., Федоненко Ю. П., Дыкман Л. А., Игнатов В. В. Роль полисахаридосодержащих компонентов капсулы *Azospirillum brasilense* в адсорбции бактерий на корнях проростков пшеницы // Микробиология. 2001. Т. 70, №1. С. 45–50.
15. Вестфаль О., Янн К. Бактериальные липополисахариды // Методы химии углеводов / под ред. Н. К. Кочеткова. М. : Мир, 1967. С. 325–332.
16. Hitchcock P. J., Brown T. M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. Vol. 154. P. 269–277.
17. Tsai C. M., Frasch C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels // Anal. Biochem. 1982. Vol. 119. P. 115–119.
18. Uchterlony O., Nilsson L.-A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis // Handbook of Experimental Immunology / ed. D. M. Weir. Oxford : Blackwell Scientific Publication, 1978. P. 19.16–19.23.
19. Sawardeker J. S., Sloneker J. H., Jeanes A. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas liquid chromatography // Anal. Chem. 1965. Vol. 37. P. 1602–1604.
20. Mayer H., Tharanathan R. N., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria // Methods Microbiol. 1985. Vol. 18. P. 157–207.
21. Матора Л. Ю., Щеголев С. Ю. Антигенная идентичность капсульных полисахаридов, экзополисахаридов и О-специфических полисахаридов в *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2002. Т. 71, № 2. С. 211–214.



22. Сигида Е. Н., Федоненко Ю. П., Смолькина О. Н., Коннова С. А., Игнатов В. В. Сравнительная характеристика липополисахаридов бактерий штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 и его спонтанного мутанта Sp7.K2 // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2012. Т. 12, вып. 1. С. 61–65.
23. Игнатов В. В., Коннова О. Н., Бойко А. С., Фомина А. А., Федоненко Ю. П., Коннова С. А. Характеристика состава жирных кислот липидов А липополи-

сахаридов бактерий рода *Azospirillum* // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2009. Т. 9, вып. 1. С. 36–41.

24. Sigida E. N., Fedonenko Y. P., Shashkov A. S., Zdorovenko E. L., Konnova S. A., Ignatov V. V., Knirel Y. A. Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7 // Carbohydr. Res. 2013. Vol. 380. P. 76–80.

УДК 581.9 (470.44)

## СЕМЕЙСТВО ГОРЕЧАВКОВЫЕ (GENTIANACEAE): МАТЕРИАЛЫ К КРАСНОЙ КНИГЕ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ (на основании фондов гербария СГУ (SARAT))



Е. А. Архипова, В. А. Болдырев, М. В. Степанов

Саратовский государственный университет  
E-mail: arhipovaea@mail.ru

В работе приводятся результаты обработки гербарных образцов видов семейства Gentianaceae, занесенных в Красную книгу Саратовской области (2006) и хранящихся в Гербарии СГУ (SARAT).  
**Ключевые слова:** Красная книга, Саратовская область, Gentianaceae, Гербарий СГУ (SARAT).

### Family Gentianaceae: Materials for Red Book of Saratov Region (Based Funds Herbarium SSU (SARAT))

Е. А. Arkhipova, V. A. Boldyrev, M. V. Stepanov

The article presents the results of the inventory of herbarium collections of species of Gentianaceae, listed in the Red Book of the Saratov region (2006) and stored in the Herbarium of SSU (SARAT).

**Key words:** Red Book, Saratov Region, Gentianaceae, Herbarium of Saratov State University (SARAT).

Одним из важных моментов при решении вопроса о внесении вида в список охраняемых растений на территории области является анализ гербарных коллекций. По сведениям гербарных этикеток представляется возможным точно определить место нахождения и время сбора вида.

Были детально изучены сборы видов семейства Gentianaceae, занесенных в Красную книгу Саратовской области [1]. Каждый лист был проверен на правильность определения; эти данные занесены в электронную базу Гербария СГУ. Со временем произошли изменения границ административных районов Саратовской области, в связи с этим авторами выяснено современное положение точек сборов. В случаях, если этого сделать не удалось, авторы цитируют этикетку, она обозначена звездочкой и вынесена в конец списка.

### *Gentiana cruciata* L.

#### Базарно-Карабулакский район

с. Ивановка, гора Шихан, опушка леса, 23.6.1967;

#### Вольский район

окр. с. Ю. Маза, около леса, дно оврага, среди (слово написано неразборчиво), 7.1984, Legit Марус;

сосновый бор бл. с. Н. Чернавки, 20.7.1950, Хвалина Н. Я.;

#### Татищевский район

с. Ягодная Поляна, 12.8.1948;

#### Турковский район

урочище Синие кусты, бывшее с. Майка, 5.7.1987;

#### Хвалынский район

Варваринский заказник, опушка леса, лугово-черноземные карбонатные почвы, 13.7.1978, В. Колеснев;

Варваринский заказник, опушка леса, лугово-черноземные карбонатные почвы, 13.7.1978, Legit Латухина Е., Determ Колеснева Е.;

Хвалынский район, урочище Таши, 11.7.1982;

урочище Таши, 16.7.1982, Борисовская;

окр. г. Хвалынска, Ташевские горы, Три шишки, вершина склона, 31.5.1990, Купатадзе Г. А.;

окр. г. Хвалынска, окр. лагеря “Лесная поляна”, 13.7.2008, Архипова Е. А., Серова Л. А.;

### *Gentiana pneumonanthe* L.

#### Саратов и его окрестности

Разбойщина, 29.7.1913;

Зеленый остров, 14.8.1929, Determ Хвалина Н.;