



УДК 579.233/234+577.114

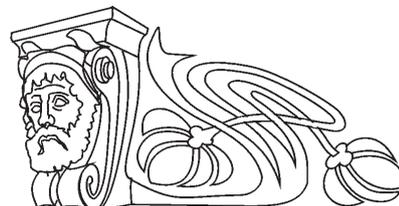
ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИД-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ КАПСУЛЫ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SR80 И Sp245 ПРИ РОСТЕ НА АГАРИЗОВАННОЙ СРЕДЕ

Я. В. Халэпа¹, С. С. Евстигнеева², Е. Н. Сигида²,
Ю. П. Федоненко², С. А. Коннова^{1,2}, В. В. Игнатов²

¹Саратовский государственный университет

²Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН, Саратов

E-mail: room308@ibppm.sgu.ru



Проведено сравнительное исследование структурных особенностей липополисахарид-белковых комплексов (ЛПБК) из капсульного материала бактерий *Azospirillum brasilense* SR80 и Sp245, выращенных в жидкой и агаризованной питательных средах. Анализ данных ГЖХ и ЯМР-спектроскопии выявил отличия структуры липидной и полисахаридной составляющих ЛПБК исследуемых бактерий, в зависимости от условий их культивирования. Отличительной особенностью ЛПБК обоих штаммов, рост которых осуществлялся на плотной среде, являлось наличие ундекановой кислоты и дополнительного полисахарида галактановой природы.

Ключевые слова: *Azospirillum brasilense*, капсульный полисахарид, агаризованная питательная среда.

Characterization of the Structural Features of the Capsular Lipopolysaccharide-Protein Complexes of Bacteria *Azospirillum brasilense* SR80 and Sp245 at Growth on Agaric Medium

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

We performed comparisinal studies of the structure of lipopolysaccharide-protein complexes (LPPCs) from *Azospirillum brasilense* SR80 and Sp245, which were cultivated in liquid and agaric nutrient media. Analysis of GLC and NMR spectroscopy data demonstrated differences between lipid and polysaccharide components of the LPPCs of bacteria under study, depending on the cultivation conditions. The presence of undecanoic acid and additional galactan polysaccharide was shown to be the characteristic feature of the LPPCs of the both strains, cultivated on agaric medium.

Key words: *Azospirillum brasilense*, capsular polysaccharide, agaric nutrient medium.

Многообразие защитных реакций почвенных бактерий, возникающих при стрессовых воздействиях, позволяет им приспосабливаться к меняющимся условиям среды обитания [1]. В качестве одного из адаптационных механизмов устойчивости к неблагоприятным факторам выступают изменения компонентов поверхности бактериальных клеток, которые участвуют во взаимодействии с различными объектами сре-

ды, в том числе с растительными организмами при формировании симбиозов. Такая стратегия переживания стрессовых условий характерна для грамотрицательных бактерий рода *Azospirillum*, способных активно влиять на развитие и рост многих растений, в том числе злаковых культур [2, 3]. Показано, что у азоспирилл в ответ на изменения температуры, значений pH, концентрации хлорида натрия, природы источников углерода и азота и т.д. наблюдаются модификации состава, свойств и структур гликополимеров поверхности: экзополисахаридов (ЭПС), капсульных полисахаридов (КПС) и липополисахаридов (ЛПС) внешней мембраны [4, 5].

Условия среды непосредственно влияют на формирование и эффективность растительно-микробных взаимодействий, поэтому изучение защитных реакций азоспирилл в ответ на стрессовые воздействия на молекулярном уровне поможет оптимизировать использование биологических удобрений как альтернативу химическим.

Ранее на примере бактерий *A. brasilense* SR80 было показано, что увеличение продолжительности выращивания до пяти суток, соответствующих стационарной фазе роста, в жидкой питательной среде не сопровождалось изменениями в структуре высокомолекулярной фракции КПС – липополисахарид-белкового комплекса (ЛПБК). В то же время выращивание данной культуры на агаризованной среде вызвало повышение содержания галактозы в моносахаридном составе ЛПБК [6]. Наличие сведений о сходстве адаптивных реакций азоспирилл в ответ на неблагоприятные воздействия окружающей среды [7, 8] подтверждают актуальность дальнейших исследований отмеченных ранее изменений капсульных гликополимеров. В связи с этим целью нашего исследования являлась



сравнительная характеристика структурных изменений ЛПБК бактерий *A. brasilense* SR80 и Sp245 при переходе от планктонной формы существования в иммобилизованную на поверхности агаризованной среды.

Материалы и методы

В работе были использованы бактерии *A. brasilense* SR80 и Sp245, любезно предоставленные коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов). Исследуемые культуры выращивали в жидкой синтетической питательной среде [9] до окончания экспоненциальной фазы роста, а также на поверхности 2%-ной агаризованной среды при 30°C в течение 72 ч (стационарная фаза роста). С поверхности клеток удаляли капсулу отмыванием 0.15 М NaCl с 0.02%-ным NaN₃ при механическом перемешивании на протяжении шести суток с ежедневной заменой отмывающего раствора [10]. Капсульный материал, собранный в течение первых двух дней отмывания клеток, концентрировали, диализовали, центрифугировали при 13000×g и лиофилизировали. Фракционирование КПС осуществляли гель-фильтрацией на колонке с носителем Sepharose CL-4B (45 × 1.8 см, V₀ = 35 мл) с 0.025 М бикарбонатаммонийным буфером (рН 8.3) в качестве элюента и собирали фракции, соответствующие ЛПБК.

Деградацию ЛПБК выполняли 2%-ной уксусной кислотой при 100°C в течение 1.5 ч. Для отделения нерастворимых в воде липидов А гидролизаты центрифугировали при 13000×g. Водорастворимые фракции разделяли гель-проникающей хроматографией на колонках с носителем Sephadex G-50 (46 × 1.6 см, V₀ = 35 мл) с 0.025 М пиридин-ацетатным буфером (рН 4.5) в качестве элюента. Поглощение продуктов реакции элюата с фенолом и серной кислотой определяли спектрофотометрически при λ = 490 нм на приборе Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия).

Биополимерный состав гликополимеров капсулы устанавливали с использованием традиционных колориметрических методов, описанных в работе [9]. Измерения оптической плотности продуктов реакций проводили на спектрофотометре Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия).

Анализ моносахаридного состава осуществляли методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) ацетатов полиолов [11] на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабжённом капиллярной колонкой DB-5 (Hewlett-Packard, США), в

градиенте температур от 160°C (1 мин) до 290°C со скоростью нагрева 7°C/мин.

Состав и соотношение жирных кислот липидов А в виде их метиловых эфиров (МЭЖК) определяли 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 [12].

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) выполняли в 96-луночных полистирольных планшетах (Медполимер, Россия). По 50 мкл последовательных двукратных разведений образцов (в 0.15 М фосфатно-солевом буфере, рН 7.2) вносили в лунки планшетов. В эксперименте применяли поликлональные кроличьи анти-ЛПС антитела и козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). В качестве субстратного реагента использовали перекись водорода с *o*-фенилендиамином. Измерения оптического поглощения исследуемых проб проводили на иммуноферментном анализаторе Multiscan Ascent при λ = 492 нм (Thermo scientific, Финляндия).

Спектры ЯМР снимали на спектрометре Avance II 600 (Bruker, Германия) в 99.96%-ной D₂O при 27°C. В качестве внутреннего стандарта использовали ацетон. Образцы предварительно лиофилизировали дважды из 99.9%-ной D₂O.

Результаты и их обсуждение

Бактерии *A. brasilense* SR80 были выделены с поверхности проростков пшеницы *Triticum aestivum* L., произрастающей в Саратовской области [13]. Культура *A. brasilense* Sp245, которая была изолирована с поверхностно стерилизованных корней пшеницы, произрастающей в Бразилии [14], является эндофитом, колонизирующим внутренние ткани корней растения-хозяина. Сравнение защитных реакций бактерий р. *Azospirillum*, различающихся по способности заселять поверхность или внутренние ткани растительных организмов, важно для понимания механизма их адаптации к различным стрессовым воздействиям.

В ходе очистки и фракционирования КПС получены ЛПБК *A. brasilense* SR80 и Sp245 планктонных (ЛПБК_{SR80 (пл)} и ЛПБК_{Sp245 (пл)}) и иммобилизованных (ЛПБК_{SR80 (им)} и ЛПБК_{Sp245 (им)}) культур соответственно, выходы которых варьировали от 45 до 47%. В составе исследуемых гликополимеров были идентифицированы углеводы (29–88%), белки (до 3%),



2-кето-3-дезоксиктоновая кислота (0.6–1.8%), остатки фосфорной (до 1.5%) и характерных для азоспирилл жирных кислот: 3-гидрокситетрадекановой, 3-гидроксигексадекановой и октадеценовой. Также в составе жирных кислот ЛПБК_{SR80 (им)} и ЛПБК_{Sp245 (им)} впервые была обнаружена ундекановая (C_{11:0}) кислота (16-23% от суммы идентифицированных МЭЖК). Ранее C_{11:0} была выявлена как минорный компонент в составе липидов А ЛПС фитопатогенных бактерий *Xanthomonas hortorum* pv. *vitians* [15], а также *Selenomonas sputigena*, являющегося возбудителем периодонтита [16].

Углеводные составляющие исследуемых гликополимеров, полученные после мягкого кислотного гидролиза, разделяли гель-фильтрацией и собирали фракции, соответствующие полисахаридам (ПС), выходы которых варьировали от 28 до 36%.

Результаты исследования моносахаридного состава методом ГЖХ показали, что ПС_{Sp245 (пл)} состоял из рамнозы с примесью галактозы, а в ПС_{Sp245 (им)} было выявлено наличие рамнозы и галактозы в соотношении ~1:1.6. Аналогичные изменения были обнаружены в составе ПС_{SR80 (им)}: соотношение рамнозы, фукозы, ксилозы, галактозы и галактозамина составляло ~1:4:1:12:1.5, что по содержанию галактозы в три раза выше по сравнению с ПС_{SR80 (пл)}.

Предварительные исследования, проведенные методом спектроскопии ЯМР, показали, что в спектрах ¹H-ЯМР ПС_(им) обоих штаммов присутствуют дополнительные сигналы, помимо тех, что характерны для ПС_(пл) (рис. 1). Учитывая преобладание в моносахаридном составе ЛПБК_{SR80 (им)} и ЛПБК_{Sp245 (им)} галактозы, можно предположить, что новый ПС по своей химической природе представлен галактаном.

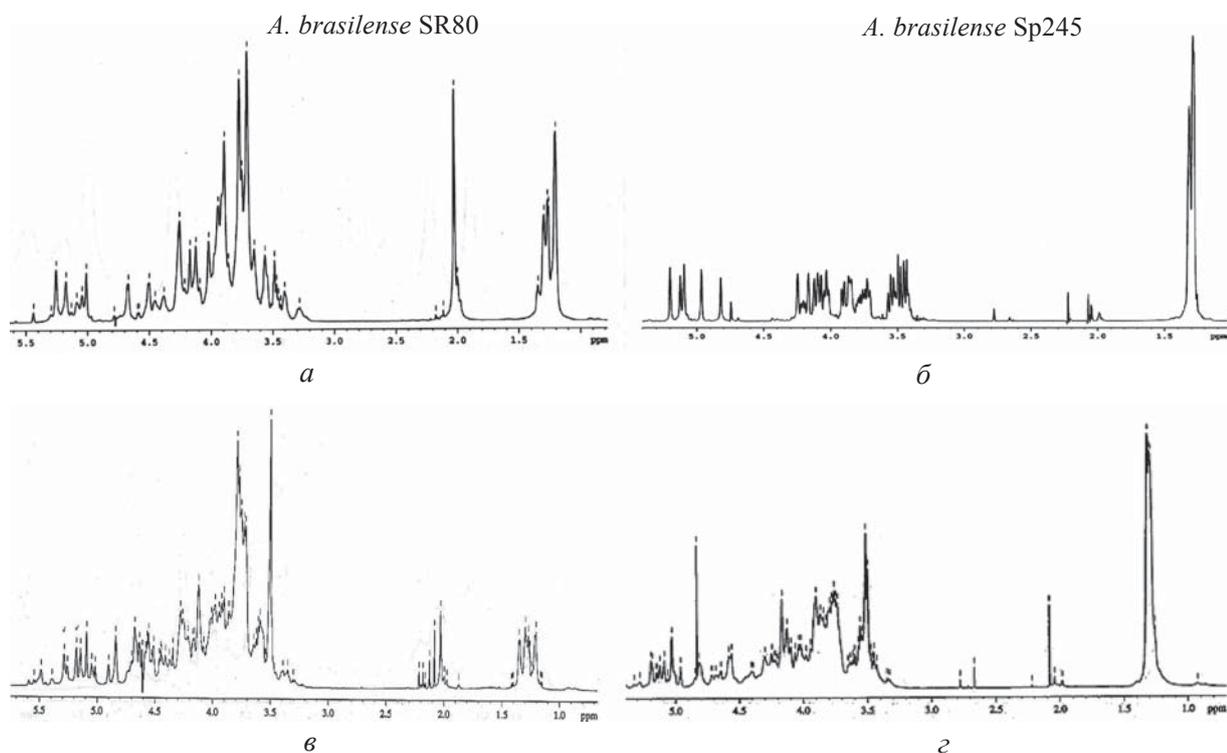


Рис. 1. ¹H-ЯМР спектры полисахаридов, выделенных из ЛПБК бактерий *A. brasilense* SR80 и Sp245 при планктонном (а, в) и иммобилизованном (б, г) культивировании

Тестирование антигенных свойств методом ИФА показало взаимодействие как ЛПБК_(им), так и ЛПБК_(пл) бактерий *A. brasilense* SR80 и Sp245 с полученными нами ранее гомологичными антителами к препаратам ЛПС этих культур (рис. 2). Этот факт, очевидно, свидетельствует о присутствии в препаратах общих антигенных

детерминант, что не исключает возможности появления в них и других антигенов. Из результатов ИФА следует увеличение интенсивности такого взаимодействия гомологичных антител с ЛПБК_(им) обеих культур, по сравнению с ЛПБК_(пл). Возможно, обнаруженный в ЛПБК_(им) галактан способствует презентированию из-

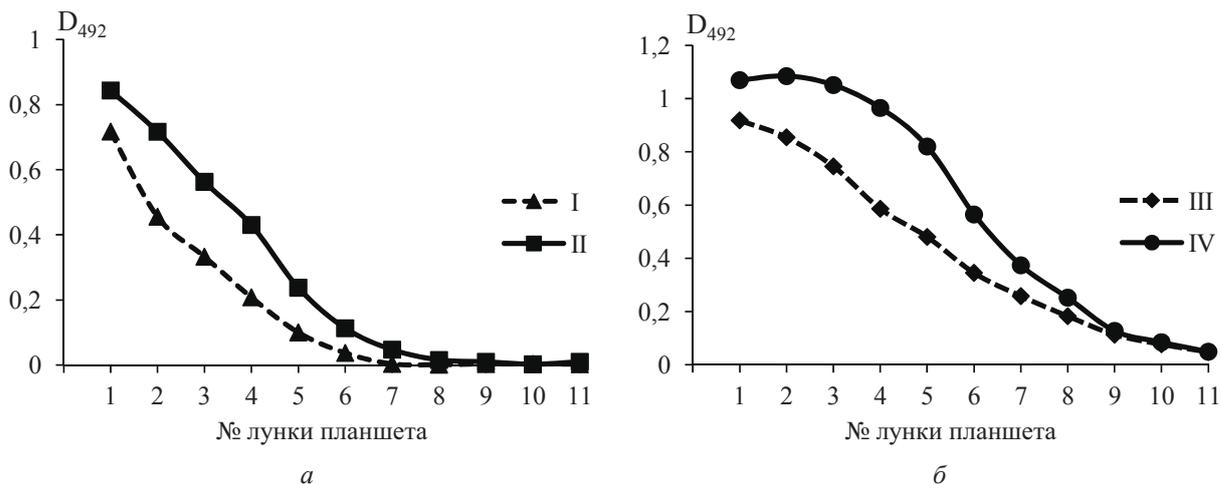


Рис. 2. Иммуноферментный анализ ЛПБК бактерий *A. brasilense* SR80 (а) и Sp245 (б), выращенных в жидкой (I, III) и твёрдой (II, IV) средах, с анти-ЛПС антителами

вестных антигенных детерминант либо несёт дополнительные детерминанты, узнаваемые поликлональными антителами.

При использовании агаризованных сред для выращивания бактерий имеет место гипотетическая возможность попадания агарозы во фракции исследуемых гликополимеров при смыве культуры с поверхности среды. Поскольку одним из неотъемлемых компонентов агарозы является кислотолабильный сахар 3,6-ангидрогалактоза, наличие примесей в исследуемых нами препаратах ПС, получаемых в результате кислотного гидролиза, предполагается маловероятным.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что культивирование азоспирилл на плотной среде сопровождается продукцией нового гликополимера в составе капсулы. Так как этот полимер имеет галактановую природу, не исключено, что таким образом бактерии реагируют на смену условий существования, защищаясь как от избыточного количества кислорода, так и от других факторов среды. Выращивание бактерий *A. lipoferum* Sp59b в присутствии флавоноида кверцетина (стрессовые условия) также сопровождалось накоплением галактозы в составе образца КПС, помимо рамнозы и глюкозы [7]. Подобные изменения в структуре ЭПС *A. brasilense* Cd были показаны при культивировании бактерий в условиях солевого стресса. В моносахаридном составе ЭПС идентифицирована галактоза (~90%) и следовые количества других сахаров (глюкозы, маннозы, ксилозы, фукозы, рамнозы и арабинозы) [8]. Бактерии *A. brasilense* имеют два гена, кодирующих синтез фермента

УДФ-глюкоза-4-эпимеразы, который осуществляет внутримолекулярные превращения УДФ-глюкозы в УДФ-галактозу и наоборот. В ответ на стрессовые условия азоспириллы через экспрессию данных генов регулируют уровень УДФ-глюкозы и УДФ-галактозы, участвующих в синтезе ЭПС, тем самым изменяя его структуру [17]. Возможно, при росте бактерий *A. brasilense* SR80 и Sp245 на плотной среде синтез ЛПБК претерпевает аналогичные изменения. Индуцирование синтеза нового гликополимера на основе галактозы может являться одной из защитных реакций азоспирилл в ответ на изменение условий существования.

Выражаем благодарность сотрудникам лаборатории химии углеводов Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН (г. Москва) за снятие ЯМР-спектров и старшему научному сотруднику лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН, канд. биол. наук Г. Л. Бурьгину за проведение ИФА.

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

Список литературы

1. Schimel J., Balsler T. C., Wallenstein M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function // Ecology. 2007. Vol. 88. P. 1386–1394.
2. Волкогон В. В. Ассоциативные азотфиксирующие микроорганизмы // Микробиол. журн. 2000. Т. 62, № 2. С. 51–68.
3. Лукин С. А., Кожевин П. А., Звягинцев Д. Г. Азоспириллы и ассоциативная азотфиксация у небобовых



- культур в практике сельского хозяйства // Сельскохоз. биология. 1987. Вып. 1. С. 51–58.
4. Коннова С. А., Федоненко Ю. П., Макаров О. Е., Игнатов В. В. Исследование влияния условий выращивания бактерий *Azospirillum brasilense* на состав их внеклеточных полисахаридсодержащих материалов // Изв. РАН. Сер. биол. 2003. Вып. 4. С. 430–437.
 5. 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.
 6. Халэпа Я. В., Суркина А. К., Гринёв В. С. Различия в структуре капсульных полисахаридов бактерий *Azospirillum brasilense* при планктонном и иммобилизованном культивировании // Исследования молодых учёных в биол. и экол. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та, 2013. Вып. 11. С. 101–106.
 7. Каневский М. В., Коннова С. А., Бойко А. С., Федоненко Ю. П., Сигида Е. Н., Игнатов В. В. Влияние флавоноидов на состав гликополимеров поверхности *Azospirillum lipoferum* Sp59b // Микробиология. 2014. Т. 83, № 2. С. 143–151.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Егоренкова И. В., Коннова С. А., Федоненко Ю. П., Дыкман Л. А., Игнатов В. В. Роль полисахаридсодержащих компонентов капсулы *Azospirillum brasilense* в адсорбции бактерий на корнях проростков пшеницы // Микробиология. 2001. Т. 70, №1. С. 45–50.
 11. 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.
 12. Mayer H., Tharanathan R. N., Weckesser J. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria // Methods Microbiol. 1985. Vol. 18. P. 157–207.
 13. Позднякова Л. И., Каневская С. В., Леванова Г. Ф., Барышева Н. Н., Пилипенко Т. Ю., Богатырёв В. А., Фёдорова Л. С. Таксономическое изучение азоспирилл, выделенных из злаков Саратовской области // Микробиология. 1988. Т. 57, №2. С. 275–278.
 14. Baldani V. L. D., Baldani J. I., Döbereiner J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. 1983. Vol. 29. P. 924–929.
 15. Molinaro A., Lanzetta R., Evidente A., Parrilli M., Holst O. Isolation and characterisation of the lipopolysaccharide from *Xanthomonas hortorum* pv. *vitians* // FEMS Microbiol. Lett. 1999. Vol. 181. P. 49–53.
 16. Kumada H., Watanabe K., Nakamu A., Haishima Y., Kondo S., Hisatsune K., Umemoto T. Chemical and biological properties of lipopolysaccharide from *Seleonomonas sputigena* ATCC 33150 // Oral. Microbiol. Immunol. 1997. Vol. 12. P. 162–167.
 17. Tripathi A. K., Mishra B. M., Tripathi P. Salinity stress responses in the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum* spp // J. Biosci. 1998. Vol. 23. P. 463–471.

УДК 502.31 + 332.01 + 304.442

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИНДЕКСА РАЗВИТИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА (на примере Волжского бассейна)

Н. В. Костина¹, Г. С. Розенберг¹, Г. Р. Хасаев², Г. В. Шляхтин³

¹Институт экологии Волжского бассейна РАН, Тольятти

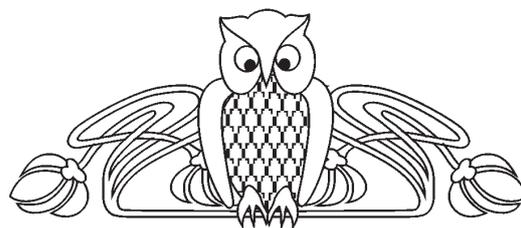
²Самарский государственный экономический университет

³Саратовский государственный университет

E-mail: biofac@sgu.ru

Обсуждаются индексы оценки устойчивого развития территории Волжского бассейна. С использованием экспертной информационной системы REGION проведен статистический анализ индекса развития человеческого потенциала, показана его связь с некоторыми экологическими параметрами.

Ключевые слова: индекс развития человеческого потенциала, Волжский бассейн, устойчивое развитие.



Statistical Analysis of the Human Development Index (for Example, Volga Basin)

N. V. Kostina, G. S. Rozenberg,
G. R. Khasaev, G. V. Shlykhtin

Assessment indexes of sustainable development of the territory of the Volga basin are discussed. Using expert information system