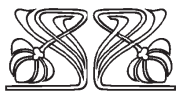
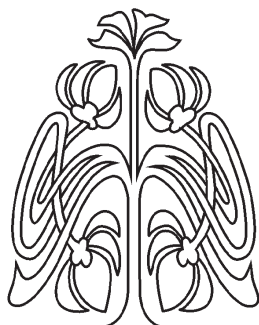
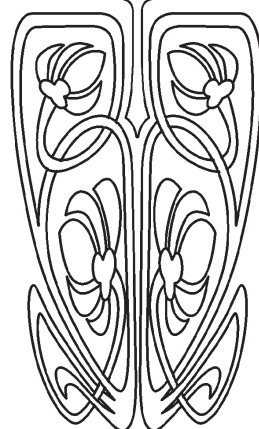




БИОЛОГИЯ



НАУЧНЫЙ
ОТДЕЛ



УДК (579.835+581.19)

ВЛИЯНИЕ КВЕРЦЕТИНА НА СТРУКТУРУ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM LIPOFERUM* SP59B

М. В. Каневский¹, С. А. Коннова¹, А. С. Бойко²,
Ю. П. Федоненко², В. В. Игнатов²

¹Саратовский государственный университет
E-mail: Konnovasa@yandex.ru

²Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: room308@ibppm.sgu.ru

Показано, что выращивание типового штамма бактерий *Azospirillum brasilense* Sp59b, изолированного из ризосферы пшеницы, в среде с флавоноидом кверцетином (продуцирующимся в растениях пшеницы) индуцирует синтез липополисахарида, отличающегося от исходного по структуре антигенных детерминант, макромолекулярной организации, моносахаридному составу, соотношению и набору жирных кислот. Полученные данные свидетельствуют о важной роли флавоноидов в ассоциативных взаимодействиях азоспирилл, которая реализуется при участии бактериальных ЛПС.

Ключевые слова: азоспириллы, взаимодействие, липополисахарид, кверцетин.

Influence of Quercetin on the Structure of the Outer Membrane Lipopolysaccharide of the Bacterium *Azospirillum lipoferum* Sp59b

M. V. Kanevsky, S. A. Konnova, A. S. Boyko, Yu. P. Fedonenko, V. V. Ignatov

It is shown that the cultivation of the Sp59b type strain of the bacterium *Azospirillum lipoferum*, isolated from the rhizosphere of wheat, in a medium containing the flavonoid quercetin (produced in wheat plants) induces the synthesis of a lipopolysaccharide that differs from the original one in the structure of antigenic determinants, macromolecular organization, monosaccharide composition, and the fatty acid ratio and composition. The obtained data indicate that flavonoids have an important role in the associative interactions of azospirilla, which is implemented with the participation of bacterial LPSs.

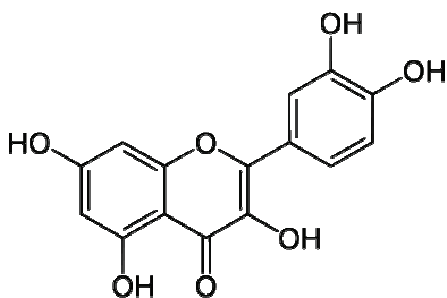
Key words: *azospirilla*, plant-microbe interaction, lipopolysaccharide, quercetin.

Получение экологически безопасной, качественной продукции растениеводства является актуальной задачей современной агробиотехнологии. Взаимодействие свободноживущих ассоциативных бактерий, стимулирующих рост растений, с наиболее важными хлебными и кормовыми злаками играет исключительную роль в жизни растений, обеспечивая их минеральное питание, адаптацию к абиотическим стрессам, а также защиту от патогенов [1]. В формировании растительно-микробных систем существенную роль играют метаболиты партнеров симбиоза. Среди метаболитов растений интерес вызывают вещества фенольной природы – флавоноиды, которые участвуют в формировании ризосферного бактериального сообщества [2]. Известно, что флавоноиды посредством различных механизмов активизируют транскрипцию *nod*-генов и, как следствие, индуцируют синтез сигнальных молекул – Nod-факторов у бактерий рода



Rhizobium; играют важную роль в индукции гена *GmGinI* грибов при образовании арбускулярно-микоризальных симбиозов; вызывают экспрессию *vir*-гена у фитопатогенов рода *Agrobacterium* [2]. Для бактерий рода *Sinorhizobium* показано, что эффект воздействия флавоноидов опосредуется гликополимерами бактерий – экзо-, капсульными и липополисахаридами (ЛПС) [3]. Со стороны ассоциативных diaзотрофов рода *Azospirillum* показана важная роль полисахаридов поверхности бактерий в осуществлении начальных этапов взаимодействия с растениями. Наибольший практический интерес представляет успешность формирования ассоциации азоспирилл с хлебными злаками, в частности с пшеницей.

По литературным данным, одним из основных широко распространенных флавоноидов пшеницы является кверцетин [4, 5, 6]. Схема строения молекулы кверцетина:



По классификации Гроутволд, кверцетин относится к флавонолам. Именно этот метаболит и был использован нами в модельном эксперименте с культурой *A. lipoferum* Sp59b, изолированном из ризосферы пшеницы [7]. Интерес к изучению бактерий *A. lipoferum* Sp59b связан с тем, что этот штамм является типовым для одного из двух наиболее изученных видов азоспирилл. Кроме того, ранее нами были установлены структуры *O*-специфического (ОПС), а также отличного от него полисахарида капсулы [8, 9] этих бактерий. Эти данные необходимы для выявления возможных изменений в структуре ПС под влиянием вторичных метаболитов растений.

Исходя из вышесказанного, настоящее исследование было направлено на выявление возможного влияния флавоноида кверцетина на структурные особенности ЛПС бактерий *A. lipoferum* Sp59b – основных углеводсодержащих компонентов их внешней мембраны.

Материалы и методы

Используемые в работе грамотрицательные микроорганизмы *A. lipoferum* Sp59b, а также *Pseudomonas fluorescens* B-1471 были получены из коллекции микроорганизмов ИБФРМ РАН. Выращивание *A. lipoferum* Sp59b проводили в течение

72 ч при температуре 30 °С и постоянном перемешивании на вибростенде в жидкой синтетической среде [10]. Культивирование проводили с добавлением кверцетина в концентрациях 0,3, 0,4 и 0,5 мг/мл. Флавоноид растворяли в диметилформамиде (ДМФА) и добавляли в среду выращивания до внесения инокулята. По окончании выращивания клетки осаждали центрифугированием. Для последующего выделения ЛПС с поверхности клеток удаляли капсулу отмыванием в 0,15 М растворе NaCl в течение 6 сут [11], бескапсульные клетки трижды обрабатывали ацетоном и высушивали на воздухе.

Определение бактериостатической активности растворителей и растворов флавоноидов проводили методом радиальной диффузии препаратов в агаризованную среду LB [12], на которую газонным высевали изучаемые культуры микроорганизмов. Клетки инкубировали 24 ч. По диаметру зон отсутствия роста делали выводы об уровне бактериостатической активности флавоноида.

Экстракцию ЛПС для анализа методом электрофореза проводили из влажной бактериальной массы в течение 15 мин этилендиаминтетраацетат (ЭДТА)-содержащим буфером [13]. Выделение препарата ЛПС осуществляли из бескапсульных клеток горячим раствором 45% фенола в соответствии с методикой, предложенной О. Вестфаль и К. Янн [14]. Полученный раствор ЛПС освобождали от флавоноида экстракцией пятикратным объемом этилацетата при подкислении [15]. Водные растворы ЛПС концентрировали, центрифугировали и подвергали гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-50. Фракции, выходящие с нулевым объемом колонки и содержащие углеводы, объединяли, концентрировали и лиофилизировали.

Реакцию агглютинации бактериальных клеток проводили в 96-луночных планшетах, как описано в работе [16]. Двойную радиальную иммунодиффузию препаратов выполняли по стандартной методике [17] в 1%-ных агарозных гелях. Преципитат окрашивали красителем Кумасси голубым R-250. Биополимерный состав выделенных препаратов ЛПС определяли общепринятыми колориметрическими методами аналогично методам, представленным в работе [10].

Электрофорез образцов проводили в камере для вертикального электрофореза (Хеликон, Россия), источник питания Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия). Растворы концентрировали на ротационном испарителе Laborota 4000 (Helidolph, Германия) при температуре 40 °С и пониженном давлении. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия).



Тонкослойную хроматографию смеси моносахаридов осуществляли на пластинках с целлюлозным покрытием DC-Alufolien Cellulose (Fluka, Швейцария). Анализ метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖХ) выполняли на хроматографе GL-2010 (Shimadzu, Япония), а моносахаридный состав и замещение моносахаридных остатков на Hewlett-Packard 5989A (США), снабженными капиллярными колонками OV-101 и HP-5ms соответственно.

Результаты и их обсуждение

По литературным данным, флавоноиды обладают бактерицидной активностью [18], поэтому для реализации цели исследования был подобран растворитель для коммерческого препарата кверцетина (Sigma) с минимальной собственной токсичностью по отношению к культурам бактерий. Основываясь на данных российских и зарубежных авторов [19, 20], подбор растворителя проводили с участием трех реагентов – ДМФА, этанола и метанола.

Как показали эксперименты, минимальной бактериостатической активностью по отношению к исследуемым микроорганизмам обладал ДМФА, который и использовался нами в качестве растворителя в последующих исследованиях. Устойчивый бактериостатический эффект по отношению к *A. lipoferum* Sp59b наблюдался при концентрации кверцетина выше 5 мг/мл, а по отношению к бактериям *P. fluorescens* В-1471 – выше 20 мг/мл.

Исходя из гипотезы о том, что реализация воздействия флавоноидов растений на бактерии опосредуется полисахаридами поверхности микроорганизмов, анализировали электрофоретические профили ЛПС азоспирилл, выращенных в присутствии различных концентраций кверцетина. Бактерии выращивали в жидкой малатно-солевой среде с добавлением кверцетина в концентрациях 0.5, 0.4 и 0.3 мг/мл, после чего ЛПС из внешней мембраны экстрагировали буфером, содержащим ЭДТА, и подвергали электрофоретическому разделению в полиакриламидном геле. Полученные данные (см. рисунок) наглядно показывают, что в присутствии кверцетина в концентрации 0.4 мг/мл бактерии преимущественно синтезируют молекулы ЛПС с короткой *O*-специфической цепью, либо лишенные ОПС (*R*-формы молекул). Об этом свидетельствует расположение полос в нижней части электрофоретического трека (см. рисунок, дорожка 3). Присутствие в среде 0.3 мг/мл кверцетина не повлияло на макромолекулярную организацию ЛПС (см. рисунок, дорожка 2), который практически не отличается от



Электрофореграмма ЛПС *A. lipoferum* Sp59b, выращенных в присутствии кверцетина в концентрациях 0.3 мг/мл (2), 0.4 мг/мл (3), 0.5 мг/мл (4). 1 – ЛПС бактерий, выращенных без флавоноидов (контроль). Окрашивание нитратом серебра на углеводы

контрольного образца – экстракта ЛПС из клеток, выросших на среде без флавоноидов (см. рисунок, дорожка 1). Концентрация кверцетина, вызывающая изменения в ЛПС азоспирилл, сопоставима с литературными данными о содержании отдельных флавоноидов в ризосфере некоторых растений. Так, например, количество катехина вблизи корней *Centaurea maculosa* составляет 0.39 мг на грамм почвы [21]. Этот факт свидетельствует о возможности протекания подобных модификаций поверхности азоспирилл в условиях *in vivo*.

Для исследования изменений в структуре ЛПС под влиянием флавоноида культуру бактерий *A. lipoferum* Sp59b выращивали в жидкой синтетической малатной среде в присутствии кверцетина в концентрации 0.4 мг/мл.

В процессе роста культуры в присутствии кверцетина наблюдалась значительная агрегация бактериальных клеток уже на ранних стадиях роста, что связано, очевидно, с увеличением гидрофобности бактериальных клеток за счёт адсорбции на них флавоноида, при этом клетки приобретали тёмно-коричневый цвет, который частично удалялся в ходе отмывания и высушивания их ацетоном.



Для выявления индуцированных кверцетином изменений антигенных свойств бактерий *A. lipoferum* Sp59b исследовали взаимодействие клеток в тестах иммунопреципитации и иммунодиффузии с ранее полученными антителами к препарату ЛПС_{Sp59b} [9].

Исследования не выявили взаимодействия антител ЛПС_{Sp59b} с капсулированными, а также с отмытыми от капсулы бактериями, выращенными в присутствии кверцетина, что указывало на изменение антигенных свойств этих микроорганизмов и отсутствие на их поверхности антигенных детерминант гомологичных антителам. Таким образом, изменения электрофоретического профиля и антигенных свойств поверхности указывают на возможные изменения в структуре внеклеточных гликополимеров, что стимулировало проведение дальнейших исследований состава ЛПС – основного компонента внешней мембраны этих микроорганизмов.

Из высушенной, отмытой от капсулы биомассы *A. lipoferum* Sp59b экстрагировали горячим водным раствором фенола ЛПС_{кв} (см. раздел «Материалы и методы»), который выделяли из смеси гликополимеров гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50.

В табл. 1 представлены результаты анализов биополимерного состава препаратов ЛПС, где приведены средние арифметические величины трех определений со среднеквадратичными отклонениями. В препарате ЛПС_{кв} выявлены отличия биополимерного состава, индуцированные присутствием кверцетина в среде выращивания. Отмечено снижение количества КДО в 1.8 раза и повышение количества углеводов в 1.4 раза.

Таблица 1

Биополимерный состав ЛПС внешней мембраны клеток *A. lipoferum* Sp59b (весовые %)

Компоненты	Содержание, весовые %	
	ЛПС _{кв}	ЛПС _{Sp59b} *
Белки	2.3±0.2	2.4±0.2
Углеводы	53.9±0.5	38.8±1.4
КДО	2.4±0.1	4.4±0.1
Общий фосфор	Сл.	0.5

Примечание. * Данные из работы [16].

Можно предположить, что возрастание количества углеводов в препарате связано с использованием дополнительной процедуры очистки ЛПС_{кв} экстракцией его водного раствора этилацетатом для освобождения от адсорбированного на препарате кверцетина. Однако обнаруженные эффекты хорошо согласуются с литературными данными о снижении количества КДО, а также

увеличении углеводной компоненты в КПС бактерий рода *Sinorhizobium* при выращивании их в среде, содержащей флавоноиды [22].

Был проведен анализ липидной компоненты ЛПС по составу образующих её жирных кислот. Методом ГЖХ метиловых эфиров выявили отличия липида А по соотношению жирных кислот экспериментального образца от контрольного, полученного из внешней мембраны *A. lipoferum* Sp59b [16], выращенной в среде без добавления кверцетина. Результаты анализа липида А ЛПС_{кв} представлены в табл. 2.

Состав жирных кислот экспериментального ЛПС_{кв} отличается отсутствием 3-гидроксидодекановой и додекановой кислот, доминирующих в ЛПС Sp59b. Преобладающими жирными кислотами в липидной компоненте ЛПС_{кв} являются 3-гидрокситетрадекановая и октадеценная кислоты.

Таблица 2

Состав жирных кислот ЛПС бактерий *A. lipoferum* Sp59b, выращенных на синтетической среде в присутствии (ЛПС_{кв}) и отсутствие (ЛПС_{Sp59b}) кверцетина

Жирные кислоты	Содержание МЭЖК (% от суммы площадей всех пиков)	
	ЛПС _{кв}	ЛПС _{Sp59b} *
Додекановая	–	21.9
2-гидроксидодекановая	–	8.2
3-гидроксидодекановая	–	30.7
3-гидрокситетрадекановая	52.3	12.6
Гексадекановая	9.7	13.0
3-гидроксигексадекановая	13.8	–
Изогептадекановая	2.2	–
Октадеценная	22.0	10.1

Примечание. * Данные из работы [23].

Был исследован мономерный состав *O*-специфического полисахарида из ЛПС_{кв}. Полисахариды из ЛПС_{кв} получали мягкой кислотной деградацией, с последующей хроматографией водорастворимой части на Sephadex G-50. В гидролизатах препарата методом тонкослойной хроматографии анализировали моносахаридный состав. Анализы позволили идентифицировать в образце рамнозу (Rha), глюкозу (Glc) и глюкозамин (GlcNAc), в отличие от контрольного ЛПС, в составе которого присутствовали галактоза, Rha, манноза и GlcNAc [8].

Исследование методом ГЖХ ацетатов полиолов и (R)-2-октил-гликозидов, полученных после полного гидролиза полисахаридов, показало, что они построены из L-Rha и D-Glc в соотношении ~ 2.7 : 1.



Анализ методом метилирования с последующей ГЖХ-МС частично метилированных ацетатов полиолов позволил идентифицировать 1,5-ди-*O*-ацетил-2,3,4,6-тетра-*O*-метилглюцитол, 1,2,3,5-тетра-*O*-ацетил-4-*O*-метилрамнитол и 1,3,5-три-*O*-ацетил-2,4-ди-*O*-метилрамнитол. На основании этих данных можно сказать, что повторяющиеся звенья ПС, выделенных из ЛПС, построены из остатков 3-замещенной Rha, 2,3-ди-замещенной Rha в точке ветвления и терминального остатка Glc.

Таким образом, проведенные исследования показали, что выращивание азоспирилл в присутствии вторичного метаболита растений – кверцетина индуцирует существенные изменения в составе жирных кислот, моносахаридном составе ЛПС *A. lipoferum* Sp59b, участвующего в ассоциативном взаимодействии с растением. Наличие такого эффекта выявлено у азоспирилл впервые. Установленные особенности свидетельствуют о важной роли флавоноидов в растительно-бактериальной коммуникации азоспирилл, которая реализуется с участием бактериальных ЛПС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 11-04-00533а).

Список литературы

1. 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.
2. Mandal S. M., Chakraborty D., Dey S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses // Plant Signal. Behav. 2010. Vol. 5, № 4. P. 359–368.
3. Fraysse N., Jabbouri S., Treilhou M., Couderc F., Poinso V. Symbiotic conditions induce structural modifications of *Sinorhizobium* sp. NGR234 surface polysaccharides // Glycobiology. 2002. Vol. 12, № 11. P. 741–748.
4. Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology // Plant Physiol. 2001. Vol. 126, № 2. P. 485–493.
5. Calzuola, I., Marsili V., Gianfranceschi G.L. Synthesis of antioxidants in wheat sprouts // J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52, № 16. P. 5201–5206.
6. Matus C., Daskalchuk T. E., Verma B., Puttick D., Chibbar R. N., Gray G. R., Perron C. E., Tyler R. T., Hucl P. Phenolic compounds contribute to dark bran pigmentation in hard white wheat // J. Agric. Food Chem. 2008. Vol. 56, № 5. P. 1644–1653.
7. Tarrand J. J., Krieg N. R., Döbereiner J. A. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. // Can. J. Microbiol. 1978. Vol. 24, № 8. P. 967–980.
8. Fedonenko Yu. P., Konnova O. N., Zatonsky G. V., Konnova S. A., Kocharova N. A., Zdorovenko E. L., Ignatov V. V. Structure of the O-polysaccharide from the *Azospirillum lipoferum* Sp59b lipopolysaccharide // Carbohydr. Res. 2005. Vol. 340. P. 1259–1263.
9. Смолькина О. Н., Бурьгин Г. Л., Федоненко Ю. П., Качала В. В., Здоровенко Э. Л., Матора Л. Ю., Коннова С. А., Игнатов В. В. Капсульный полисахарид бактерий *Azospirillum lipoferum* Sp59b: структура, антигенная специфичность // Биохимия. 2010. Т. 75, вып. 5. С. 707–716.
10. 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 interactins // FEMS Microbiol. Letters. 1994. Vol. 118, № 2. P. 93–99.
11. 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.
12. Методы общей бактериологии : пер. с англ. ; под ред. Ф. Герхардта [и др.]. М.: Мир, 1983. 536 с.
13. Leive L., Shovlin V. K., Mergenhagen S. E. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharides released from *Escherichia coli* by ethylenediamine tetraacetate // J. Biol. Chem. 1968. Vol. 243. P. 6384–6391.
14. Вестфаль О., Янн К. Бактериальные липополисахариды // Методы химии углеводов / ред. Н. К. Кочетков. М., 1967. С. 325–332.
15. Shao Hui, He Xianzhi, Achnine Lahoucine, Blount Jack W. Crystal structures of a multifunctional triterpene/flavonoid glycosyltransferase from *Medicago truncatula* // Plant Cell. 2005. Vol. 17. P. 3141–3154.
16. Коннова О. Н., Бойко А. С., Бурьгин Г. Л., Федоненко Ю. П., Матора Л. Ю., Коннова С. А., Игнатов В. В. Химические и серологические исследования бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2008. Т. 77, № 3. С. 350–357.
17. Ouchterlony O., Nilsson L.-A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis // Handbook of experimental immunology / ed. D. M. Weir. Oxford : Blackwell Scientific Publication, 1978. P. 1916–1923.
18. Flavonoids : chemistry, biochemistry, and applications / eds. M. O. Andersen, R. K. Markham. CRC Press, 2006. 1197 p.
19. Костюк В. А., Потанович А. И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск : БГУ, 2004. 182 с.
20. Chebil L., Humeau C., Anthoni J., Dehez F., Engasser J., Ghoul M. Solubility of flavonoids in organic solvents // J. Chem. 2007. Vol. 52. P. 1552–1556.
21. Shaw J. L., Morris P., Hooker E. J. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms // Environ. Microbiol. 2006. Vol. 8. P. 1867–1880.
22. Wasson A. P., Pellerone F. I., Mathesius U. Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia // Plant Cell. 2006. Vol. 18. P. 1617–1629.
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 липополисахаридов бактерий *Azospirillum* // Изв. Сарат. ун-та. Новая сер. 2009. Т. 9. Сер. Химия. Биология. Экология, вып. 1. С. 36–41.