

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ГЛИКОПОЛИМЕРЫ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM*
SOLI CC-LY788(T): ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И АКТИВНОСТЬ В
ОТНОШЕНИИ РАСТЕНИЙ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 2 курса 241 группы
направления 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Кондюриной Натальи Кирилловны

Научный руководитель:

канд. биол. наук, доцент _____ Ю. П. Федоненко

Научный консультант:

канд. биол. наук, с.н.с. _____ Е. Н. Сигида

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

док. биол. наук., проф. _____ С. А. Коннова

Саратов 2026

Введение. Грамотрицательные альфа-протеобактерии рода *Azospirillum* широко распространены в ассоциациях с дикими и культурными злаками в различных климатических зонах. Это модельные объекты активно изучаемых растительно-микробных взаимодействий.

Начальные стадии формирования ассоциаций на корнях растений, как и иные взаимодействия с макро- и микроорганизмами, реализуются с участием компонентов поверхности бактериальных клеток, в том числе липополисахаридов (ЛПС) и капсульных полисахаридов (КПС), гликополимеров, являющихся преобладающими компонентами внешней мембраны грамотрицательных бактерий. ЛПС – амфифильные макромолекулы, состоящие из гидрофобного липида А и гидрофильной полисахаридной части, представленной коровым олигосахаридом и О-специфическим полисахаридом (ОПС, О-антигеном). ОПС – наиболее переменная часть молекулы ЛПС, ответственная за взаимодействие с рецепторами и антигенные свойства. В свою очередь КПС азоспирилл является экстраклеточной формой ЛПС, продуцируемой бактериями в комплексе с белками-поринами, и в пределах одного штамма структуры, как правило, идентичны.

Исследования гликополимеров поверхности азоспирилл активно ведутся на протяжении более 30 лет, однако механизм действия этих макромолекул в процессе взаимодействия данных бактерий с другими организмами ещё не выяснен полностью. В связи с этим, необходимость накопления сведений об особенностях структурной организации и функциональной активности ЛПС и КПС *Azospirillum* остается актуальной.

Целью настоящей работы являлась характеристика структуры гликополимеров бактерий типового штамма *A. soli* CC-LY788(T), а также определение их биологической активности в отношении проростков пшеницы *Triticum aestivum* L.

Для достижения цели были поставлены и решались следующие задачи:

- 1) получить препаративные количества очищенных ЛПС и КПС *A. soli* CC-LY788(T), охарактеризовать их биополимерный состав;
- 2) выделить из ЛПС О-антиген и установить структуру его повторяющегося звена;
- 3) оценить влияние ЛПС и КПС исследуемого штамма на проростки пшеницы *Triticum aestivum* L.
- 4) оценить ответные реакции растения на присутствие ЛПС и КПС в среде культивирования.

Магистерская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (литературный обзор, материалы и методы, результаты и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 158 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 78 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 13 рисунками и 3 таблицами.

Научная новизна и значимость работы. В ходе работы были впервые уставлены и охарактеризованы биохимический состав и структура ЛПС *A. soli* CC-LY788(T), выявлена биологическая активность гликополимеров исследуемого штамма в отношении проростков пшеницы. Результаты проведённого исследования свидетельствуют о перспективности использования *A. soli* CC-LY788(T) в качестве компонента биоудобрений, применяемых при выращивании культур с ключевым сельскохозяйственным значением. Также полученные данные могут быть использованы для последующих фундаментальных исследований, направленных на установление биохимических механизмов взаимодействия бактерий-симбионтов с растением-хозяином, что в дальнейшем открывает перспективы рационализации и повышения эффективности природопользования при ведении сельскохозяйственной деятельности.

Основное содержание работы. Культивирование бактерий осуществляли при встряхивании в термостатируемых условиях (28°C, 180 об/мин). Осаждение клеток осуществляли на центрифуге Allegra X-30R

(Beckman Coulter, США). Для концентрации растворов использовали вакуумный испаритель Laborota 4000 (Heidolph, Германия). Препараты гликополимеров и полисахариды лиофилизировали на приборе Bench Top 2K (VirTis, США). Гель-хроматографию осуществляли на колонке (54×3 см) с носителем Sephadex G-50 Fine (GE Healthcare, США). Детекцию элюции осуществляли с помощью рефрактометрического детектора 2142 (LKB, Швеция). Спектрофотометрический анализ проводили на приборе Specord 40 (Analytik Jena AG, Германия). Для гидролиза использовали твердотельный термостат Barnstead (Lab-Line, США). Образцы ЛПС и КПС растворяли с помощью ультразвуковой бани Elmasonic S10H (Elma, Германия). Электрофорез проводили в камере для вертикального электрофореза VE-20 (Helicon, Россия). Для приготовления растворов использовали магнитные мешалки C-MAG HS 7 control (IKA, Германия) и MSH-300 (Biosan, Латвия). Водородный показатель растворов измеряли рН-метром PB-11 (Sartorius, Испания). Анализ моносахаридового состава и абсолютных конфигураций сахаров, состав жирных кислот липидов А определяли методом ГЖХ с использованием хроматографов Hewlett-Packard 7820A (Hewlett-Packard, США), GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабжённых капиллярными колонками EQUITY-1 (Supelco, Германия), DB-5 (Agilent, США). ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре DRX-600 (Bruker, Германия).

Высушивание и термообработку посуды осуществляли в термошкафу SNOL 67/350 (SNOL, Литва). Оптическую плотность образцов в иммуноферментном анализе (ИФА) измеряли на микропланшетном фотометре Multiskan Ascent (Thermo Electron, Китай), полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Экстракцией горячим водным фенолом бескапсульных сухих бактериальных клеток *A. soli* CC-LY788(T) был получен ЛПС, выход которого после удаления из экстракта балластных белков, диализа и лиофилизации составил 5,5% от массы сухих клеток. Также был получен

препарат КПС, выход которого составил 18,3%. Для полученного препарата ЛПС был охарактеризован биополимерный состав, данные о котором представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Биополимерный состав ЛПС *A. soli* CC-LY788(T)

Компоненты	Содержание, %
белки	3,9±0,2
углеводы	65±3
Kdo	1,7±0,1
D-глюкоза	28,6 [*]
L-рамноза	71,4 [*]
3-гидрокситетрадекановая кислота	59 ^{**}
3-гидроксигексадекановая кислота	28 ^{**}
другие кислоты	13 ^{**}

Примечания – в таблице указано содержание к массе ЛПС; ^{*} - содержание к массе ОПС, ^{**} - относительное содержание к сумме всех выявленных ЖК липида А.

Высокое содержание углеводного компонента, наличие 3-гидроксилированных жирных кислот и Kdo – маркерных соединений ЛПС, свидетельствует о чистоте выделенного препарата. При колориметрическом анализе методом Бредфорда было показано наличие незначительной примеси белка в препарате ЛПС. Однако дальнейшие анализы методом электрофореза не подтвердили данного факта. Анализ электрофоретического разделения выделенного препарата ЛПС после визуализации окрашиванием азотнокислым серебром с предварительным периодатным окислением позволяет говорить о преобладании S-форм молекул, для которых характерно

наличие всех трех компонентов (липид А, корового олигосахарида, О-антигена).

На следующем этапе работы была проведена деградация ЛПС в мягких кислотных условиях, которая позволила провести разделение липидного и углеводного фрагментов полимера. Гидрофобная часть молекул ЛПС в виде нерастворимого в воде осадка была получена центрифугированием гидролизата. В липидном компоненте было выявлено преобладание 3-гидрокситетрадекановой и 3-гидроксигексадекановой кислот, содержание которых составило около 87% всех МЭЖК. В значительно меньшем количестве были выявлены другие кислоты, содержание которых составляло около 13 % всех выявленных методом ГЖХ МЭЖК. Подобный состав жирных кислот характерен и для других представителей *Azospirillum* spp. и является одним из хемотаксономических признаков, поскольку липид А – наиболее консервативный элемент ЛПС и чаще всего сохраняет свой состав в пределах бактериального рода.

Водорастворимая углеводная часть ЛПС (коровый олигосахарид, замещенный полисахаридными цепями) была фракционирована на колонке с Sephadex G50. По результатам разделения была собрана высокомолекулярная фракция ОПС, сконцентрирована и лиофилизирована. Выход ОПС составил 23% от массы ЛПС. ГЖХ ацетатов полиолов было выявлено присутствие в ОПС Rha и Glc4Me в соотношении ~2.4 : 1. ГЖХ ацетилированных 2(S)-октилглюкозидов было показано, что Rha имеет L конфигурацию, а Glc – D конфигурацию.

Спектр ^1H , ^{13}C HSQC ОПС содержал сигналы различной интенсивности, предположительно, из-за нестехиометрического О-ацетилирования (в спектре присутствовали сигналы CH_3 О-ацетильной группы при δ_{H} 2.18 и δ_{C} 21.6). ОПС был подвергнут О-деацетилированию, и выделенный после этой процедуры полисахарид (ДПС) оказался регулярным. ^{13}C ЯМР спектр ДПС содержал сигналы 3 аномерных углеродов при δ 96.3, 101.6, 103.4, двух CH_3 -С групп (С-6 Rha) при δ 18.0 и 18.1, одной HOCH_2 -С группы (С-6 Glc4OMe)

при δ 61.9 а также другие сигналы углерода моносахаридных остатков при δ 68.3–80.7 и сигнал одной $\text{CH}_3\text{-O}$ группы при δ 61.0. Отсутствие сигналов при δ 83–88, характеристичных для фуранозидов, свидетельствовало о том, что все моносахариды находятся в пиранозной форме. Соответственно, ^1H ЯМР спектр содержал сигналы трех аномерных протонов при δ 5.00–5.20, двух $\text{CH}_3\text{-C}$ групп (H-6 Rha) при δ 1.29–1.31, одной $\text{CH}_3\text{-O}$ группы при δ 3.53 и остальных протонов моносахаридных колец при δ 3.27–4.21. Таким образом, было установлено, что ДПС состоит из трисахаридных повторяющихся звеньев, содержащих Glc4OMe и два остатка Rha. ^1H и ^{13}C ЯМР спектры ДПС были отнесены с помощью экспериментов ^1H , ^1H COSY, TOCSY, ROESY, ^1H , ^{13}C HSQC и HMBC.

Спин-спиновые системы моносахаридов были идентифицированы путем прослеживания корреляций от H-1 до H-2, от H-2 до H-6 у остатков Rha (A и B) H-1 до H-6 у Glc4OMe (C) и от в COSY и TOCSY спектрах, а также на основании характеристических констант спин-спинового взаимодействия (KCCB). Glc4OMe была идентифицирована на основании корреляции между протонами О-метильной группы и атомом C-4 при δ 3.55/80.5 в спектре ^1H , ^{13}C HMBC.

Последовательность моносахаридов в повторяющемся звене была определена на основании корреляций между аномерными протонами и протонами при трансгликозидном углероде в ^1H , ^1H ROESY спектре: A H-1 / C H-2, C H-1 / B H-3, B H-1 / A H-2 при δ 5.20/3.66; 5.08/3.83; 5.00/4.07, соответственно, а также на основании корреляций между аномерными протонами и углеродами при гликозидной связи в ^1H , ^{13}C HMBC спектре: A H-1 / C C-2, C H-1 / B C-3, B H-1 / A C-2 при δ 5.20/78.6; 5.03/77.0; 5.01/79.4, соответственно. Таким образом, на основании полученных данных было установлено, что ДПС состоит из трисахаридных повторяющихся звеньев, представленных на рисунке 1.

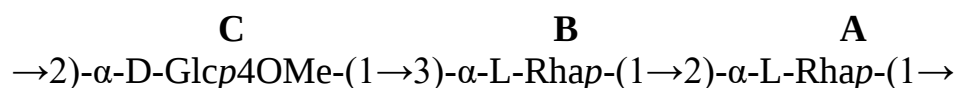


Рисунок 1 – Структура повторяющихся звеньев ДПС *A. soli* CC-LY788(Т)

Отнесение ^1H и ^{13}C ЯМР спектров нативного ОПС было осуществлено с применением 2D ЯМР экспериментов по аналогии с ДПС. Сравнение ^1H , ^{13}C HSQC спектров ОПС и ДПС продемонстрировало частичное смещение кросс-пика Н-2/С-2 остатка В от δ 4.21/68.3 в ДПС к δ 5.35/70.5 в ОПС, вызванное дезэкранирующим эффектом О-ацетильной группы, и свидетельствовало о частичном О-ацетилировании остатка В. Сравнение интегральной интенсивности сигналов Н-2 при δ 4.21 и 5.35 В в ОПС свидетельствовало о том, что степень ацетилирования остатка В составила ~65%. Таким образом, было установлено, что ОПС *A. soli* CC-LY788(Т) состоит из трисахаридных повторяющихся звеньев следующей структуры (рисунок 2), где курсивом обозначение нестехиометрическое О-ацетилирование (~65%) одного из остатков рамнозы.



Рисунок 2 – Структура повторяющихся звеньев ОПС *A. soli* CC-LY788(Т)

По нашим данным, установленная структура является новой для бактериальных полисахаридов. Сходную структуру повторяющихся звеньев имеет ОПС *Xanthomonas campestris* pv. *gruni*, отличительной особенностью которого является отсутствие ацетилирования остатка рамнозы и метильной группы у глюкозы.

Подобные структуры повторяющихся звеньев ОПС были установлены ранее для ряда штаммов азоспирилл, отнесенных к серогруппе III. Проведенные исследования структуры ОПС *A. soli* CC-LY788(Т) позволили предположить его серологическое родство с азоспириллами серогруппы III,

что было далее подтверждено серией иммунохимических тестов. В радиальной иммунодиффузии наблюдалась полоса преципитации, свидетельствующая о взаимодействии антиген-антитело между препаратом ЛПС *A. soli* CC-LY788(T) и антителами к ЛПБК *A. lipoferum* Sp59b, что подтверждало их гомологию. ИФА также показал высокое сродство упомянутых антител к ЛПС *A. soli* CC-LY788(T).

В ходе биологических экспериментов с молодыми проростками пшеницы был установлен факт биологической активности ЛПС и КПС *A. soli* CC-LY788(T) в отношении растений. Был снят ряд морфологических и биохимических показателей, свидетельствующих о развитии ответной реакции растения на присутствие в среде ЛПС и КПС (таблица 2; рисунок 3).

Был отмечен ряд морфологических ответных реакций, выраженный в увеличении средних значений длины побегов, корней и первого настоящего листа в опытных группах по сравнению с контролем. Также в экспериментальных группах наблюдалось увеличение сырой массы надземных и подземных органов и площади поверхности первого настоящего зелёного листа. Значительного влияния ЛПС и КПС на среднее количество корней и длину coleoptilia проростков выявлено не было.

Не менее выраженной была и ответная реакция растений в виде снижения содержания пигментов (каротиноидов, хлорофиллов а и b) в первых настоящих листьях в проростках, культивированных с добавлением гликополимеров. Можно выдвинуть предположение, что подобные результаты опосредованы адаптивными процессами, протекающими в растениях, и активизацией каскадов биохимических реакций, запускаемых молекулами гликополимеров, и, возможно, ответственных за формирование иммунного ответа. Необходимо отметить, что ответные реакции проростков пшеницы на культивирование в средах с добавлением разных гликополимеров были неодинаковы.

Таблица 2 – Морфометрические показатели семидневных проростков пшеницы *T. aestivum* L. сорта Саратовская 58

Параметры	ЛПС <i>A. soli</i> CC-LY788(T)	КПС <i>A. soli</i> CC-LY788(T)	Контроль
Длина побега, мм	133,4±9,23	102,7±12,4	94±17,56
Длина coleoptilya, мм	28,7±4,62	28,3±2,98	27,9±2,64
Длина первого настоящего листа, мм	107±11,2	69,4±10,1	65,3±16,9
Площадь первого настоящего листа, см ²	5,7±0,76	3,96±0,9	3,55 ±1
Количество корней, шт	3±0,67	3±0,67	3,3±0,48
Длина корней, мм	51,48±19,02	43,8±21,17	38,24±15,76
Сырая масса побега, г	0,8±0,09	0,68±0,08	0,65±0,06
Сырая масса корней, г	0,2±0,05	0,15±0,03	0,14±0,02

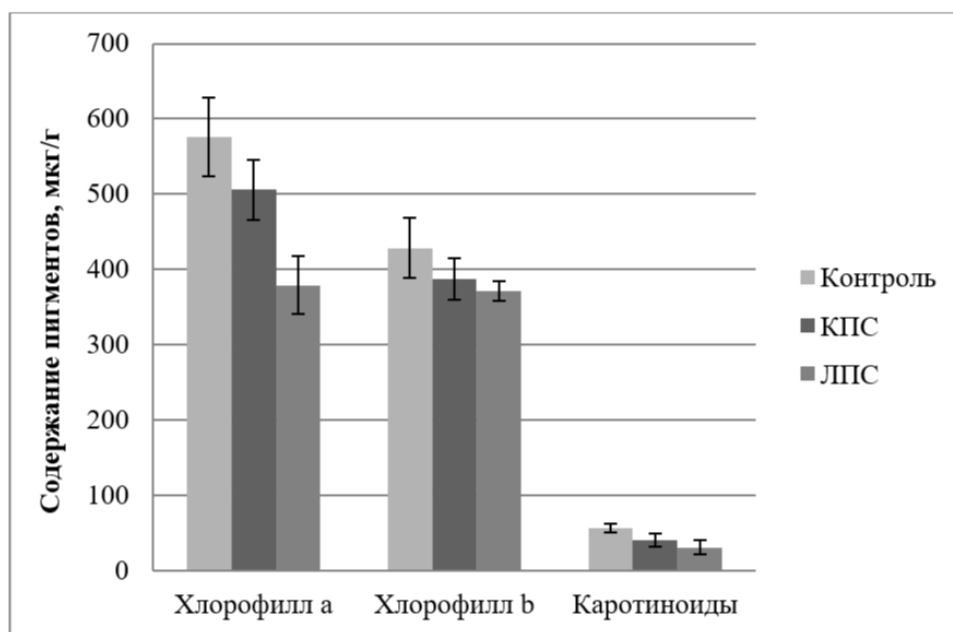


Рисунок 3 – Изменение содержания пигментов в первых настоящих листьях семидневных растений пшеницы *T. aestivum* L. сорта «Саратовская 58» при добавлении ЛПС и КПС *A. soli* CC-LY788(T)

В опытной группе с добавлением ЛПС отмечается значительно более выраженный морфофизиологический отклик – эти растения показали больший прирост биомассы и более заметное снижение содержания пигментов в сравнении с экспериментальной группой, выращенной с добавлением КПС. Отклик проростков на наличие в среде КПС также отмечается, но не столь ярко. Наблюдаемая закономерность может быть интерпретирована как результат предположительно большего сродства молекул ЛПС к рецепторам растений и, как следствие, более мощного сигнального воздействия на физиолого-биохимические процессы, протекающие в проростках. В то же время, КПС обладают белковым компонентом и, как отмечалось в рассмотренных выше исследованиях, в основном участвуют в адгезивных взаимодействиях бактерий с корнями растений-хозяев. Из-за этого КПС могут в меньшей степени воздействовать на рецепторы, ответственные за запуск ответных реакций, проявление которых фиксировалось при выполнении данной работы.

Анализ культуральной жидкости показал накопление к 7 суткам культивирования в среде продуктов деградации ЛПС – на хроматограмме были отмечены пики, соответствующие как исходному ЛПС, так и соединениям с меньшей молекулярной массой. Кроме того, было отмечено снижение количества ЛПС в среде, что не может быть результатом исключительно адсорбции ЛПС на поверхности экспериментального контейнера. Эти данные позволяют выдвинуть предположение о том, что проростками были выделены в среду корневые экссудаты, проявляющие ферментативную активность в отношении ЛПС.

Заключение. Бактерии рода *Azospirillum* – представители PGPR-бактерий, интерес к которым обусловлен высоким потенциалом их использования как в агротехнологии, так и в медицине. В основе их биологической активности лежат специфические высокомолекулярные соединения – липополисахариды, наиболее вариативная часть которых – О-антиген. Установление структуры ОПС *Azospirillum*, число видов которых

возрастает с каждым годом – актуальное направление современных микробиологических и биохимических исследований.

В ходе данной работы были получены препаративные количества очищенных ЛПС и КПС *A. soli* CC-LY788(T), охарактеризован их биополимерный состав: значительная доля углеводной части (~65%) и присутствие 3-гидроксилированных жирных кислот и Kdo. По составу жирных кислот гидрофобного домена (липида A) выделенный ЛПС демонстрировал сходство с ЛПС других представителей азоспирилл.

Из ЛПС был выделен O-антиген, установлена структура его повторяющегося звена: $\rightarrow 2)-\alpha\text{-D-Glcp}4\text{OMe}-(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Rhap}2\text{OAc}-(1\rightarrow 2)-\alpha\text{-D-Rhap}-(1\rightarrow$

Для ЛПС и КПС *A. soli* CC-LY788(T) была выявлена стимулирующая рост активность в отношении проростков пшеницы *Triticum aestivum* L., а также влияние на содержание основных пигментов фотосинтеза.

Оценены ответные реакции растения на присутствие ЛПС и КПС в среде культивирования, выраженные в количественных изменениях морфометрических и биохимических показателей проростков.