



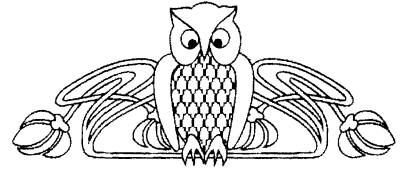
УДК 579.835:57.083.334

ИММУНОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ПОЧВЕННЫХ РОСТСТИМУЛИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*

Ю.А. Филипьева, А.Е. Беляков*, Г.Л. Бурьгин*, С.А. Коннова

Саратовский государственный университет
E-mail: LjuChe@yandex.ru

* Учреждение Российской академии наук Институт биохимии
и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: gena@ibppm.sgu.ru



В статье представлены результаты иммунохимического анализа 63 штаммов ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum*. Показаны значительная гетерогенность О-антигенов штаммов видов *A. lipoferum* и *A. brasilense*, а также высокое сходство антигенных свойств ЛПС штаммов *A. irakense*. Серологически обособленным оказался штамм *A. amazonense*. Продемонстрирована высокая консервативность мажорных белковых антигенов данных бактерий.

Ключевые слова: *Azospirillum*, липополисахариды, серотипирование.

Immunochemical Study of Antigenic Properties of Soil Plant-Growth-Promotion Bacteria of the Genus *Azospirillum*

Yu.A. Filipecheva, A.E. Belyakov, G.L. Burygin, S.A. Konnova

The results of immunochemical analysis of 63 strains of associative rhizobacteria genus *Azospirillum* presented in this paper. Significant heterogeneity of O-antigens of strains of *A. lipoferum* and *A. brasilense* have been demonstrated, as well as the high similarity of the antigenic properties of LPS strains of *A. irakense*. Serologically proved isolated strain *A. amazonense*. High conservatism of major protein antigens of these bacteria have been showed.

Key words: *Azospirillum*, lipopolysaccharides, serotyping.

Бактерии рода *Azospirillum* относят к группе ростстимулирующих ризобактерий, которые могут быть перспективными компонентами бактериальных консорциумов – микробных удобрений для инокуляции сельскохозяйственных растений [1]. При этом ряд штаммов азоспирилл могут быть использованы при биоремедиации почвы от загрязнения нефтепродуктами и гербицидами [2]. Азоспириллы обнаруживаются в ризосфере сельскохозяйственных и различных дикорастущих растений, на листьях мангровых растений, а также в почвах тундры [3–5]. Это дает основание утверждать, что они являются весьма широко распространенными ассоциативными бактериями, а их поликсенность указывает на отсутствие жесткой специфичности к растению-хозяину [6].

На сегодняшний день отсутствует оптимальный специфический метод детекции и мониторинга численности почвенных ризосферных бактерий. Одним из методов, используемых при изучении колонизации микроорганизмами растений, является иммунохимическое выявление. Однако большинство работ, выполняемых с помощью этого метода (по имеющимся литературным сведениям), посвящены изучению взаимодействия растений с фитопатогенами или представителями рода *Rhizobium*. Очень мало подобных работ, посвященных азотфиксирующим бактериям, вступающим во взаимодействие с небобовыми растениями.

В ИБФРМ РАН были проведены подробное исследование антигенных свойств и хемотипирование азоспирилл, но в основном модельных штаммов. Наша работа направлена на исследование разнообразия поверхностных антигенов азоспирилл коллекционных штаммов с целью построения системы серологической классификации данных бактерий.

В работе были использованы 63 штамма бактерий рода *Azospirillum* из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН, относящихся к 4 видам: *A. amazonense*, *A. brasilense*, *A. irakense* и *A. lipoferum*. Бактерии культивировали при 30°C на синтетической малатной среде [7].

Препараты ЛПС (О-Аг) для иммунохимических экспериментов получали модифицированным методом экстракции ЭДТА-содержащим буфером [8].

Для получения препарата полярного жгутика бактерии выращивали на жидкой малатной среде до логарифмической фазы роста, осаждали центрифугированием и ре-

суспендировали в достаточном количестве физиологического раствора. Полученную суспензию гомогенизировали блендером (1200 об/мин) в течение 90 с. Суспензию клеток дважды центрифугировали в течение 15 мин при 3000g. Полученный супернатант подвергали ультрацентрифугированию в течение 1 ч при 100000g.

В работе использовали кроличьи поликлональные антитела (Ат), обладающие О-антигенной специфичностью, полученные: на обработанные 2%-ным раствором глутарового альдегида клетки модельных штаммов *A. brasilense* [9]: Sp7 (Ат1), Sp245 (Ат2), JM125A2 (Ат3), *A. lipoferum* Sp59b (Ат4), *A. amazonense* Am14 (Ат8); на хроматографически очищенный липополисахарид (ЛПС) штаммов *A. brasilense* S-17(Ат5) и *A. irakense* KBC-1 (Ат6); Ат, полученные на интактные клетки *A. brasilense* Sp7 (Ат7), и Ат – на флагеллин полярного жгутика *A. brasilense* Sp7 (Ат9).

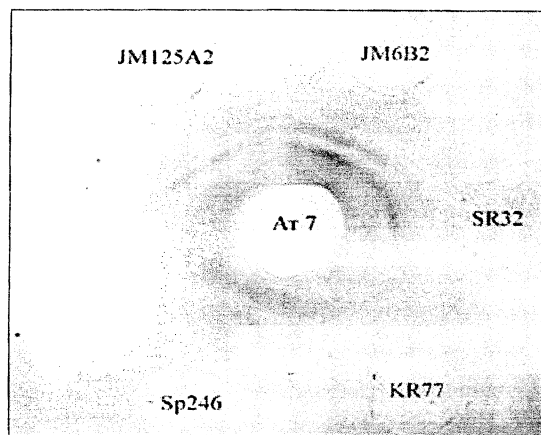
Иммунодиффузионный анализ осуществляли по стандартной методике в 1%-ном агарозном геле с последующим выявлением преципитата красителем Кумасси синим R-250 [10].

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) выполняли, как описано в статье А.И. Красова с соавт. [11].

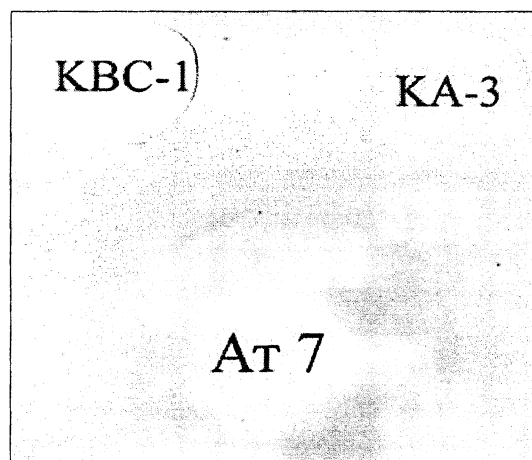
Денатурирующий электрофорез в ПААГ [12] с последующим Вестерн-блотом проводили в 10%-ном концентрирующем ПААГ.

Полученные результаты подвергали статистической обработке. Доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости. Эксперименты проводились минимум в трех повторностях.

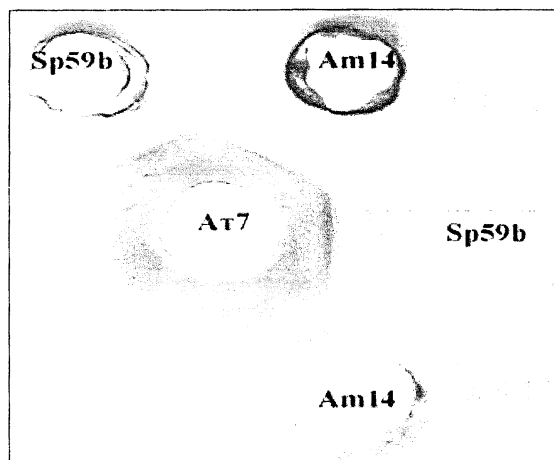
В результате проведенных экспериментов выявлено, что все 63 исследованных штамма взаимодействовали с родоспецифичными Ат. При этом штаммы видов *A. brasilense* и *A. lipoferum* в иммунодиффузии образовывали несколько полос преципитации (исключением являлся штамм *A. brasilense* KR77) (рис. 1, а), в то время как штаммы видов *A. irakense* и *A. amazonense* продемонстрировали образование лишь одной преципитационной полосы (рис. 1, б, в).



а



б



в

Рис. 1. Иммунодиффузионный анализ экстрактов клеток штаммов *A. brasilense* JM125A2, JM6B2, SR32, KR77, Sp246 (а); *A. irakense* KBC-1, KA-3 (б); *A. amazonense* Am14 и *A. lipoferum* Sp59b (в) с родоспецифичными антителами (Ат7)



При изучении свойств флагеллинов полярного жгутика (Н-антигена) бактерий рода *Azospirillum* иммунодиффузионным методом и проведением денатурирующего электрофореза в ПААГ с последующим Вестерн-бло-

том было выявлено, что жгутиковый антиген азоспирилл не является варибельным и у всех исследованных штаммов он реагирует с Ат на флагеллин полярного жгутика типового штамма *A. brasilense* Sp7 (рис.2).

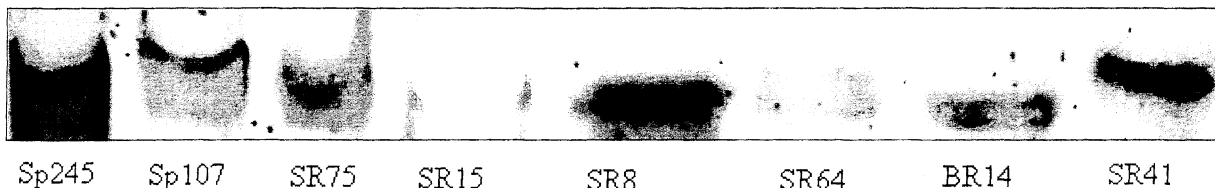


Рис. 2. Результат Вестерн-блота препаратов флагеллина штаммов Sp245, Sp107, SR75, SR15, SR8, SR64, BR14 и SR41 с Ат на флагеллин полярного жгутика *A. brasilense* Sp7 (Ат9)

Проведенные эксперименты свидетельствуют о высокой консервативности белковых антигенов у всех исследованных штаммов азоспирилл, что подтверждает возможность использования данных Ат для родовой идентификации.

Анализ результатов изучения разнообразия ЛПС (О-антигенов) азоспирилл позволил

разделить на 4 группы штаммы вида *A. brasilense* и на 3 группы штаммы *A. lipoferum* (таблица). При этом в каждом из этих видов выявлены штаммы, не имеющие антигенных перекрестов с О-антигенами модельных штаммов, но взаимодействующие с родоспецифичными антителами.

Результаты серотипирования бактерий *A. brasilense* и *A. lipoferum*

Серотип	Серовариант	Характеристика сероварианта						Штаммы, отнесенные к сероварианту
		Ат 1	Ат 2	Ат 3	Ат 4	Ат 5	Ат 7	
<i>A. brasilense</i>								
I	A	+	-	-	-	++	+	SR80, Sp7
	B	+	-	-	-	+	+	SR55
	C	+	-	-	-	-	+	SR14
II	D	-	++	-	-	+	+	SR75, Sp107, Sp245
	E	-	+	-	-	+	+	SR81, S-27
	F	-	++	-	-	-	+	SR15
III	G	-	-	+	-	+	+	JM125A2, JM6B2, Sp246
	H	-	-	+	-	++	+	SR32
	I	-	-	+	-	-	+	KR77, SR115
Штаммы, не отнесенные к выделенным серотипам	J	-	-	-	-	+	+	SR7, SR37, SR57, SR88, SR92, SR96, SR100, SR103, S-17, SR59, SR74, SR120
	K	-	-	-	-	++	+	SR50, SR56, SR111, SR87, SR79
	L	-	-	-	-	-	+	SR8, SR64, SR72, SR41, BR14
<i>A. lipoferum</i>								
I	A	-	+	-	-	-	+	RG20a
II	B	-	-	-	+	-	+	SR4, SR38, SR61, SR85, SR98, SR99, Sp59b, SR65, SR62, SR35
	C	-	-	-	++	-	+	SR33
Штаммы, не отнесенные к выделенным серотипам	D	-	-	-	-	+	+	SR 42, SR 94, SR77
	E	-	-	-	-	++	+	SR 46, SR 47
	F	-	-	-	-	-	+	SR5, SR44, SR54, SR16

Примечание. «+» – одна полоса преципитации; «++» – две полосы преципитации; «-» – отсутствие взаимодействия.



Полученные данные во многом совпадают с таковыми работы [13], в которой были описаны антигенные свойства ЛПС нескольких штаммов видов *A. brasilense* и *A. lipoferrum*. Авторы указанной работы отмечают также высокую консервативность антигенных детерминант, выявляемых Ат к ЛПС *A. brasilense* S-17 (Ат5), что объясняется участием рамнозы в формировании эпитопов ЛПС азоспирилл. В отличие от препаратов ЛПС [13], ЭДТА-экстракт клеток *A. brasilense* Sp7 не реагировал с Ат4, что требует дальнейшего изучения.

Два исследованных штамма *A. irakense* оказались иммунохимически близкими между собой, но отличались от представителей других видов. При этом по результатам и иммунодиффузионного анализа, и ИФА взаимодействие штамма КВС-1 с гомологичными Ат было более интенсивно, нежели для клеток штамма КА-3, что указывает на имеющиеся различия в строении поверхностных антигенов изученных штаммов. Наши данные несколько расходятся с результатами, полученными в работе [13] для ЛПС *A. irakense* КВС-1 и Ат6. Возможно, это связано с различиями в экспонированности антигенных детерминант, находящихся в составе ЭДТА-экстракта клеток и в виде очищенного препарата ЛПС.

Серологически обособленным оказался штамм *A. amazonense* Ам 14, выявляемый только гомологичными и родоспецифичными Ат. Следует отметить, что ни один из исследованных штаммов других видов азоспирилл не взаимодействовал с Ат8, что может свидетельствовать об антигенной обособленности данного вида.

Библиографический список

1. Маторы Л.Ю., Богатырев В.А., Дыкман Л.А., Щеголев С.Ю. Иммунохимическая идентификация азоспирилл и исследование их антигенных структур // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. М., 2005. С.209–237.
2. Муратова А.Ю., Турковская О.В., Антонюк О.Е. и др. Нефтеокисляющий потенциал ассоциативных ризобактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2004. №6. С.1–7.
3. Agarwala-Dutt R., Tilak K.V.B.R., Rana J.P.S. Isolation of *Azospirillum* from interior of various parts of some graminaceous plants // Z. Mikrobiol. 1991. Bd.146. S.217–219.
4. Chaudhury S., Sengupta A. Association of nitrogen fixing bacteria with leaves of *Avicennia officinalis* L. a tidal mangrove tree of Sandarban // Indian. J. Microbiol. 1991. Vol.31. P.321–322.
5. Nosko P., Bliss L.C., Cook F.D. The association of free-living nitrogen-fixing bacteria with the roots of High Arctic graminoids // Arct. Alp. Res. 1994. Vol.26. P.180–186.
6. Bashan Y., Holguin G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996) // Can. J. Microbiol. 1997. Vol.43. P.103–121.
7. Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites // Proc. Intern. Symp. on N₂-Fixation. Washington. 1976. P.518–537.
8. Leive L., Shovlin V.K., Mergemhagen S.E. Physical, chemical and immunological properties of lipopolysaccharides released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate // J. Biol. Chem. 1968. Vol.243. P.6384–6391.
9. Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Matory L.Yu., Schwartzburd B.I. The serotyping of *Azospirillum* spp. by cell-gold immunoblotting // FEMS Microb. Lett. 1992. Vol.96. P.115–118.
10. Маторы Л.Ю., Шварцбург Б.И., Щеголев С.Ю. Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 1998. Т.67, №6. С.815–820.
11. Красов А.И., Попова И.А., Филиппчева Ю.А., Бурьгин Г.Л., Маторы Л.Ю. Применение иммуноферментного анализа для выявления азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* в почвенных суспензиях // Микробиология. 2009. Т.78, №5. С.662–666.
12. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* polysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. Vol.154. P.269–277.
13. Коннова О.Н., Бойко А.С., Бурьгин Г.Л., Федоненко Ю.П., Маторы Л.Ю., Коннова С.А., Игнатов В.В. Химические и серологические исследования липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum* // Микробиология. 2008. Т.77. №3. С.350–357.