

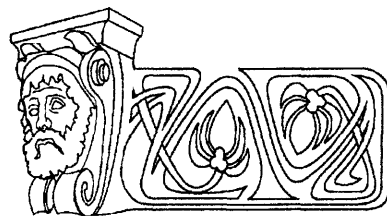


УДК 579.835.222

ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ДИАЗОТРОФНЫХ РИЗОБАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* SR55

А.С. Бойко, О.Н. Коннова, С.А. Коннова, Ю.П. Федоненко, В.В. Игнатов

Саратовский государственный университет,
кафедра биохимии и биофизики
E-mail: Konnova SA@info.sgu.ru



Исследованы липополисахариды грамотрицательных diazotrophic ризобактерий, стимулирующих рост растений, – *Azospirillum brasilense* SR55, изолированных с корней пшеницы в Саратовской области. Из наружной мембраны фенольной экстракцией выделен липополисахарид и изучен его химический состав. Среди основных компонентов гидрофобной части идентифицированы 3-гидрокситетрадекановая, 3-гидроксигексадекановая, гексадекановая и октадеценновая кислоты, а в углеводной составляющей – рамноза, галактоза, 3-О-метилрамноза и глюкуроновая кислота. Показано, что повторяющееся звено О-специфического полисахарида *A. brasilense* SR55 является разветвленным октасахаридом с остатком глюкуроновой кислоты в боковой цепи.

Characterization of the Lipopolysaccharide of the Diazotrophic Rhizobacterium *Azospirillum Brasilense* Sr55

A.S. Boyko, O.N. Konnova, S.A. Konnova, Yu.P. Fedonenko, V.V. Ignatov

This work was undertaken to investigate the lipopolysaccharide from gram-negative, plant-growth-promoting diazotrophic rhizobacterium *Azospirillum brasilense* SR55 isolated from the roots of wheat in Saratov oblast. The lipopolysaccharide was extracted from the outer membrane with phenol, and its chemical makeup was studied. The major components of the hydrophobic portion included 3-hydroxytetradecanoic, 3-hydroxyhexadecanoic, hexadecanoic, and octadecanoic acids; those of the carbohydrate portion included rhamnose, galactose, 3-O-methylrhamnose, and glucuronic acid. The repeated unit of the O-specific polysaccharide of *A. brasilense* SR55 was found to be a branched octasaccharide with a glucuronic acid residue in its sidechain.

Бактерии рода *Azospirillum*, распространенные в почвах прикорневой зоны широкого круга растений, являются diazotrophами, стимулирующими их рост. Большой научный и практический интерес представляют ассоциации бактерий *Azospirillum brasilense* со злаками, и в частности с пшеницей, в процессе формирования которых важная роль отводится поверхностным гликополимерам бактерий, в том числе и липополисахаридам (ЛПС) [1–3]. ЛПС вместе с белками обеспечивают целостность и стабильность бактериальной мембраны, селективную проницаемость, а также межклеточные взаимодействия с другими биосистемами [4]. Однако химическая структура ЛПС азоспирилл и сте-

пень участия в процессах взаимодействия с растениями исследованы недостаточно. В связи с этим целью нашей работы стало выделение и анализ ЛПС бактерий *A. brasilense* SR55, изолированных из ризосферы пшеницы Харьковская-46.

Бактериальная культура *A. brasilense* SR55 [5] получена из коллекции ИБФРМ РАН. Бактерии выращивали на жидкой малатной среде до окончания экспоненциальной фазы роста (18–20 ч) [1]. Капсульный материал с поверхности клеток отмывали 0.15 М NaCl с добавлением NaN_3 . Экстракцию ЛПС проводили из высушенных ацетонном клеток по методу Вестфала [6].

Высокомолекулярную фракцию полимера получали методом гель-фильтрации на колонке с носителем Sepharose CL-4B («Pharmacia», Швеция), элюцию проводили 0.025 М NH_4HCO_3 (pH 8.3).

Ионообменную хроматографию выполняли на колонке с анионитом DEAE-Toyoppearl 650 M («Toyosoda», Япония). Элюцию осуществляли ступенчато: вначале буфером трис-HCl (0.01 М; pH 7.2), затем раствором NaCl в том же буфере в градиенте от 0.01 М до 1 М. Детекцию материалов проводили с помощью дифференциального проточного рефрактометра LKB 2142 («LKB», Швеция) и по оптической плотности продуктов реакции с фенолом и серной кислотой, измеренной при длине волны 490 нм.

Биополимерный состав препаратов определяли стандартными колориметрическими методами, описанными ранее [1]. Дegradацию ЛПС проводили 1%-ной уксусной кислотой (pH 2.8) в течение 4 ч при 100°C.

Сахарный состав анализировали методом ГЖХ ацетатов полиолов после полного гидролиза полисахаридов 2 М CF_3COOH (120°C, 2 ч), восстановления и ацетилирова-



ния, а также методом ГЖХ-масс-спектрометрии частично метилированных ацетатов полиолов [7]. Анализ образцов осуществлялся на хроматографе Hewlett-Packard 5890 с капиллярной колонкой Ultra 2 в градиенте температуры от 180 до 290°C со скоростью нагрева 10°C/мин и хромато-масс-спектрометре Hewlett-Packard 5889 с капиллярной колонкой HP-1 («Hewlett-Packard», США). Метилирование жирных кислот гидрофобной части молекулы ЛПС_{SR55} выполняли согласно методике [7]. В качестве стандартов применяли эталонные образцы фирмы «SUPLECO» (США). Электрофорез препарата ЛПС_{SR55} в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу Hitchcock (1983) [8].

Несмотря на то, что для азоспирилл не выявлено строгой приуроченности к растениям-хозяевам, обнаружены некоторые особенности строения поверхностных гликополимеров, возможно, связанные с обитанием микроорганизмов в сходных экологических нишах. В частности, для большинства бактериальных штаммов, ассоциированных с пшеницей, показано преобладание рамнозы в составе капсульных полисахаридов и ЛПС [9]. В этом плане бактерии *A. brasilense* SR55 интересны тем, что были изолированы из ассоциации с пшеницей твёрдого сорта, в отличие от всех исследованных ранее «пшеничных» штаммов азоспирилл.

Для извлечения ЛПС_{SR55} использовали экстракцию горячим фенолом, что позволило получить препарат, практически свободный от примесей белка и нуклеиновых кислот. Выделение из экстракта высокомолекулярной фракции ЛПС_{SR55} проводили гель-фильтрацией, в результате чего получили очищенный препарат с выходом 2.1%. ЛПС_{SR55} выходил с холостым объемом колонки, имел профиль элюции, характерный для ЛПС азоспирилл (рис.1).

При определении биополимерного состава специфическими реакциями на каждый компонент обнаружено, что содержание углеводов было сравнительно невысоким и составляло $24.5 \pm 1.2\%$. Количество 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты, являющейся связующим звеном между гидрофильной и гидрофобной частями молекулы ЛПС, составило $1.3 \pm 0.1\%$, а общего фосфора, участвующего

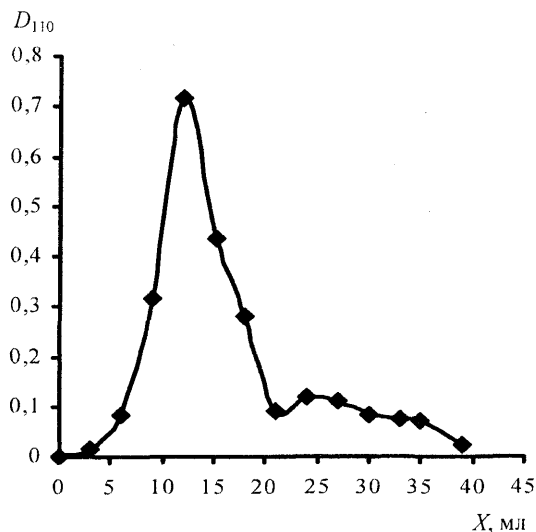


Рис.1. Профиль элюции ЛПС *A. brasilense* SR55 на колонке с носителем Sepharose CL-4B

в закреплении полимера в мембране, — $3.3 \pm 0.6\%$ — больше, чем у других «пшеничных» штаммов. Достаточно низкое содержание белка ($1.7 \pm 0.1\%$) и следовые примеси нуклеиновых кислот свидетельствовали о высокой степени очистки препарата.

После мягкого кислотного гидролиза ЛПС_{SR55} 1%-ной уксусной кислотой из гидролизата центрифугированием осадил липид А, выход которого составил 26.7%, а из растворимой фракции методом гель-фильтрации выделили ОПС_{SR55} с выходом 14.5% от навески исходного препарата. Известно, что ЛПС в составе бактериальной мембраны может быть представлен тремя молекулярными формами: S-формой, для которой характерно наличие «полноценного» О-специфического полисахарида (ОПС), R-формой, у которой ОПС отсутствует, и SR-формой, в которой к кору вместо полимерной цепи присоединено одно звено ОПС. Методом электрофореза в ПААГ показано, что в препарате ЛПС_{SR55}, наряду с молекулами S-формы, присутствовали R-формы молекул в высокой концентрации (рис.2), чем, очевидно, и объясняется относительно невысокий выход препарата ОПС_{SR55}.

В составе гидрофобного компонента ЛПС_{SR55} — липида А, участвующего в стабилизации полимера в мембране за счет гидрофобного взаимодействия с фосфолипидами, методом ГЖХ метиловых эфиров идентифицированы насыщенные, гидроксидные и ненасы-



Рис. 2. Результат электрофореза в ПААГ препарата ЛПС_{SR55}

щенные жирные кислоты с длиной углеродной цепи от C₉ до C₁₉. При этом основными по содержанию являлись 3-гидрокси-тетрадекановая, 3-гидроксигексадекановая, гексадекановая и октадеценановая кислоты. Процентное соотношение и состав жирных кислот ЛПС_{SR55} оказались близкими к таковым других штаммов и видов азоспирилл, в том числе выделенных из ризосферы пшеницы [10, 11].

Изучение углеводного компонента — ОПС_{SR55} начали с исследования его гетерогенности по плотности отрицательного заряда на колонке с DEAE-Тоуорpearl 650M, в результате чего выявили его «анионные» свойства.

Анализ моносахаридного состава ОПС_{SR55} методом ГЖХ ацетатов полиолов продемонстрировал присутствие рамнозы, галактозы и неидентифицированного сахара в соотношении 4:2:1, т.е. преобладающим компонентом вновь оказалась рамноза, как и у ранее изученных «пшеничных» штаммов азоспирилл. Наличие в составе ОПС_{SR55} глюкуроновой кислоты было показано ГЖХ ацетилированных метиловых эфиров октилглицеридов. Методом ГЖХ-МС частично метилированных ацетатов полиолов (с CD₃I) в ОПС_{SR55} были идентифицированы 3-замещенная гексоза, 4-замещенная 6-дезоксигексоза, 3-замещенная 6-дезоксигексоза, 2,3-дизамещенная

6-дезоксигексоза, терминальная гексоза и 4-замещенная 3-О-Ме-6-дезоксигексоза в соотношении 2:2:1:1:1:1. Данные согласуются с результатами ГЖХ, если учесть, что в ходе подготовки образцов для ГЖХ-МС карбонильная группа глюкуроновой кислоты на стадии восстановления превратилась в гидроксил, а неидентифицированный моносахарид является 3-О-метилрамнозой.

Таким образом, по предварительным данным повторяющееся звено ОПС_{SR55} представлено разветвленным октасахаридом с остатком глюкуроновой кислоты в боковой цепи. Следует отметить, что это первый случай обнаружения гетероолигосахарида в качестве повторяющегося звена ОПС среди «пшеничных штаммов» *A. brasilense* и, кроме того, уроновая кислота, характерная для капсульных ПС азоспирилл, в составе ОПС выявлена впервые. Полученные результаты расширяют представление о молекулярном разнообразии гликополимеров, опосредующих взаимодействие азоспирилл с корнями растений.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты 05-04-48123 и НШ 6177.2006.4).

Библиографический список

1. Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. Isolation, fractionation and some properties of polysaccharides produced in a bound from by *Azospirillum brasilense* and their possible involvement in *Azospirillum*-wheat root interaction // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V.118. P.93–99.
2. Yegorenkova I.V., Konnova S.A., Sachuck V.N., Ignatov V.V. *Azospirillum brasilense* colonization of wheat roots and role of lectin-carbohydrate interactions in bacterial adsorption and root-hair deformation // Plant Soil. 2001. V.231. P.275–282.
3. Федоненко Ю.П., Егоренкова И.В., Коннова С.А., Игнатов В.В. Участие липополисахаридов азоспирилл во взаимодействии с поверхностью корней пшеницы // Микробиология. 2001. Т.70, №3. С.384–390.
4. Newman M.A., Dow J.M., Daniels M.J. Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions // Europ. J. Plant Pathology. 2001. V.107. P.95–102.
5. Позднякова Л.И., Каневская С.В., Леванова Г.В. и др. Таксономическое изучение азоспирилл, выделенных из знаков Саратовской области // Микробиология. 1988. Т.57, №2. С.275–278.
6. Вестфаль О., Янн К. Бактериальные липополисахариды // Методы химии углеводов. М.: Мир, 1967. С.325–332.
7. Hakomori S.-I. A rapid permethylation of glycolipids and polysaccharides catalyzed by methylsulfinyl carbanion in demethylsulfoxide // J. Biochem. 1964. V.55. P.205–208.



8. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stain polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. V.154. P.269–277.

9. Коннова С.А., Федоненко Ю.П., Игнатов В.В. Структура и функции гликополимеров поверхности азоспирилл // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. М.: Наука, 2005. С.42–63.

10. Choma A., Russa R., Mayer H., Lorkiewicz Z. Chemical analysis of *Azospirillum* lipopolysaccharides // Arch. Microbiol. 1987. V.146. P.341–345.

11. Федоненко Ю.П., Здоровенко Э.Л., Коннова С.А. и др. Сравнительная характеристика липополисахаридов и О-специфических полисахаридов *Azospirillum brasilense* Sp245 и его Омега-Км-мутантов КМ018 и КМ252 // Микробиология. 2004. Т.73, №3. С.180–187.