

На правах рукописи

Евстигнеева Стелла Сергеевна

**ГЛИКОПОЛИМЕРЫ ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ И ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ
ПОЛИСАХАРИДЫ АССОЦИАТИВНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM*
В АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ СУЩЕСТВОВАНИЯ**

Специальность: 1.5.11. – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН)

Научный руководитель:

Федоненко Юлия Петровна, кандидат биологических наук (специальность 1.5.11. – Микробиология, 1.5.4. – Биохимия), доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, лаборатория биохимии, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией, г. Саратов

Официальные оппоненты:

Тулская Елена Михайловна, доктор биологических наук (специальность 1.5.11. – Микробиология), доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра микробиологии, лаборатория физиологии и биохимии микробов, старший научный сотрудник, г. Москва

Журина Марина Владимировна, кандидат биологических наук (специальность 1.5.11. – Микробиология), Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория выживаемости микроорганизмов, старший научный сотрудник, г. Москва

Ведущая организация:

Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, г. Уфа

Защита диссертации состоится «3» декабря 2021 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», дом 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01
кандидат биологических наук



Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Среди наиболее важных обитателей ризосферы, которые участвуют в образовании растительно-микробных ассоциаций, выделяют представителей рода *Azospirillum*. Данные бактерии, встречающиеся в почвах большинства климатических зон, выступают в качестве ключевого компонента различных агроэкосистем, в составе которых они формируют взаимовыгодные связи с культурными и сорными растениями (Kirchhof *et al.*, 1997; Fibach-Paldi *et al.*, 2012). Увеличение урожайности злаков независимо от типа почв и погодно-климатических условий является важной задачей для мирового сельского хозяйства, решить которую помогут микробные удобрения, в том числе на основе азоспирилл, с условием всестороннего изучения их адаптационного потенциала.

Эффективность внесения бактерий в составе биоудобрений в почву определяется успешностью первых этапов колонизации корневой системы растений (Skvortsov and Ignatov, 1998). Со стороны азоспирилл на начальных этапах становления ассоциативных отношений принимают участие экзополисахариды (ЭПС), капсульные полисахариды (КПС) и липополисахариды внешней мембраны (ЛПС). Несмотря на важные функции, которые выполняют КПС в ходе жизнедеятельности бактерий, структура липополисахарид-белкового (ЛПБК) и полисахарид-липидного (ПСЛК) комплексов, выделенных из капсулы, определена только для типового штамма *A. lipoferum* Sp59b (Смолькина и др., 2010). Такая существенная недоработка при исследовании молекулярного диалога азоспирилл с растениями, вероятно, связана со сложным составом капсульных биополимеров и их изменчивостью, которая помогает бактериям приспосабливаться к различным условиям среды обитания.

Бактерии рода *Azospirillum* способны перерабатывать различные субстраты, находящиеся в ризосфере, и использовать их как источник углерода. В частности, азоспириллы утилизируют низкомолекулярные органические кислоты и углеводы (Westby *et al.*, 1983; Myers and Hubbell, 1987). Тем не менее, в литературных источниках обнаружено недостаточно сведений об эффектах, оказываемых доминирующими источниками углерода в ризосфере растений-партнеров с различающимися путями фотосинтеза на структуру и химический состав гликанов бактерий *Azospirillum*. Основным источником углерода в селективных синтетических средах, с помощью которых осуществляют культивирование азоспирилл, является малат натрия. Это обусловлено тем, что в состав корневых экссудатов растений входят органические кислоты, причем они являются преобладающими компонентами данных корневых выделений. Одной из наиболее часто встречающихся органических кислот в экссудатах пшеницы и ряда других злаков является яблочная кислота (Кравченко и др., 2011). Тем не менее, в работе (Das and Mishra, 1983) было показано, что культивирование бактерий *A. brasilense* в среде, содержащей фруктозу в качестве источника углерода, не снижало продукцию клеточной биомассы, если сравнивать с ростом азоспирилл в среде с малатом натрия. Кроме того, выращивание данных бактерий во фруктозо-содержащей среде усиливало процесс фиксации азота (Das and Mishra, 1983). Синтетические среды, включающие фруктозу и нитрат калия в качестве источников углерода и азота, соответственно, могут быть использованы для получения культур бактерий рода *Azospirillum* с повышенной флокуляцией (Sadasivan and Neyra, 1985). Флокулирующие культуры имеют важное прикладное значение для агробиотехнологии при обработке сельскохозяйственных растений. В работе (Егоренкова и др., 2000) было обнаружено влияние фазы роста азоспирилл на адсорбцию к поверхности корней растений, что указывает на возникновение модификаций в структуре гликанов внешней мембраны, либо на

перераспределение их состава на поверхности клеток. Поскольку процесс адсорбции имеет определяющую роль на первых этапах образования растительно-бактериального консорциума, необходимо провести изучение влияния отличных по природе источников углерода в питательной среде на ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *Azospirillum* на разных фазах роста.

К широкому набору воздействий, с которыми сталкиваются азоспириллы в ходе жизнедеятельности в ризосфере, можно отнести перепады температуры и повышенную концентрацию солей в почве. Тем не менее, сведения об адаптационных механизмах к этим стрессорам и степени вовлеченности в них компонентов поверхности бактерий носят фрагментарный характер. Известно лишь, что при кратковременном воздействии повышенных температур протекторную роль у бактерий *A. brasilense* выполняют экстраклеточные гликаны (Коннова и др., 2001), а в процессе адаптации к солевому стрессу у типового штамма *A. brasilense* Sp7 происходит индукция ряда генов, контролирующих синтез компонентов клеточной поверхности (Nagarajan *et al.*, 2007). Расширение представлений о защитных реакциях бактерий рода *Azospirillum* к температурному и солевому стрессам, а также об участии в них гликополимеров поверхности клеток и их экстраклеточных форм, может быть использовано для оптимизации состава биопрепаратов на их основе.

Бактерии рода *Azospirillum* при колонизации растений формируют на поверхности корней пространственно и метаболически организованные сообщества, называемые биопленками. В ряде работ были исследованы особенности формирования биопленок штаммом *A. baldaniorum* Sp245 (ранее штамм *A. brasilense* Sp245, реклассифицирован согласно работе Dos Santos Ferreira *et al.*, 2020) и его мутантами по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1*, а также *flhB1* мутанта, лишённого полярного и латерального жгутиков, на гидрофильной и гидрофобной поверхностях (Шелудько и др., 2015; Шумилова и др., 2016). Также для *A. baldaniorum* Sp245 и его производных было продемонстрировано влияние мутаций в генах синтеза ЛПС и полисахаридов (ПС), связывающих калькофлюор, на толщину биопленок, образованных на границе раздела «жидкость–твёрдая гидрофильная/гидрофобная поверхности» (Шелудько и др., 2008). Данный факт указывает на важную роль, которую выполняют гликополимеры поверхности при биопленкообразовании, однако вопросы о том изменяется ли структура этих биополимеров при переходе от планктонного культивирования к иммобилизации в биопленках, и как эти модификации могут влиять на колонизацию растений, остаются открытыми. На сегодняшний день для азоспирилл также практически не изучен состав внеклеточного полимерного матрикса (ВПМ) как основного структурного компонента биопленок.

Фундаментальные знания о роли гликополимеров поверхности и их экстраклеточных форм в защитных реакциях азоспирилл на стрессовые воздействия, а также в иммобилизации бактерий в случае образования биопленок, внесут существенный вклад в разработку эффективных микробных удобрений с широким спектром применения.

Цель работы – охарактеризовать структуру гликополимеров внешней мембраны и внеклеточных полисахаридов ассоциативных бактерий рода *Azospirillum* при адаптации к условиям существования. Для реализации цели в ходе исследования решали следующие **задачи**:

1. Установить структуру липополисахарид-белкового комплекса капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при выращивании в селективной питательной среде с малатом натрия.

2. Оценить влияние природы источника углерода в среде культивирования и фазы роста на состав и структуру капсульных полисахаридов и липополисахаридов бактерий *A. baldaniorum* Sp245.

3. Изучить влияние температурного и солевого стрессов на особенности структуры экзополисахаридов, капсульных полисахаридов и липополисахаридов бактерий *A. baldaniorum* Sp245.

4. Провести характеристику структуры гликополимеров в составе внеклеточного полимерного матрикса, формируемого биопленками бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4.

Научная новизна работы. Установлена структура углеводного компонента ЛПБК, полученного из КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Впервые были выделены и идентифицированы белки, входящие в состав ЛПБК капсулы *A. baldaniorum* Sp245 – основной белок наружной мембраны OmsA и OmpW-подобный белок.

Выявлены изменения состава и структуры ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при варьировании условий культивирования (природы источника углерода и концентрации хлорида натрия в питательной среде, фазы роста и температуры). Определена структура дополнительного ПС, который синтезировался в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактериями *A. baldaniorum* Sp245 при росте в среде с фруктозой, а также в условиях температурного и солевого стрессов.

Впервые были выделены и охарактеризованы ЛПС и ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Установлено, что при переходе от планктонного культивирования к образованию биопленок бактерии *A. halopraeferens* Au4 продуцируют дополнительный глюкан в ЛПС. В составе ВПМ биопленок исследуемых штаммов преобладали белки в широком диапазоне молекулярных масс ~20-80 кДа. Углеводная фракция ВПМ была представлена молекулами ЛПС, а также синтезированным *de novo* гомоглюканом в случае галотолерантного штамма.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты настоящей работы имеют фундаментальное значение для выяснения закономерностей адаптации почвенных бактерий к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также роли в адаптации экстраклеточных и мембранных гликополимеров ассоциативных бактерий. Учитывая, что стимулирующие рост и развитие растений бактерии рода *Azospirillum* могут быть использованы для создания экологически безопасных комплексных биоудобрений, полученные данные помогут оптимизировать применение таких биопрепаратов в различных климатических и почвенных условиях. Выбранные для исследования штаммы образуют ассоциации с ценными для сельского хозяйства зерновыми и кормовыми культурами, распространенными как на территории Российской Федерации, так и за рубежом.

Препараты экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4, выращенных при различных условиях, используются при выполнении плановых НИР в рамках лаборатории биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (ИБФРМ РАН).

Результаты настоящей работы, применяются студентами бакалаврами и магистрами Саратовского национального исследовательского государственного университета им. Н.Г. Чернышевского (СГУ) при подготовке выпускных квалификационных работ.

Научно-методические подходы, которые были разработаны при выполнении диссертационного исследования, включены в учебное пособие «Методы изучения формирования биопленок почвенными бактериями, стимулирующими рост растений» / Сост.: Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Телешева Е.М., Дятлова Ю.А., Шелудько А.В., Широков А.А., Матора Л.Ю., Тугарова А.В., Камнев А.А., Филипьевичева Ю.А., Петрова Л.П.; Под ред. Ю.П. Федоненко; Саратов, 2021; 40 с., рекомендованное к публикации на заседании Ученого совета ИБФРМ РАН.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы согласовывалась с поставленной целью и соответствовала решаемым задачам. Предметом данного исследования являлись гликополимеры внешней мембраны и полисахариды поверхности бактерий рода *Azospirillum*. В качестве теоретической основы для проведенных экспериментов выступали научные труды российских и зарубежных коллег. В диссертационном исследовании использовали микробиологические, физико-химические, биохимические, биоинформатические и иммунохимические методы. Полученные в ходе работы результаты регистрировались и обрабатывались с использованием статистических методов анализа.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Липополисахарид-белковый комплекс, продуцируемый бактериями *A. baldaniorum* Sp245 в капсульный материал, характеризуется сходным профилем жирных кислот и идентичной структурой полисахаридного компонента с гомологичным липополисахаридом внешней мембраны, а также наличием двух белков – порина OmsA и канал-образующего OmpW-подобного белка.

2. Использование различных источников углерода, варьирование концентрации хлорида натрия в питательной среде, увеличение температуры и продолжительности культивирования бактерий *A. baldaniorum* Sp245 сопровождается изменениями в макромолекулярной организации, моносахаридном и жирнокислотном составе экзополисахаридов, капсульных полисахаридов и липополисахаридов. Индукция биосинтеза глюкана, дополнительного полисахарида в составе экстраклеточных и мембранных гликополимеров азоспирилл, является ответной реакцией на воздействие стрессовых факторов различной природы.

3. В составе многокомпонентного внеклеточного полимерного матрикса биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 преобладают белки (до 80%) с широким диапазоном молекулярных масс, а гликополимерная составляющая представлена липополисахаридом (до 20%). При образовании биопленок бактерии *A. halopraeferens* Au4 продуцируют дополнительный гомоглюкан в составе липополисахарида внешней мембраны и матрикса.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается применением современных методов анализа, получением достаточного количества опытных данных, их согласованности с теоретическими выкладками, использованием статистических методов обработки и сертифицированного оборудования, прошедшего метрологическую поверку. Выводы, сформулированные по итогам данной работы, имеют четкое экспериментальное обоснование.

Результаты, изложенные в данной диссертационной работе, были представлены на 2-ой Международной междисциплинарной научной конференции «Адаптационные стратегии живых систем» (12-17 мая 2014, Новый Свет, Украина); II, III и IV Всероссийских конференциях

«Фундаментальная гликобиология» (7-11 июля 2014, Саратов; 7-12 сентября 2016, Владивосток; 23-28 сентября 2018, Киров); VII Всероссийском конгрессе молодых биологов «Симбиоз-Россия 2014» (6-11 октября 2014, Екатеринбург); X молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (27-30 октября 2015, Москва); VIII и IX Всероссийских конференциях молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (26-30 сентября 2016; 14-18 октября 2019, Саратов); X Всероссийском конгрессе молодых биологов «Симбиоз-Россия 2017» (25-28 октября 2017, Казань); Международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (13-17 июня 2018, Уфа); Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения – 2018», посвященной 131-годовщине со дня рождения Н.И. Вавилова (28-29 ноября 2018, Саратов); IV Съезде биохимиков России, проходившего в рамках II Объединенного научного форума (1-6 октября 2019, Дагомыс, Сочи).

Устный доклад на тему «Особенности состава и структуры гликополимеров поверхности и матрикса биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245» в секции «Экология, физиология и биотехнология микроорганизмов и грибов» VII Всероссийского Конгресса «Симбиоз-Россия 2014» (Екатеринбург, 2014) был удостоен диплома I степени. Устный доклад на тему «Бактериальный «социум» биопленок или особенности организации микробных сообществ ризосферы» по итогам конкурса работ молодых ученых на IX Всероссийской конференции «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2019) был удостоен диплома III степени.

Личный вклад соискателя. Автор диссертационной работы принимал участие в планировании и проведении экспериментальных работ, обсуждении полученных результатов, формулировании выводов и основных положений, а также в написании публикаций. Выращивание бактериальных культур, выделение, очистка и характеристика препаратов экстраклеточных и мембранных гликополимеров, а также O-специфических полисахаридов (ОПС) проводились автором лично.

Публикации. По теме диссертации подготовлено 17 публикаций в российских и зарубежных научных изданиях, из которых 6 статей в журналах, которые рекомендованы ВАК РФ для опубликования результатов диссертационных исследований.

Объем и структура диссертации. Диссертация включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, состоящую из изложения результатов собственных исследований и их обсуждения, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, который содержит 317 источников, из которых 54 источника на русском языке. Работа представлена на 165 страницах, в качестве иллюстративного материала содержит 23 рисунка и 16 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В данной главе приведены сведения о бактериях р. *Azospirillum* как представителях группы ризобактерий, стимулирующих рост и развитие растений. Охарактеризованы основные этапы ассоциативного взаимодействия растений с бактериями *Azospirillum* на молекулярном уровне. Описан вклад экстраклеточных и мембранных гликополимеров азоспирилл в

образование растительно-микробных ассоциаций. Проанализированы данные о формировании биопленок бактериями рода *Azospirillum*, а также ряда мутантных штаммов на гидрофильных и гидрофобных поверхностях. Описаны возможные варианты функционирования мультивидовых биопленок с участием бактерий р. *Azospirillum*. Рассмотрены основные адаптационные реакции азоспирилл на изменение условий существования (природа источника углерода и соотношение источников углерода и азота в питательной среде, а также осмотический и температурный стрессы).

Глава 2. Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали эндофитный *A. baldaniorum* Sp245 и галотолерантный *A. halopraeferens* Au4 штаммы, предоставленные коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Таблица 1).

Таблица 1 – Бактерии рода *Azospirillum*, исследуемые в настоящей работе

Вид и штамм	Источник выделения	Ссылка
<i>A. baldaniorum</i> Sp245 IBPPM 219 (ранее <i>A. brasilense</i> Sp245)	поверхностно стерилизованные корни пшеницы (<i>Triticum</i> sp.), Бразилия	Baldani <i>et al.</i> , 1983; Dos Santos Ferreira <i>et al.</i> , 2020
<i>A. halopraeferens</i> Au4 IBPPM 221	ризоплана лептохлой темной (<i>Leptochloa fusca</i> L. Kunth), Пакистан	Reinhold <i>et al.</i> , 1987

В экспериментах по изучению влияния источника углерода в среде на состав экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерии *A. baldaniorum* Sp245 выращивали в среде с малатом натрия (5 г/л), либо фруктозой (4.5 г/л). Для создания условий солевого стресса данный штамм культивировали в среде с малатом натрия с содержанием хлорида натрия 200-300 мМ (3 мМ в стандартной среде). При температурном стрессе рост бактерий *A. baldaniorum* Sp245 осуществляли в диапазоне температур 40-45°C (30°C для стандартных условий). Аэрация среды в ходе ферментации данного штамма поддерживалась встряхиванием на шейкере-инкубаторе при 120 об/мин в течение 24 или 120 ч, что соответствовало окончанию экспоненциальной и поздней стационарной фазам роста, соответственно. Для получения биопленок бактерии *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 выдерживали в стационарных условиях без перемешивания на протяжении пяти суток.

Фазово-контрастную микроскопию биопленок и измерение их толщины проводили на лазерном диссекторе Leica LMD 7000 (Leica Microsystems, Германия). Процедуру подготовки препаратов для микроскопии и анализ результатов выполняли в соответствии с работой (Шелудько и др., 2015). Для визуализации компонентов ВПМ в нативных биопленках бактерий *A. baldaniorum* Sp245 применяли конфокальную микроскопию на приборе TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия).

Относительную гидрофобность поверхности бактерий определяли с помощью теста солевой агрегации (Lindahl *et al.*, 1981). Количественную оценку агрегации бактериальных культур выполняли согласно методике (Madi and Henis, 1989).

ЭПС из культуральной жидкости осаждали тремя объемами охлажденного этанола, затем подвергали гель-фильтрации на колонке с носителем Sepharose CL-6B и очищенные препараты лиофилизировали (Del Gallo and Haegi, 1990). КПС с поверхности клеток смывали 0.15 М раствором NaCl на протяжении шести суток с ежедневной заменой отмывающего раствора. Капсулу от первых двух суток отмывания концентрировали, диализовали, очищали гель-фильтрацией на колонке с Sepharose CL-6B и лиофильно высушивали. КПС фракционировали на колонке с Sepharose CL-4B с получением ЛПБК, для которого максимумы поглощения по углеводам и белкам соответствовали одинаковым элюционным объемам.

Для выделения ВПМ биопленки отделяли от планктонной культуры с помощью нейлонового крупноячеистого фильтра, суспендировали в фосфатном буфере и обрабатывали ультразвуком. Клетки из суспензии осаждали центрифугированием, супернатант, содержащий ВПМ, диализовали, концентрировали и лиофилизировали.

Экстракцию ЛПС из бескапсульных клеток, либо биомассы биопленок после отделения ВПМ, осуществляли горячим 45% водным фенолом по модифицированной методике Вестфала без разделения водного и фенольного слоев (Кульшин и др., 1987).

ОПС выделяли из ЛПС и ПС из КПС деградацией препаратов 2% уксусной кислотой при 100°C на протяжении 4-5 ч (Muller-Seitz *et al.*, 1968). Для отделения липидных фракций гидролизаты центрифугировали, супернатанты фракционировали на колонке с Sephadex G-50. Собирали фракции ОПС/ПС, которые в дальнейшем концентрировали и лиофилизировали.

Содержание в исследуемых препаратах углеводов, в том числе остатков 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (Kdo), белков и фосфора определяли в соответствии с общепринятыми колориметрическими методами аналогично (Konnova *et al.*, 1994).

Электрофорез исследуемых гликополимеров проводили в 15% Ds-Na-ПААГ (Hitchcock and Brown, 1983). Визуализацию углеводных компонентов выполняли окрашиванием гелей красителем на основе нитрата серебра (Tsai and Frasch, 1982), а детекцию белков – красителем кумасси бриллиантовым голубым R-250.

Анализ состава и соотношения моносахаридов и жирных кислот (ЖК) в ЭПС, КПС, ВПМ и ЛПС проводили методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ). Моносахаридный состав препаратов и абсолютные конфигурации сахаров устанавливали в виде ацетатов полиолов (Sawardeker *et al.*, 1965) и ацетилированных гликозидов с (R)-2-октанолом (Leontein *et al.*, 1978). ЖК в образцах идентифицировали в виде их метиловых эфиров (МЭЖК) (Mayer *et al.*, 1985).

¹H и ¹³C спектры ЯМР записывали на спектрометре Avance II 600 (Bruker, Германия). Предварительно образцы дважды лиофилизировали из 99.9% D₂O, а затем растворяли в 99.96% D₂O. Спектры регистрировали при температуре 30°C, в качестве внутреннего стандарта использовали 3-триметилсилилпропаноат-d₄ (δ_H 0.0, δ_C -1.6). Для сбора и обработки полученных данных использовали программу XWINNMR 2.1.

Методом масс-спектрометрии с помощью программного обеспечения Mascot версии 2.4.2 в базе данных UniProt идентифицировали белки, входящие в состав ЛПБК капсулы. Для изучения трансмембранной природы белков и определения их вторичной структуры были использованы онлайн-инструменты MCMBB (Bagos *et al.*, 2004a) и Pred-TMBB (Bagos *et al.*, 2004b). Моделирование трехмерных структур белков осуществляли с помощью онлайн-сервисов I-TASSER, Phyre2 и LOMETS. Уточнение 3D моделей выполняли с помощью алгоритма ModRefiner (Xu and Zhang, 2011). Для определения амилоидных свойств исследуемых белков были использованы алгоритмы Waltz (Beerten *et al.*, 2015) и Aggrescan (de Groot *et al.*, 2012).

Глава 3. Результаты исследований и их обсуждение

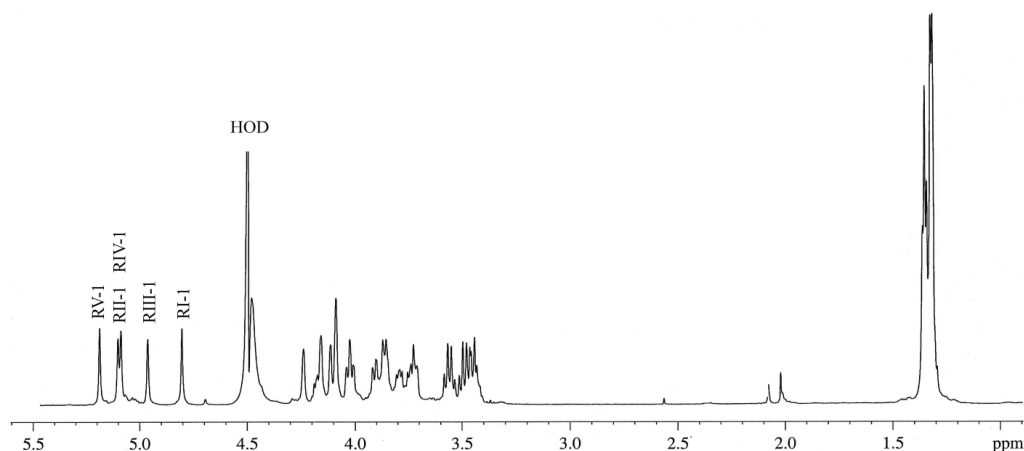
3.1 Характеристика структуры ЛПБК из КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245

С поверхности клеток *A. baldaniorum* Sp245, культивируемых в питательной среде с малатом натрия, получили КПС, выход которого в расчете на сухую биомассу клеток составил 6%. Из капсулы данного штамма выделили фракции ЛПБК и ПСЛК, выходы которых составили 1 и 0.3%, соответственно, от высушенной биомассы. Для дальнейших исследований использовали преобладающую в КПС бактерий штамма Sp245 фракцию ЛПБК.

3.1.1 Анализ структуры ПС, выделенного из ЛПБК капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Анализ химического состава показал наличие в образце ЛПБК бактерий *A. baldaniorum* Sp245 углеводов (~40%), в том числе Кдо (~2%), белков (~16.5%) и остатков фосфорной кислоты (~3%). Липидная фракция ЛПБК включала остатки следующих ЖК: 3-ОН-С14:0 (~23%), С16:0 (~9%), 3-ОН-С16:0 (~18%), С18:1 (~26%) и С19:0 (~24%).

Преобладающим моносахаридом в ЛПБК данного штамма являлась D-рамноза (D-Rha), содержание которой составляло 98% от суммы пиков. ^{13}C -ЯМР спектры ПС, полученного из препарата ЛПБК, содержали сигналы пяти аномерных атомов углерода (97.8-103.3 м.д.), метильных групп пяти остатков Rha (17.8-17.9 м.д.) и двадцати сигналов атомов углерода моносахаридных циклов (68.4-79.0 м.д.). В спектрах ^1H -ЯМР (Рисунок 1), соответственно, присутствовали сигналы пяти аномерных протонов (4.82-5.20 м.д.), пяти метильных групп Rha (1.30-1.33 м.д.) и протонов моносахаридных колец (3.43-4.25 м.д.). Идентичные спектры демонстрировал ОПС из ЛПС данного штамма, структура которого была установлена ранее (Fedonenko *et al.*, 2002). Следовательно, бактерии *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании в малатной среде до окончания экспоненциальной фазы роста продуцируют ЛПБК, повторяющееся звено ПС которого идентично по своей структуре повторяющемуся звену ОПС: $\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Rhap}^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{III}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{IV}}\text{-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap}^{\text{V}}\text{-(1}\rightarrow$



Арабские цифры соответствуют протонам в моносахаридных остатках: R, Rha.
Рисунок 1 – Спектр ^1H -ЯМР препарата ПС из ЛПБК бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Несмотря на то, что капсульные и мембранные гликополимеры бактерий *A. baldaniorum* Sp245 идентичны по структуре и антигенным свойствам были обнаружены различия в их биологической активности. ЛПС, в отличие от КПС, не вступал во взаимодействие с агглютинином зародышей пшеницы (Егоренкова и др., 2001; Konnova and Ignatov, 2003) и это, очевидно, связано с гетерогенностью КПС и присутствием минорных углеводных компонентов, обладающих сродством к этому лектину. Такой эффект, может объясняться тем, что КПС и ЛПС участвуют на разных стадиях формирования растительно-микробных ассоциаций.

3.1.2 Характеристика белков в ЛПБК бактерий *A. baldaniorum* Sp245

В составе ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245 выявили два преобладающих белка с массами ~30 и 42 кДа (**Рисунок 2**). С применением метода МАЛДИ масс-спектрометрии и поискового алгоритма MASCOT применительно к белку с кажущейся молекулярной массой 42 кДа обнаружили два совпадения: OmaA, основной белок наружной мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245 (40.9 кДа), и предшественник белка OmaA бактерий *A. brasilense* Sp7 (40.8 кДа). Оба белка состоят из 390 а. о., и их парное выравнивание показало 99.5% идентичности с отличиями в положениях а. о. 88 и 373.

Для белка с кажущейся молекулярной массой 30 кДа удалось получить один значимый результат – канал-образующий OmpW-подобный белок внешней мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245 (24.8 кДа), состоящий из 232 а. о.

Анализ белков OmaA и OmpW ресурсами MСMBV и Pred-TMBV показал высокую вероятность локализации данных белков в наружной мембране бактерий (**Рисунок 3**). Исходя из полученных моделей, белок OmaA имеет гораздо большую длину последовательности, которая включена в мембрану, в отличие от OmpW, что указывает на разные механизмы рецепции транспортируемых ими молекул и различные черты их функционирования в клеточной стенке бактерий.

Парное выравнивание белков OmpW и OmaA позволило выявить в их составе несколько идентичных сайтов, при этом сравнение их вторичных структур обнаружило лишь незначительное сходство (**Рисунок 4**). В аминокислотных последовательностях данных белков имеются несколько коротких областей с тремя α -спиралями и многочисленными β -складчатыми слоями, что свидетельствует о тенденции к формированию различных типов β -структур. Белок OmaA содержит в негомологичных по отношению к белку OmpW областях дополнительные β -складчатые структуры.

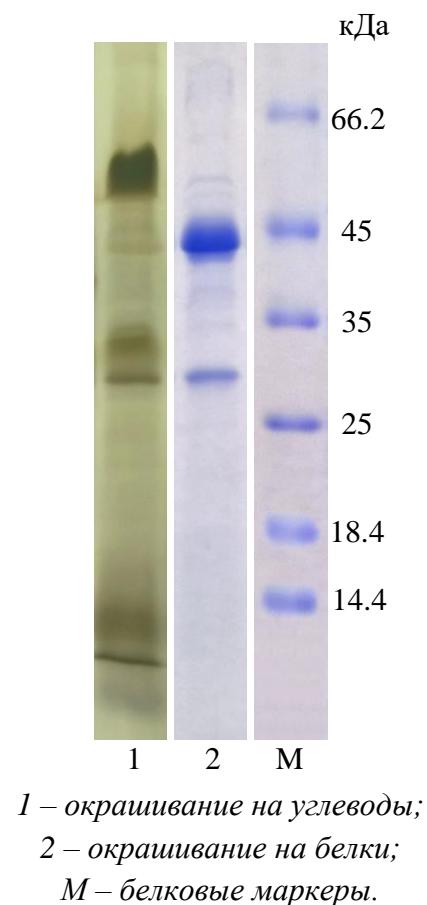


Рисунок 2 –
Электрофореграмма образца ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245

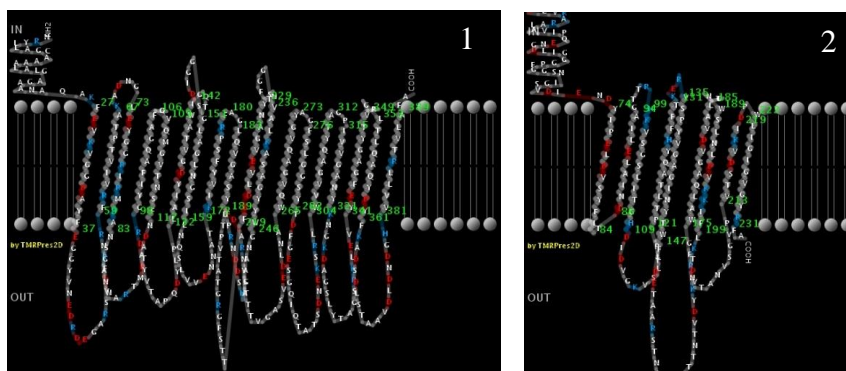
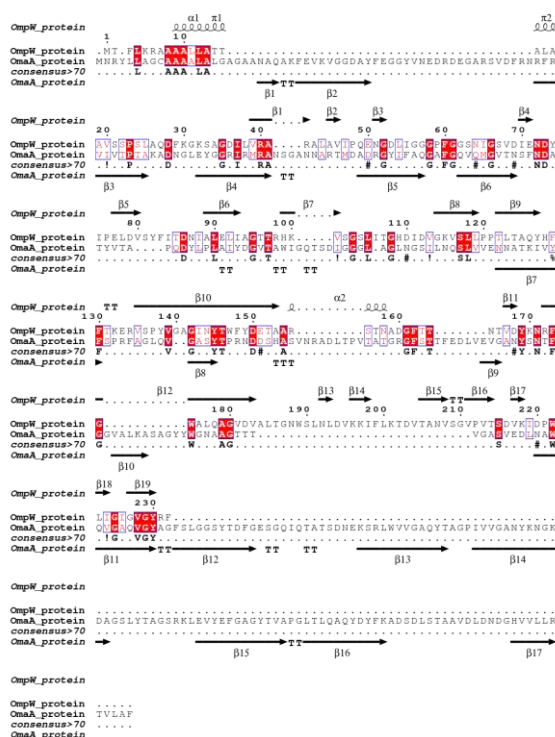


Рисунок 3 – Модели возможной локализации белков OmpA (1) и OmpW (2) в наружной мембране (получены с помощью сервиса Pred-TMBV)

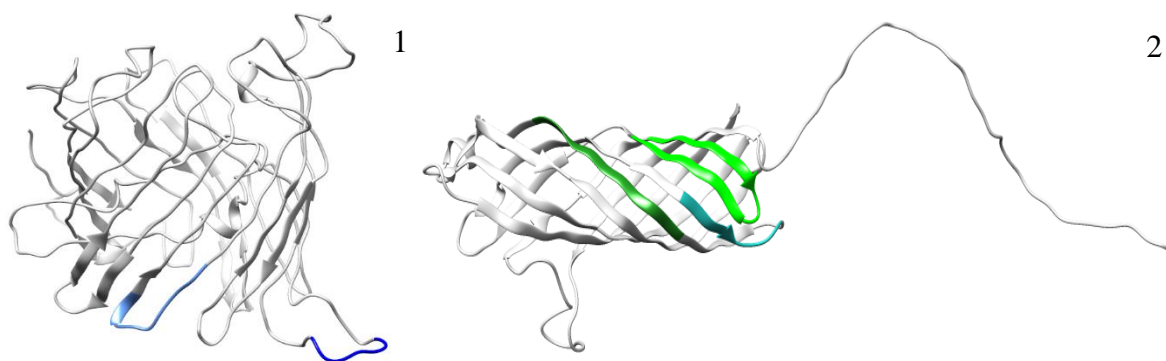
Результаты парного выравнивания белков OmpW и OmpA подтверждаются результатом анализа белков сервисом Pred-TMBV, который показал наличие большего количества трансмембранных петель в OmpA, по сравнению OmpW-подобным белком. Таким образом, белки ЛПБК капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 обладают низкой гомологией, но, в тоже время, характеризуются определенными сходствами вторичной структуры, что, вероятно, определяется особенностями их укладки во внешней мембране бактерий.



Участки вторичной структуры, смоделированные PSS PRED показаны в верхней и нижней частях каждой последовательности; стрелки обозначают β-листы, а спирали – α-спирали. Красные прямоугольники показывают идентичность аминокислот в обеих последовательностях, а белые – сходство.

Рисунок 4 – Парное выравнивание аминокислотных последовательностей белков OmpW и OmpA с использованием ресурса ESPrpt 3.0

Для каждого белка получили по одной трехмерной модели Phyre2, по 5 моделей I-TASSER и по 10 моделей на мета-сервере LOMETS. После доработки трехмерных моделей сервисом ModRefiner показали, что наиболее достоверные трехмерные модели были построены в случае алгоритма SP3 (LOMETS 8) для белка OmpA и алгоритма PROSPECT2 (LOMETS 5) для белка OmpW (**Рисунок 5**).



Различными оттенками синего и зеленого цветов выделены области с высокой тенденцией к образованию β -амилоидных структур.

Рисунок 5 – Трехмерные модели белков OmaA (1) и OmpW (2), полученные с помощью алгоритмов LOMETS 8 и LOMETS 5, соответственно

На **Рисунке 5** на трехмерных моделях белков OmpW и OmaA выделены области, которые проявляют высокую тенденцию к образованию β -амилоидных структур, согласно прогнозу алгоритмов Aggrescan и Waltz. В модели OmpW-подобного белка, области, благоприятные для β -амилоидного структурирования, являются обширными, содержат небольшие повороты и расположены в фрагменте β -барреля близко друг к другу стерически. Напротив, визуализация расположения благоприятных для β -амилоидных структур областей в модели белка OmaA показала наличие β -организованных фрагментов стерически разделенных между собой, что указывает на небольшую вероятность его амилоидной сборки.

Продукция белка OmaA в капсулу, вероятно, является специально выработанной адаптационной стратегией, поскольку данный белок принимает непосредственное участие в колонизации корневой системы растений (Burdman *et al.*, 2001). Такой подход позволяет максимально интенсифицировать процесс заселения корней и, как следствие, повысить эффективность функционирования растительно-микробной ассоциации.

3.2 Исследование влияния условий культивирования на структуру экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *A. baldaniorum* Sp245

3.2.1 Влияние источника углерода в среде культивирования и фазы роста на структурные особенности КПС и ЛПС *A. baldaniorum* Sp245

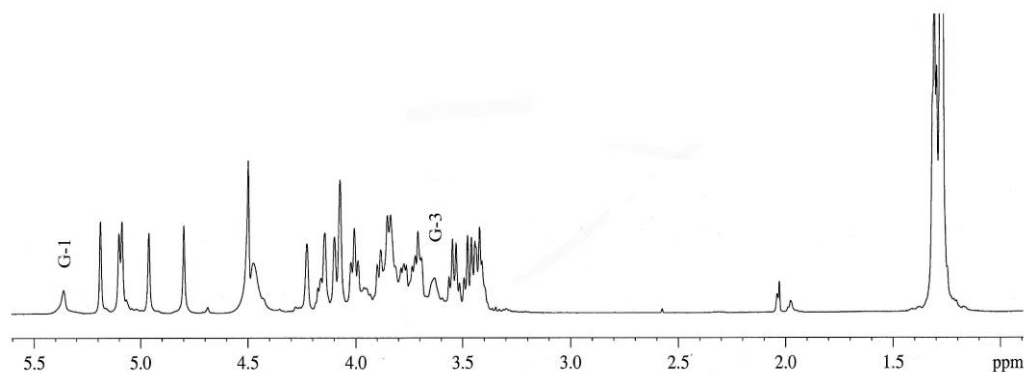
С поверхности клеток *A. baldaniorum* Sp245 выделили КПС_{м24}, КПС_{м120}, КПС_{ф24}, КПС_{ф120} (м – среда с малатом натрия, ф – среда с фруктозой, 24 и 120 – продолжительность роста), а водно-фенольной экстракцией из высушенных ацетоном клеток получили соответствующие препараты ЛПС_{м24}, ЛПС_{м120}, ЛПС_{ф24}, ЛПС_{ф120}. Выходы КПС составили 3.5-5.0%, а ЛПС – 4.5-9.5% от массы сухих бактериальных клеток. В виду того, что препараты КПС_{м24} и ЛПС_{м24} были исследованы ранее, и для ОПС была установлена структура повторяющегося звена (Fedonenko *et al.*, 2002), мы использовали их в качестве препаратов сравнения.

Для выделенных образцов КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 провели характеристику электрофоретической подвижности, биополимерного состава и профиля ЖК. Показали, что изменение источника углерода в питательной среде и увеличение продолжительности роста азоспирилл приводят к возрастанию доли углеводов и остатков

фосфорной кислоты, а также к увеличению содержания непредельных ЖК как в капсульных, так и в мембранных гликополимерах.

Установили, что преобладающим моносахаридом в ЛПС и КПС данного штамма являлась D-Rha. В гликополимерах бактерий, выращенных в среде с малатом натрия, ее доля составляла 95-98%, вне зависимости от фазы роста. При культивировании данных бактерий в среде с фруктозой к 24 ч роста в составе препаратов ЛПС и КПС помимо Rha выявлялась D-глюкоза (D-Glc), причем ее содержание снижалось к пятым суткам культивирования с 38 до 4% в ЛПС и с 11 до 6% в КПС.

В ЯМР-спектрах ОПС_{ф24}, ОПС_{ф120}, ПС_{ф24}, ПС_{ф120}, выделенных из соответствующих гликанов, выявили все сигналы, присутствующие в вышеупомянутых ПС, а также дополнительные сигналы, интенсивность которых отличалась у разных препаратов и была максимально выражена в спектре ОПС_{ф24}. В аномальной области ¹H и ¹³C-ЯМР спектров ОПС_{ф24} помимо сигналов основной серии присутствовали сигналы меньшей интенсивности при 5.36 и 101.1 м.д., что свидетельствовало о наличии дополнительного ПС, предположительно гомополимера, содержащего Glc, выявленную в моносахаридном анализе (**Рисунок 6**).



Арабские цифры соответствуют протонам в моносахаридных остатках: G, Glc.

Рисунок 6 – Спектр ¹H-ЯМР препарата ОПС_{ф24} бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Сигналы ¹H и ¹³C этого ПС относили с использованием двумерных экспериментов ¹H/¹H COSY, TOCSY, ROESY и ¹H/¹³C HSQC (**Таблица 2**). Наличие корреляционных пиков от H-1 до H-6 в COSY и TOCSY спектрах в сочетании со значениями ЗН,Н КССВ протонов моносахаридных колец (Altona and Haasnoot, 1980) и химических сдвигов атомов углерода (Bock and Pedersen, 1983) указывало на то, что моносахариды в составе данного полимера имеют *глюко* конфигурацию и находятся в пиранозной форме. Относительно сильнопольное положение сигнала C-1 при 101.1 м.д. и сигнала C-5 при 72.6 м.д., соответственно, свидетельствовало о том, что остатки Glc имеют α конфигурацию гликозидного центра. Смещение химического сдвига сигнала C-3 Glc в слабопольную область к 81.6 м.д., по сравнению с его положением при 73.8 м.д. в незамещенном моносахариде (Bock and Pedersen, 1983), свидетельствовало о том, что Glc является 3-замещенной. Наличие H-1/H-3 кросс пиков при 5.36/3.63 м.д. в спектрах ROESY также указывало на замещение остатков Glc в положении 3. Следовательно, дополнительный ПС в составе ЛПС_{ф24} представляет собой глюкан, состоящий из остатков 3-замещенной α -D-Glcp.

Таким образом, ОПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245, выращенных в среде с фруктозой, наряду с линейным D-рамнаном характеризуется наличием дополнительного гомоглюкана:

→3)- α -D-Glcp-(1→. На основании соотношения интегральных интенсивностей сигналов H-1 Glc и H-1 Rha¹ установили, что доля глюкана в ОПС_{ф24} составляла 25%, в ПС_{ф24} – 10%, а в ОПС_{ф120} и ПС_{ф120} – менее 5%.

Таблица 2 – Данные ¹H и ¹³C-спектров ЯМР ОПС_{ф24} *A. baldaniorum* Sp245 (δ , м.д.)

Моносахаридный остаток	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 (6a; 6b) C-6
→3)- α -D-Glcp-(1→	5.36 101.1	3.59 72.6	3.63 81.6	3.41 70.7	3.82 72.6	3.76; 3.86 61.9

Полученные данные позволяют заключить, что культивирование бактерий *A. baldaniorum* в среде с фруктозой уже на поздней экспоненциальной фазе роста вызывало синтез дополнительного полимера на основе D-Glc в ОПС_{ф24} и ПС_{ф24}. Убыль содержания Glc в ЛПС и КПС азоспирилл по мере увеличения продолжительности роста бактериальных культур в среде с фруктозой указывает на то, что подобные дополнительные полимеры могут выступать в качестве резервного источника углерода в условиях периодического культивирования.

3.2.2 Структура и свойства ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при культивировании в условиях температурного и солевого стрессов

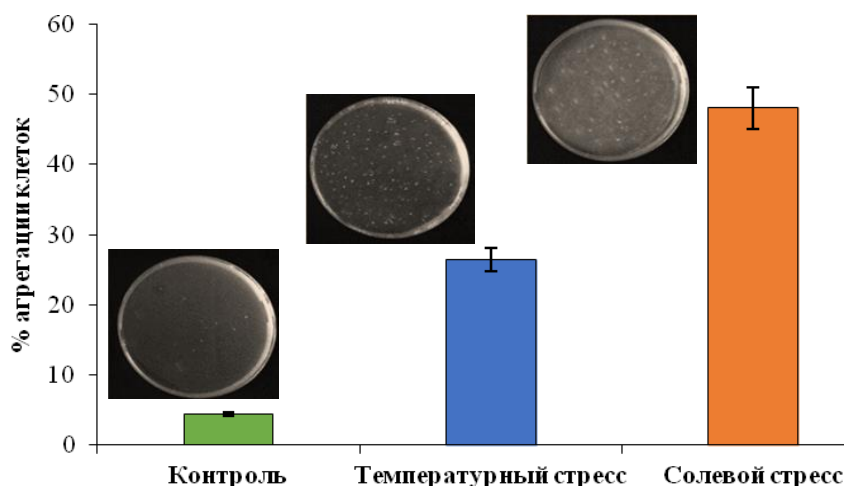
Первоначально подобрали температуру роста (42°C) и концентрацию NaCl (250 мМ) в питательной среде, которые позволили бы получить необходимое количество биологического материала и оценить воздействие стрессового фактора на ПС поверхности бактерий.

Выращивание бактериальной культуры *A. baldaniorum* Sp245 при 42°C и повышенном содержании NaCl в среде до 250 мМ сопровождалось агрегацией клеток, визуализируемой к 6-8 ч роста. Количественная оценка агрегации как в опытных, так и в контрольных условиях показала, что наибольшая агрегационная способность клеток проявлялась при солевом стрессе и составляла 48%. В меньшей степени агрегирование клеток было выражено при температурном стрессе (26%) (**Рисунок 7**).

С помощью теста солевой агрегации клеток штамма Sp245, выращенного в условиях температурного стресса, выявили снижение индекса гидрофобности клеток в два раза по сравнению с контрольным образцом. В случае солевого стресса наблюдалось увеличение данного показателя в полтора раза.

Получили препараты ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245, культивирование которых осуществлялось в стандартных и стрессовых условиях. Продукция опытных образцов ЭПС и КПС в расчете на сухую биомассу клеток возрастала в среднем на 28 и 13% относительно контроля. Максимальная выработка внеклеточных гликанов данным штаммом наблюдалась при солевом стрессе.

При температурном и солевом стрессах ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 претерпевали изменения в характере электрофоретической подвижности, а также в данных препаратах наблюдались модификации, связанные с увеличением доли углеводов, остатков фосфорной кислоты и непредельных ЖК.



Примечание. Доверительные интервалы приведены для надежности 95%.

Рисунок 7 – Количественная оценка агрегации бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в стандартных и стрессовых условиях

Для выявления влияния температурного и солевого стрессов на структуру углеводных компонентов препаратов ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 определили их моносахаридный состав (**Рисунок 8**). В препарате ЭПС бактерий, выращенных при 42°C, наблюдали увеличение содержания Glc на 8% относительно контроля. ЭПС бактерий, рост которых осуществляли в условиях засоленности, не имел существенных отличий от контрольного ЭПС, за исключением небольшого увеличения содержания фукозы (Fuc).

При температурном стрессе в КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 выявили возрастание доли Glc на 25% по сравнению с контролем, а также появление остатков Fuc (18%) и галактозы (Gal) (14%). При культивировании азоспирилл в среде с 250 мМ NaCl в КПС также наблюдали увеличение содержания Glc на 20%. В опытных образцах ЛПС обнаружили сходную с образцами ЭПС и КПС тенденцию накопления Glc: в случае температурного воздействия содержание данного моносахарида увеличилось на 12%, а при солевом стрессе – на 15%.

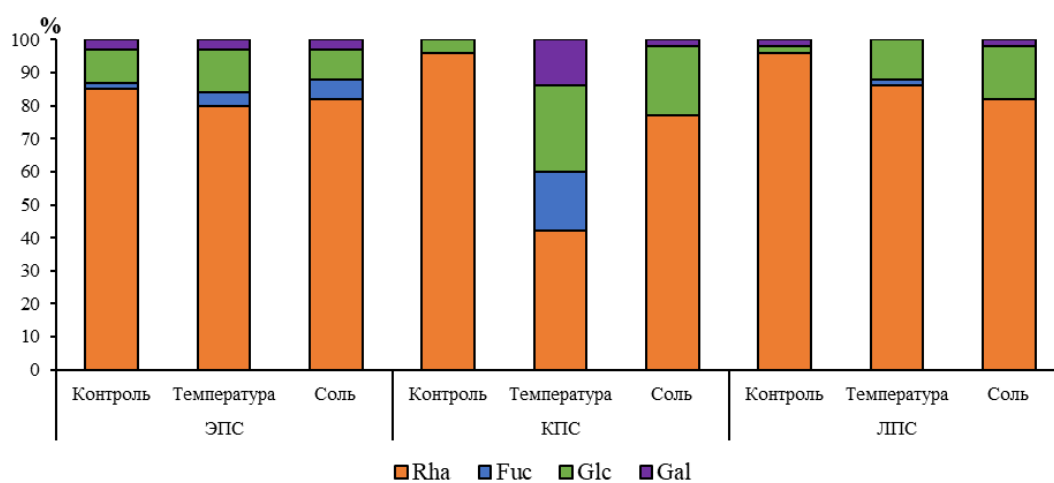


Рисунок 8 – Моносахаридный состав образцов ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при росте в стандартных и стрессовых условиях (в % от общей суммы площадей пиков ацетатов полиолов)

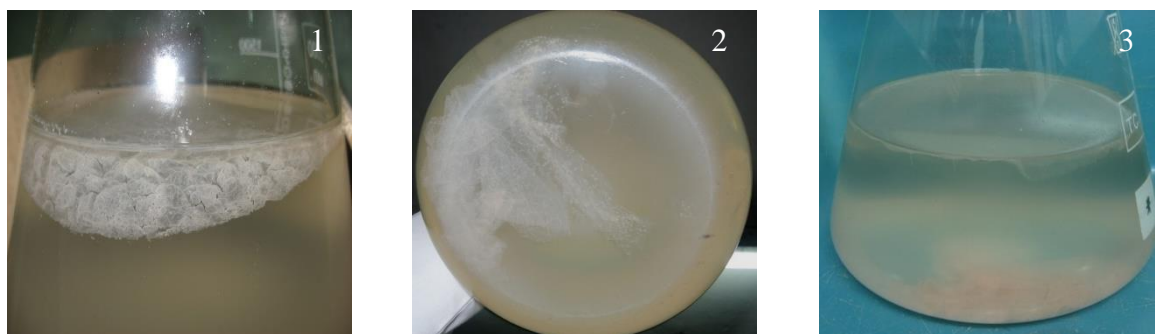
Таким образом, показали, что у бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при температурном и солевом стрессах увеличивается агрегация клеток, а также происходит накопление Glc в составе ЭПС, КПС и ЛПС. Хотя тенденция увеличения содержания Glc проявлялась как при повышении температуры, так и при возрастании концентрации NaCl в среде, данный эффект у бактерий *A. baldaniorum* Sp245 был выражен в разной степени.

3.3 Структурные особенности гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4

3.3.1 Характеристика биопленок и состава углеводных компонентов матрикса и поверхности клеток бактерий *A. baldaniorum* Sp245

Способность бактерий *A. baldaniorum* Sp245 к образованию в стационарных условиях биопленок анализировали при культивировании на синтетической среде с малатом натрия. К пятым суткам культивирования на поверхности питательной среды формировались хорошо выраженные биопленки (**Рисунок 9**). Увеличение продолжительности выращивания, либо механическое воздействие приводило к оседанию биопленок под собственной тяжестью и формированию новых на границе раздела фаз «воздух–жидкость». В используемых условиях также наблюдали рост планктонной культуры бактерий *A. baldaniorum* Sp245, однако его интенсивность заметно уступала таковой при постоянном перемешивании и аэрации.

Оценка динамики роста биопленок и планктонной культуры бактерий *A. baldaniorum* Sp245 при стационарном культивировании продемонстрировала, что достижение максимальной толщины биопленок – «зрелой формы» (82.4 ± 7.4 мкм) – наблюдается к пятым-шестым суткам выращивания. На седьмые сутки роста наблюдалось начало дисперсии биопленок, сопровождающееся образованием новой биопленки.

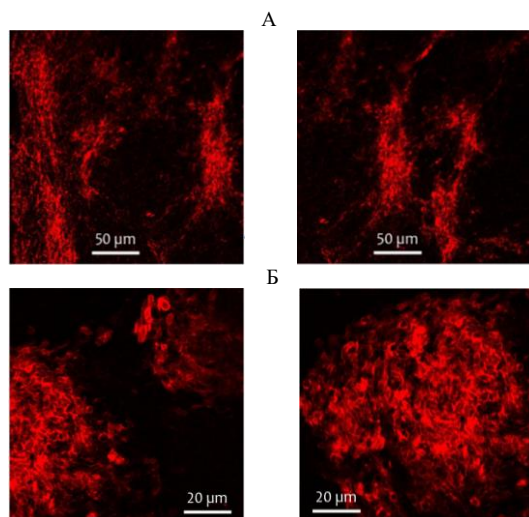


1 – зрелая биопленка, 2 – осевшая биопленка после механического воздействия, 3 – повторное образование биопленки.

Рисунок 9 – Биопленки бактерий *A. baldaniorum* Sp245

С помощью конфокальной микроскопии с флуоресцентным мечением показали, что антитела к белкам внешней мембраны бактерий *A. baldaniorum* Sp245, связывались не только с клетками, но и взаимодействовали с компонентами ВПМ, формируя ореол свечения флуоресцентного красителя по границам фрагмента биопленки (**Рисунок 10Б**). В случае использования антител к ЛПС окрашенные ТРИТЦ участки приходились на скопления клеток и отдельные компоненты ВПМ. При этом гликополимеры, с которыми связывались антитела к ЛПС, были распространены в матриксе неравномерно, образуя подобие «тяжей», которые

пронизывали биопленку и формировали фибриллярную структуру (**Рисунок 10А**). Полученные результаты указывают на преобладание в составе ВПМ белковых молекул, равномерно распределенных по площади биопленок, а также на наличие экстраклеточных форм ЛПС, особенности локализации которых свидетельствуют об их структурообразующей роли при формировании и функционировании биопленок.



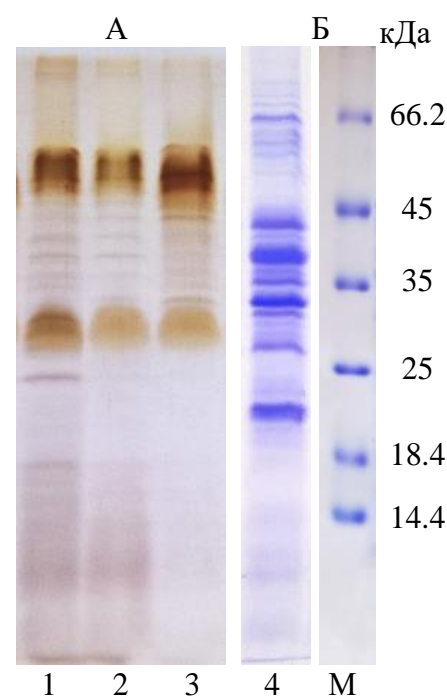
А – поликлональные антитела к ЛПС A. baldaniorum Sp245, меченные флуоресцентным красителем ТРИТЦ, Б – родоспецифические антитела к основным белкам поверхности A. baldaniorum Sp245, меченные ТРИТЦ.
Рисунок 10 – Результаты конфокальной микроскопии нативных биопленок бактерий *A. baldaniorum Sp245*

Из пятисуточных биопленок выделили ВПМ, выход которого составил 12.7% от массы сухих клеток. Из внешней мембраны клеток биопленок проэкстрагировали ЛПС, обозначенный как ЛПС_Б. Выход образца ЛПС_Б достигал 6.7% от массы высушенной клеточной биомассы.

По данным электрофореза (**Рисунок 11**) в составе ВПМ обнаружили углеводные и белковые компоненты в широком диапазоне молекулярных масс. После обработки ВПМ протеиназой К электрофоретический профиль препарата стал идентичен профилю ЛПС_Б и характеризовался присутствием S-форм ЛПС с различной длиной полисахаридной цепи и R-форм, лишенных ОПС.

Содержание белка в выделенном образце ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum Sp245* составляло не менее 70%. Выделенные из ВПМ в ходе протеиназной обработки гликаны содержали характеристические для ЛПС компоненты – углеводы, 3-гидроксикислоты, остатки Kdo и фосфорной кислоты. На основании полученных результатов углеводную фракцию ВПМ обозначили как ЛПС_М. В препаратах ЛПС_М и ЛПС_Б биопленок содержание углеводов, в том числе остатков Kdo, достигало в среднем 65.5% и остатков фосфорной кислоты – ~1.5%.

При анализе состава гидрофобных компонентов в ЛПС_Б выявили преобладание 3-гидроксикислот,



А – окрашивание на углеводы, Б – окрашивание на белки, М – белковые маркеры.

Рисунок 11 – Электрофореграммы нативного (Б) и депротенизированного (3) ВПМ и ЛПС биопленок (2) и планктонной культуры (1) бактерий *A. baldaniorum Sp245*

содержание которых достигало 64% от суммы идентифицированных ЖК. В ЛПС_М содержание этих кислот составляло приблизительно 15% от суммы обнаруженных ЖК, а доминирующей (65%) являлась непредельная кислота C18:1.

Анализ моносахаридного состава препаратов ЛПС_М и ЛПС_Б биопленок *A. baldaniorum* Sp245 обнаружил преобладание D-Rha, что ранее отмечалось для ЛПС планктонной культуры, выращенной в стандартных условиях (Fedonenko *et al.*, 2002), и согласовывалось с перекрестными реакциями с антителами к данному ЛПС.

Таким образом, впервые установили особенности образования биопленок бактериями эндофитного штамма *A. baldaniorum* Sp245, определили состав их ВПМ и охарактеризовали гликополимеры поверхности клеток и ВПМ.

3.3.2 Структура гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок бактерий *A. halopraeferens* Au4

Галотолерантные бактерии *A. halopraeferens* Au4, также, как и бактерии *A. baldaniorum* Sp245, образовывали биопленки на поверхности раздела фаз «воздух–жидкость» (Рисунок 12). Динамика роста планктонной и биопленочной форм двух штаммов была схожа, однако максимальная толщина зрелых биопленок штамма Au4 составляла 67.5 ± 5.1 мкм.



Рисунок 12 – Биопленки бактерий *A. halopraeferens* Au4

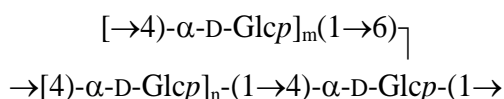
Из пятисуточной биомассы биопленок *A. halopraeferens* Au4 получили образцы ВПМ и ЛПС_Б, выходы которых составили 13.1 и 5.6%, соответственно, от массы высушенных клеток. Результаты анализа электрофоретической подвижности препаратов ВПМ выявили белковые полосы в широком диапазоне кажущихся молекулярных масс по аналогии с ВПМ биопленок эндофитного штамма Sp245. Химический анализ ЛПС_Б и выделенных из матрикса ЛПС_М показал наличие близких по содержанию углеводов (~60%), остатков Kdo (3.6%) и фосфорной кислоты (~5%). Состав и соотношение ЖК препаратов ЛПС_Б и ЛПС_М не имели существенных различий в сравнении с соответствующими образцами ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245.

В моносахаридном составе ЛПС_М и ЛПС_Б *A. halopraeferens* Au4 присутствовали Rha, Fuc, ксилоза (Xyl), Glc, а также метилированное производное Rha (Rha2OMe). Сходный состав был установлен для ОПС *A. halopraeferens* Au4 (Sigida *et al.*, 2014), однако содержание Glc в ЛПС_М и ЛПС_Б было в 1.5-2 раза выше.

Из препарата ЛПС_Б *A. halopraeferens* Au4 выделили две полисахаридные фракции ОПС_I и ОПС_{II}. Спектр ¹³C-ЯМР ОПС_I демонстрировал гетерогенность и содержал две серии сигналов разной интенсивности, что свидетельствовало о нерегулярности его структуры. В области аномеров присутствовали сигналы двух атомов углерода при 101.3 и 101.5 м.д., спектр также

содержал сигнал двух CH₂-ОН групп при 62.3 и 62.4 м.д. и сигналы восьми атомов углерода в диапазоне 71.2-79.2 м.д. Соответственно, в ¹H-ЯМР спектре ОПС_I присутствовал сигнал аномерных протонов при 5.40 м.д. и других протонов моносахаридного кольца в области 3.43-3.98 м.д.

Сигналы ¹H и ¹³C ЯМР спектров ОПС_I относили с применением двумерных экспериментов ЯМР: ¹H, ¹³C HSQC, ¹H,¹H COSY и ¹H,¹H ROESY (Таблица 3). Установили, что основная цепь ОПС_I состоит из остатков 4-замещенной α-D-Glcp, а боковыми заместителями являются остатки терминальной α-D-Glcp, нестехиометрически расположенные вдоль полимерной цепи, при этом позиции их присоединения оставались не выявленными. Для решения этой задачи ОПС_I применили метод метилирования, который выявил, что, помимо остатков 4-замещенной и терминальной Glc, в препарате в меньшем количестве присутствуют остатки 4,6-дизамещенной Glc. В связи с этим, ОПС_I оказался близок по структуре к крахмалу, а схематически его строение можно представить следующим образом:



В спектре ¹H-ЯМР ОПС_{II} также присутствовали сигналы разной интенсивности. В ¹H-ЯМР спектре содержались несколько сигналов аномерных протонов при 4.76-5.44 м.д., сигнал OMe группы при 3.43 м.д., группа сигналов CH₃ групп (H-6 Fuc и Rha) при 1.18-1.30 м.д. и других протонов моносахаридного кольца при 3.43-3.98 м.д. Сходный спектр ¹H-ЯМР имел ОПС планктонной культуры, структура которого была установлена ранее (Sigida *et al.*, 2016), что свидетельствовало о близости их строения.

В спектре ¹H-ЯМР ОПС_{II} присутствовали сигналы моносахаридов всех 4 типов повторяющихся звеньев, установленных ранее в составе ОПС, однако, их соотношение было иным. На основании отношения интенсивности аномерных протонов установили, что степень гликозилирования ОПС_{II} составляла ~25%, а степень метилирования – 45%. Стоит отметить, что ОПС планктонной культуры гликозилирован на 65%, а степень его метилирования также составляла 45%.

Таблица 3 – Данные ¹³C и ¹H-спектров ЯМР глюкана, выделенного из ЛПС_B *A. halopraeferens* Au4 (δ, м.д.)

Моносахаридный остаток	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6 (6a; 6b)
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
→4)-α-D-Glcp-(1→	5.40 101.3	3.65 73.2	3.63 74.9	3.98 79.2	3.85 73.0	3.79; 3.86 62.3
α-D-Glcp-(1→	5.40 101.5	3.60 73.5	3.70 74.7	3.43 71.2	3.75 74.4	3.79; 3.86 62.4

Таким образом, из наружной мембраны клеток биопленок *A. halopraeferens* Au4 выделили два ПС: один представляет собой ОПС, сходный по строению с ОПС планктонной культуры, а второй является глюканом, причем является ли данный полисахарид одной из цепей ОПС или продуцируется клетками в качестве резервного гликополимера, остается не выясненным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свободноживущие diaзотрофные ризобактерии рода *Azospirillum* вызывают интерес исследователей как удобная модель для изучения ассоциативного симбиоза, обладающего высоким потенциалом практического использования (Bashan and de-Bashan, 2010). Для формирования ассоциаций азоспирилл с растениями необходимо, чтобы микропартнеры эффективно противостояли негативным воздействиям среды. Одной из стратегий выживания азоспирилл в ризосфере является синтез специфических белковых и углеводных компонентов поверхности. К числу последних относятся ЭПС, КПС и ЛПС, участвующие в адсорбции бактерий на корнях растений и их колонизации. В связи с этим, варибельность состава и структуры данных гликанов является важным критерием успешной адаптации азоспирилл к изменяющимся условиям среды.

В настоящей работе исследовали структуру ЛПБК из КПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. ПС, выделенный из ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245, идентичен по структуре ОПС в составе ЛПС и содержит пентарамнановое повторяющееся звено. Впервые выделены, идентифицированы и охарактеризованы белки в составе ЛПБК *A. baldaniorum* Sp245 – порин OmaA и канал-образующий OmpW-подобный белок.

Изучили влияние условий культивирования (природа источника углерода в питательной среде и фаза роста), а также температурного и солевого стрессов на структурные особенности ЭПС, КПС и ЛПС бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Показали, что в экстраклеточных и мембранных гликополимерах при выращивании в среде с фруктозой, а также при температуре 42°C и при содержании NaCl в среде 250 мМ происходит индукция синтеза дополнительного гомоглюкана.

Провели характеристику гликанов поверхности клеток и матрикса биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Обнаружили, что ЛПС планктонной и биопленочной форм *A. baldaniorum* Sp245 сходны по составу и структуре. При формировании биопленок бактерии *A. halopraeferens* Au4 синтезируют в составе ЛПС О-полисахарид с меньшей степенью глюкозилирования, а также дополнительный гомоглюкан. В ВПМ биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 выявили белки в диапазоне молекулярных масс ~20-80 кДа, а также углеводную составляющую, представленную ЛПС. В случае галотолерантного штамма в ВПМ обнаружили глюкан, идентичный по структуре гомоглюкану в составе ЛПС биопленочной культуры.

Стратегия синтеза гомоглюканов бактериями рода *Azospirillum* при изменении условий существования установлена впервые. Такая защитная реакция азоспирилл вызывает интерес для дальнейших исследований, поскольку открывает перспективы получения оптимального симбиотического фенотипа данных бактерий, который бы позволял успешно адаптироваться к стрессовым факторам и продуктивно взаимодействовать с растениями.

Полученные результаты расширяют представление об адаптационных возможностях бактерий рода *Azospirillum* по отношению к неблагоприятным условиям среды, а также об особенностях образования биопленок. Учитывая, что азоспириллы используются в составе биоудобрений, данная работа поможет оптимизировать их внедрение на территории Российской Федерации, независимо от климатических зон и типа почв. Многие штаммы азоспирилл, вступающие в ассоциативные отношения с ценными зерновыми и кормовыми культурами, могут служить основой для создания универсальных микробных удобрений, применение которых станет возможно не только в пределах нашей страны, но и за рубежом.

ВЫВОДЫ

1. Структуры О-полисахарида и полисахарида, полученных из липополисахарида и липополисахарид-белкового комплекса *A. baldaniorum* Sp245, соответственно, являются идентичными. Впервые в составе липополисахарид-белкового комплекса капсулы бактерий *A. baldaniorum* Sp245 были обнаружены два белка – порин OpaA и канал-образующий OmpW-подобный белок.

2. Природа источника углерода в питательной среде и фаза роста культуры влияют на содержание углеводов и остатков фосфорной кислоты, а также на соотношение жирных кислот в составе капсульных полисахаридов и липополисахаридов бактерий *A. baldaniorum* Sp245. Аналогичные изменения экстраклеточных и мембранных гликополимеров исследуемого штамма были показаны при температурном и солевом стрессах.

3. Культивирование бактерий *A. baldaniorum* Sp245 в среде с фруктозой, а также в условиях температурного и солевого стрессов индуцирует синтез гомоглюкана в составе как экстраклеточных, так и мембранных гликополимеров.

4. Впервые охарактеризованы препараты липополисахаридов из сформированных биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4. Для планктонной и биопленочной культур *A. baldaniorum* Sp245 не выявили существенных отличий в составе и структуре липополисахаридов. Для липополисахаридов бактерий *A. halopraeferens* Au4 показан синтез дополнительного глюкана и снижение степени глюкозилирования О-полисахарида при переходе от планктонной формы к образованию биопленок.

5. Внеклеточные полимерные матриксы биопленок бактерий *A. baldaniorum* Sp245 и *A. halopraeferens* Au4 являются многокомпонентными и в их составе преобладают белковые молекулы в широком диапазоне молекулярных масс. Углеводная составляющая матриксов обоих штаммов представлена молекулами липополисахаридов, а в случае галотолерантного штамма содержит также гомоглюкан.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты диссертационного исследования могут быть использованы при отборе штаммов бактерий рода *Azospirillum* с оптимальным симбиотическим фенотипом. Совокупность сведений об особенностях структуры экстраклеточных и мембранных гликополимеров данных ризобактерий, в том числе наблюдаемых при изменении условий окружающей среды, может быть востребована для повышения эффективности их интродукции в почву с целью увеличения урожайности злаковых культур. Регуляция структуры и свойств гликополимеров поверхности азоспирилл может быть использована в технологии создания принципиально новых биоудобрений для широкого круга растений вне зависимости от погодных-климатических условий и состояния почв. Применение таких биопрепаратов позволит существенно снизить химическую нагрузку на агрогеннопреобразованные почвы и увеличить экономическую рентабельность при возделывании злаков без нанесения вреда окружающей среде.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science, Scopus и РИНЦ

1. Petrova, L.P. Plasmid gene for putative integral membrane protein affects formation of lipopolysaccharide and motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 / L.P. Petrova, **S.S. Yevstigneyeva**, Yu.A. Filip'echeva, A.V. Shelud'ko, G.L. Burygin, E.I. Katsy // *Folia Microbiol.* – 2020. – Vol. 65, No. 6. – P. 963-972. **IF=2.099, Q3**. DOI: 10.1007/s12223-020-00805-5.
2. Petrova, L.P. Plasmid gene AZOBR_p60126 impacts biosynthesis of lipopolysaccharide II and swarming motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 / L.P. Petrova, **S.S. Yevstigneyeva**, I.V. Borisov, A.V. Shelud'ko, G.L. Burygin, E.I. Katsy // *J. Basic Microbiol.* – 2020. – Vol. 60, No. 7. – P. 613-623. **IF=2.281, Q2**. DOI: 10.1002/jobm.201900635.
3. **Евстигнеева, С.С.** Оптимизация условий получения флокулирующих культур бактерий *Azospirillum brasilense* Sp7 и Sp245 и моносахаридный состав их гликополимеров / **С.С. Евстигнеева**, Д.А. Рыбальченко, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // *Известия УНЦ РАН.* – 2019. – №1. – С. 77-82. DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-1-77-82.
4. Шелудько, А.В. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 / А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьева, Е.М. Телешева, А.М. Буров, **С.С. Евстигнеева**, Г.Л. Бурыгин, Л.П. Петрова // *Микробиология.* – 2018. – Т. 87, №5. – С. 483-494. **IF=1.156, Q4**. DOI: 10.1134/S0026365618050166.
5. **Евстигнеева, С.С.** Структурные особенности капсульных и О-полисахаридов бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 при изменении условий культивирования / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // *Микробиология.* – 2016. – Т.85, №6. – С. 643-651. **IF=1.156, Q4**. DOI: 10.7868/S0026365616060094.
6. Халэпа, Я.В. Характеристика структурных особенностей липополисахарид-белковых комплексов капсулы бактерий *Azospirillum brasilense* SR80 и Sp245 при росте на агаризованной среде / Я.В. Халэпа, **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* – 2014. – Т. 14, №3. – С. 50-54.

Публикации в других журналах и изданиях

7. **Евстигнеева, С.С.** Бактериальный «социум» биопленок или особенности организации микробных сообществ ризосферы / **С.С. Евстигнеева**, Ю.П. Федоненко // «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой»: Материалы конференции / IX Всероссийская конференция молодых ученых, Саратов, 14-18 октября 2019 г. – Саратов: ООО «Издательский Центр Наука», 2019. – С. 27.
8. **Евстигнеева, С.С.** Матрикс биопленок бактерий рода *Azospirillum*: особенности выделения и характеристика основных компонентов / **С.С. Евстигнеева**, Ю.П. Федоненко, А.А. Широков // *Acta Naturae*, спецвыпуск: Сборник научных трудов, том 2 / II Объединенный научный форум: VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России, IX Российский симпозиум «Белки и пептиды», Сочи, Дагомыс, 1-6 октября 2019 г. – М: Издательство «Перо», 2019. – С. 279.
9. **Евстигнеева, С.С.** Выжить любой ценой: флокулы и биопленки как фактор резистентности почвенных бактерий / **С.С. Евстигнеева**, Ю.П. Федоненко // *Фундаментальная*

гликобиология [Электронный ресурс]: сб. материалов IV Всерос. конф., Киров, 23-28 сентября 2018 г. – Киров: Науч. изд-во ВятГУ, 2018. – С. 98-99.

10. **Евстигнеева, С.С.** Структурные особенности гликополимеров матрикса и поверхности клеток биопленок бактерий *Azospirillum halopraeferens* Au4 / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // Материалы международной научной конференции PLAMIC2018 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», Уфа, 13-17 июня 2018 г. / отв. ред. И.А. Тихонович, 2018. – С. 143.

11. **Евстигнеева, С.С.** Структура липополисахарид-белкового комплекса капсулы *Azospirillum brasilense* Sp245 – фактора формирования ассоциации с растениями / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, В.С. Гринёв // X Всероссийский конгресс молодых ученых-биологов «Симбиоз – 2017»: Сборник тезисов, Казань, 25-28 октября 2017 г. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2017. – С. 84-86.

12. **Евстигнеева, С.С.** Вариабельность состава и структуры экстраклеточных и мембранных гликополимеров бактерий *Azospirillum brasilense* при солевом и температурном стрессах / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой»: Материалы конференции / VIII Всероссийская конференция молодых ученых, Саратов, 26-30 сентября 2016 г. – Саратов: ООО «Ракурс», 2016. – С. 50.

13. **Евстигнеева, С.С.** Характеристика гликанов клеточной поверхности и матрикса биопленок ризосферных бактерий рода *Azospirillum* / **С.С. Евстигнеева**, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // Фундаментальная гликобиология: Материалы конференции / III Всероссийская конференция, Владивосток, 7-12 сентября 2016 г. – Владивосток: Мор. гос. ун-т, 2016. – С. 45.

14. **Евстигнеева, С.С.** Изменение состава и структуры экстраклеточных полисахаридов и гликополимеров поверхности ассоциативных ризобактерий *Azospirillum brasilense* при адаптации к температурному стрессу / **С.С. Евстигнеева**, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова // «Актуальные аспекты современной микробиологии»: X молодежная школа-конференция с международным участием, Москва, 27-30 октября 2015 г. – М.: МАКС, 2015. – С. 57-60.

15. **Евстигнеева, С.С.** Особенности состава и структуры гликополимеров поверхности и матрикса биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 / **С.С. Евстигнеева**, Я.В. Халэпа, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // VII Всероссийский с международным участием Конгресс молодых биологов «Симбиоз-Россия 2014», Екатеринбург, 6-11 октября 2014 г. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. – С. 179-181.

16. **Евстигнеева, С.С.** Состав и соотношение жирных кислот в липидных компонентах гликополимеров поверхности бактерий *Azospirillum brasilense* при варьировании условий культивирования / **С.С. Евстигнеева**, Ю.П. Федоненко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Фундаментальная гликобиология: Материалы конференции / II Всероссийская конференция, Саратов, 7-11 июля 2014 г. – Саратов: ООО «Ракурс», 2014. – С. 70.

17. **Yevstigneeva, S.S.** Fatty acid composition and ratio in the lipid components of the outer-membrane and capsular glycopolymers from *Azospirillum brasilense* bacteria at various times of culturing and nutrient-medium compositions / **S.S. Yevstigneeva**, E.N. Sigida, Yu.P. Fedonenko, S.A. Konnova, V.V. Ignatov // The proceedings of the International Interdisciplinary Conference “Adaptation Strategy of the Living Systems”, Novy Svet, Ukraine, 12-17 May 2014. – Kyiv: VS Martynyuk Publisher, 2014. – P. 58-59.