



УДК 547.917:579.22

СТРУКТУРА О-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОЛИСАХАРИДА И ЛИПИДА А ТИПОВОГО ШТАММА БАКТЕРИЙ *Azospirillum rugosum* DSM-19657

© 2020 г. Е. Н. Сигида^{*,#}, М. С. Кокоулин^{**}, П. С. Дмитренко^{**}, В. С. Гринёв^{*,***},
Ю. П. Федоненко^{*,***}, С. А. Коннова^{*,***}

^{*}Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН,
Россия, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13

^{**}Тихоокеанский институт биоорганической химии имени Г.Б. Елякова ДВО РАН,
Россия, 690022, Владивосток, Проспект 100 лет Владивостоку, 159

^{***}Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,
Россия, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

Поступила в редакцию 08.07.2019 г.

После доработки 28.07.2019 г.

Принята к публикации 16.08.2019 г.

Проведены структурные исследования липополисахарида типового штамма азотфиксирующих почвенных бактерий *Azospirillum rugosum*, выделенного из загрязненных нефтью почв. На основании данных химического анализа, 1D- и 2D- ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии установлено, что О-специфический полисахарид состоит из повторяющихся звеньев двух типов, идентичных обнаруженным ранее в О-специфическом полисахариде штамма *Azospirillum brasilense* Jm125A2. Структурный анализ липида А с применением ГЖХ и МАЛДИ-масс-спектрометрии выявил смесь пента-, тетра- и триацильных типов молекул. Первичными жирными кислотами в липиде А являются N-связанная 16:0(3-ОН)- и O-связанная 14:0(3-ОН). Микрогетерогенность в пределах каждого типа обусловлена природой вторичных жирных кислот (16:0, 18:1 или 19:0), ацилирующих 16:0(3-ОН)-кислоту дистального кольца GlcN.

Ключевые слова: *Azospirillum rugosum*, липополисахарид, О-специфический полисахарид, липид А, ЯМР-спектроскопия, МАЛДИ-масс-спектрометрия

DOI: 10.31857/S0132342320010133

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательные альфа-протеобактерии рода *Azospirillum* из семейства Rhodospirillaceae являются типичными представителями ризосферы диких и культивируемых злаков [1]. На сегодняшний день род *Azospirillum* включает 21 вид, большинство из которых способны увеличивать урожайность растений, оказывая множественное воздействие на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях [2]. Рост-стимулирующий потенциал азоспирилл реализуется посредством продукции фитогормонов, улучшения минерального питания, фиксации атмосферного азота, снижения биотических и абиотических стрессов, биоконтроля патогенов и других механизмов [3, 4].

Сокращения: ЛПС – липополисахарид; ЖК – жирные кислоты; МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; МС – масс-спектрометрия; ОПС – О-специфический полисахарид; ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (8452) 97-04-44; факс: +7 (8452) 97-04-03; эл. почта: si_elena@mail.ru).

В начальные этапы формирования растительно-микробных ассоциаций с участием азоспирилл вовлечены гликополимеры бактериальной поверхности – капсульные полисахариды и липополисахариды (ЛПС) [5]. Стимулирующий эффект, оказываемый азоспириллами на растения, является весомой причиной для изучения молекулярного механизма ассоциативного взаимодействия и требует детального изучения структуры ЛПС.

ЛПС состоит из трех химически, биологически и биосинтетически различающихся компонентов, ковалентно связанных друг с другом: липида А, корового олигосахарида и О-специфического полисахарида (ОПС). ОПС является варибельным доменом ЛПС; многообразие его возможных структур обусловлено природой, количеством, типом связей и конфигурацией моносахаридных остатков, образующих повторяющиеся звенья, а также наличием заместителей неуглеводной природы [6]. Липиду А, напротив, присуща общая консервативность строения в пределах бактериального рода при наличии мик-

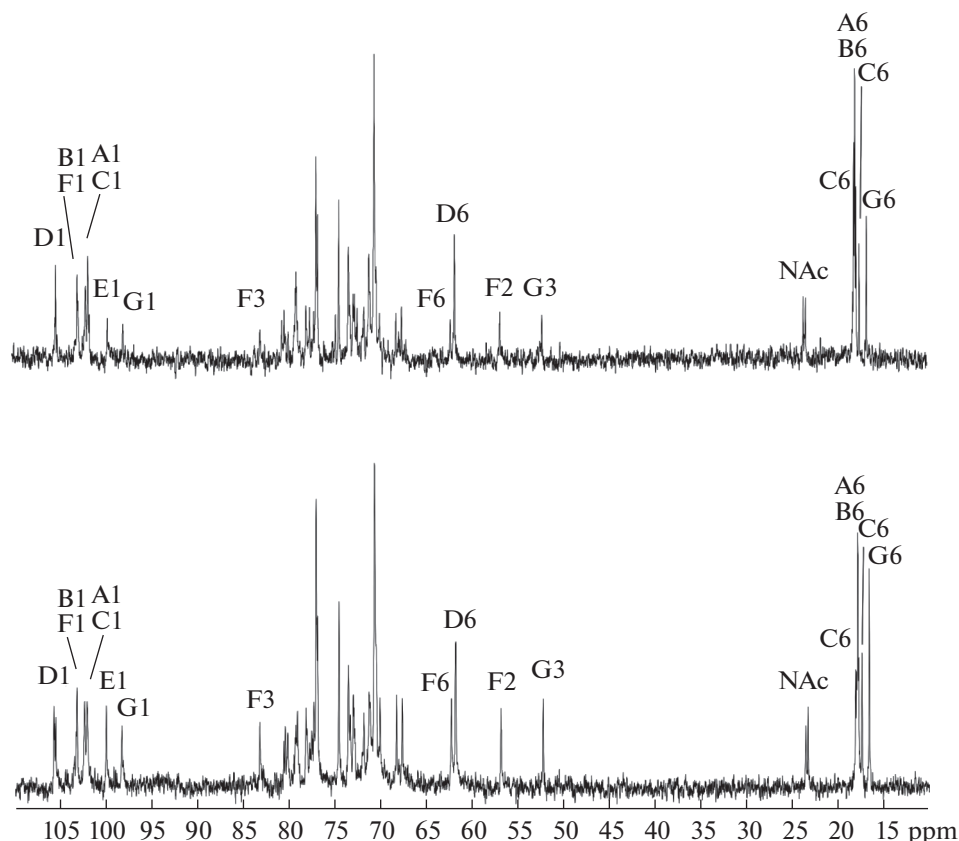


Рис. 1. ^{13}C -ЯМР-спектры ОПС *A. rugosum* DSM-19657 (вверху) и *A. brasilense* Jm125A2 (внизу). Арабские цифры относятся к атомам углерода в моносахаридных остатках, обозначенных в табл. 1 и в тексте.

рогетерогенности, обусловленной разнообразием остатков – вторичных – жирных кислот (ЖК), ацилирующих ЖК, связанные с сахаром, степенью ацилирования и фосфорилирования. Гетерогенность строения липида А может быть связана со многими факторами, в том числе адаптацией бактерий к изменяющимся условиям среды, степенью завершенности биосинтеза и частичной модификацией препарата во время выделения [7].

Считается, что многие фундаментальные свойства бактерий определяются условиями экологической ниши, в которой они обитают. Известно, что азоспириллы хорошо адаптируются к условиям существования, обладают высокой конкурентоспособностью и не имеют строгой специфичности к растению-хозяину [8]. Кроме того, в последнее время описаны “неризосферные” виды, способные заселять нехарактерные для азоспирилл ниши. Из отработанного дорожного покрытия выделен представитель нового вида *A. picis* [9], из сульфидного источника – *A. thiophilum* [10], из пресной воды – *A. griseum* [11], из ферментированных молочных продуктов – *A. ramosamyi* [12], из микробной топливной ячейки – *A. humicireducens* [13]. Культура *A. rugosum* была выделена из загрязненных нефтью почв [14]. Активность в утилизации нефти в качестве источни-

ка углерода и энергии, возрастающая в присутствии малата, одного из компонентов корневых экссудатов растений, была отмечена и для ряда ризосферных штаммов *A. brasilense* и *A. lipoferum* [15], что делает их перспективными агентами для инокуляции при фиторемедиации загрязненных нефтью почв.

В последние годы установлены структуры ОПС для 50 ризосферных штаммов *A. brasilense*, *A. lipoferum* [16], *A. halopraeferens* [17], *A. fermentarium* [18] и *A. dobereineriae* [19]. Данные о строении липида А азоспирилл в основном ограничены составом жирных кислот, а полная структура была опубликована для единственного штамма *A. lipoferum* SpBr17 [20].

В настоящей работе приводятся сведения о строении О-специфического полисахарида и липида А типового штамма ранее не изученной в этом отношении бактерии *A. rugosum* DSM-19657.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

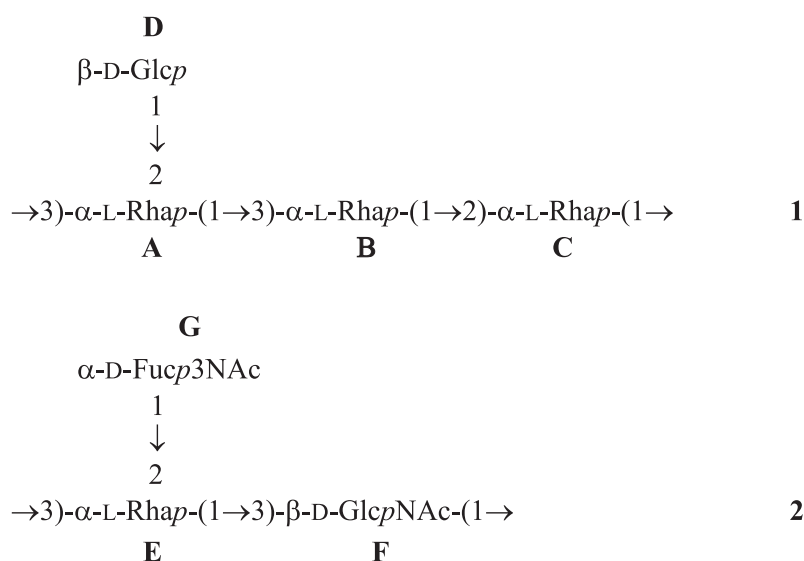
Из сухой биомассы бактерий *A. rugosum* DSM-19657 водно-фенольной экстракцией был выделен ЛПС, в результате деградации которого в мягких кислых условиях были получены ОПС и

липид А. Моносахаридный анализ ОПС в виде ацетатов полиолов методом ГЖХ выявил наличие Rha, Glc, GlcN и Fuc3N в соотношении ~4.9 : 2.4 : 1.4 : 1 (отклик детектора). Анализ продуктов полного гидролиза ОПС методом ГЖХ в виде ацелированных (*S*)-2-октигликозидов позволил установить D-конфигурацию Glc и GlcN и L-конфигурацию Rha.

¹³C-ЯМР-спектр ОПС (рис. 1) содержал сигналы различной интенсивности, свидетельствующие о нерегулярности строения полимера. В спектре присутствовали сигналы нескольких аномерных углеродов при δ 98.2–105.6 м.д., двух НОСН₂-групп остатков Glc и GlcNAc при δ 61.9 и 62.2 м.д., двух углеродов, связанных с азотом (С2 GlcNAc и С3 Fuc3NAc) при δ 52.3 и 56.8 м.д., нескольких СН₃-С-групп (отвечающих С6-атомам остатков Fuc3NAc и Rha) при δ 16.6 и 17.4–18.0 м.д., других углеродов моносахаридных колец при δ 67.6–83.1 м.д., двух N-ацетильных групп (СН₃ при δ 23.3 и 23.5 м.д., СО при δ 175.1 и 175.6 м.д.). Отсутствие сигналов в диапазоне δ 83–88 м.д., характеристичных для фуранозидов, свидетельствовало о том, что все моносахариды в со-

ставе ОПС являются пиранозидами. Соответственно, в ¹H-ЯМР-спектре ОПС присутствовали сигналы нескольких аномерных протонов при δ 4.76–5.37 м.д., ряда СН₃-С-групп (H6 Rha и Fuc3NAc) при δ 1.23–1.32 м.д., другие протоны моносахаридных колец при δ 3.43–4.50 м.д., двух N-ацетильных групп при δ 2.06 м.д. Учитывая схожесть моносахаридного состава ОПС *A. rugosum* с составом ОПС *A. brasilense* Jm125A2, установленным нами ранее [21], мы провели сравнение 1D- и 2D-ЯМР-спектров ОПС этих штаммов. В результате сравнения была выявлена практически полная идентичность мажорных серий сигналов в спектрах, что свидетельствовало об идентичности повторяющихся звеньев ОПС. На основании этих данных сигналы в спектрах ¹H- и ¹³C-ЯМР были отнесены с использованием ¹H,¹H COSY, TOCSY, ROESY, и ¹H,¹³C HSQC-экспериментов (табл. 1).

Таким образом, ОПС *A. rugosum* состоит из повторяющихся звеньев двух типов, идентичных по структуре *A. brasilense* Jm125A2:



В составе липида А методом ГЖХ метиловых эфиров жирных кислот (ЖК) были выявлены преобладающие 14:0 (3-ОН)-, 16:0 (3-ОН)- и 18:1-кислоты, на долю которых приходилось более 85% от суммы идентифицированных ЖК. Также были обнаружены 16:0- (11%), 16:1- (2%) и 19:0- (1%) кислоты. Природа О-связанных жирных кислот была установлена с применением мягкого щелочного гидролиза в 12.5% NH₄OH, в условиях которого эфирные ацильные и ацилоксиацильные группы менее устойчивы, по сравнению с ациламидами и ацилоксиациламидами [22]. В результате О-деацилирования наблюдалось

снижение содержания ЖК 14:0 (3-ОН) по отношению к другим кислотам, что свидетельствовало о эфирном типе связи этой первичной кислоты, а вторичные кислоты ацилируют амидосвязанную ЖК 16:0 (3-ОН). Методом ГЖХ ацелированных метилгликозидов в составе липида А были идентифицированы GlcN и GalA в соотношении ~2 : 1. Полученные данные указывали на сходство строения липида А *A. rugosum* и *A. lipoferum* SpBr17 [20], для последнего продемонстрировано наличие трисахаридного остова следующей структуры: GlcpN(1→6)GlcN(1↔1)GalpA, в котором оба остатка GlcpN ацилированы кислотой 16:0 (3-ОН) в

Таблица 1. Данные ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров ОПС *A. rugosum* (δ , м.д.)

Моносахаридный остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6 (a; b)	NAc
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
Повторяющееся звено 1							
$\rightarrow 2,3$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow (A)	5.37 102.4	4.20 80.5	4.02 78.0	3.66 73.6	3.88 70.6	1.31 17.8	
$\rightarrow 3$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow (B)	4.97 103.3	4.17 71.3	3.86 79.3	3.57 72.8	3.75 70.7	1.27 17.8	
$\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow (C)	5.22 102.1	4.08 79.3	3.91 71.5	3.50 73.7	3.79 70.8	1.32 18.0	
β -D-Glcp-(1 \rightarrow (D)	4.58 105.6	3.35 74.5	3.50 76.9	3.43 70.7	3.43 77.1	3.74, 3.86 61.9	
Повторяющееся звено 2							
$\rightarrow 2,3$)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow (E)	4.89 99.8	3.98 77.2	3.96 78.1	3.66 72.9	3.99 70.7	1.25 17.4	
$\rightarrow 3$)- β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow (F)	4.79 103.2	3.82 56.8	3.62 83.1	3.48 70.1	3.43 77.2	3.78, 3.94 62.2	2.06 23.3, 175.1
α -D-Fucp3NAc-(1 \rightarrow (G)	4.76 98.2	3.77 67.7	4.15 52.3	3.74 71.8	4.50 68.3	1.23 16.6	2.06 23.5, 175.5

положении 2 и кислотой 14:0 (3-ОН) в положениях 3 и 3', а остатки вторичных кислот этерифицируют первичную ЖК 16:0 (3-ОН) в положении 2'. Учитывая консервативность строения липида А в пределах бактериального рода, мы приняли, что сахарный остов липида А *A. rugosum* идентичен таковому *A. lipoferum*.

МАЛДИ-масс-спектр отрицательных ионов липида А, записанный в режиме рефлектрона, содержал несколько групп сигналов депротонированных молекул $[M - H]^-$ в диапазоне m/z 1023.7–1756.1, отличающихся природой и количеством остатков жирных кислот (рис. 2). В спектре присутствовали три обособленные группы пиков с наиболее интенсивными сигналами в каждой группе при m/z 1287.9, 1514.0 и 1740.1 (рис. 3), которые соответствовали три-, тетра- и пентаацильным типам молекул, содержащих остаток GalA и два остатка GlcN, ацилированных кислотами 16:0 (3-ОН), 14:0 (3-ОН) и 18:1 (табл. 2). Разница в массах 26 и 16 Да между сигналами в группах была обусловлена различной длиной вторичных жирных кислот и соответствовала наличию идентифицированных ГЖХ-анализом остатков насыщенных кислот 16:0 и 19:0 вместо ненасыщенной 18:1 (табл. 2). Разница между наиболее интенсивными сигналами пента-, тетра- и триацильных типов составляла 226 Да, что соответствовало одному остатку первичной кислоты 14:0 (3ОН). Сигнал при m/z 1023.7, отличающийся на 264 Да от наиболее интенсивного сигнала триацильного

липид А, соответствовал диацильному типу, несущему только остатки 16:0 (3-ОН) и лишенному остатка вторичной кислоты 18:1. Отсутствие в спектре сигналов с разницей 80 Да свидетельствовало об отсутствии фосфорилирования липида А.

МАЛДИ-масс-спектр положительных ионов липида А, записанный в режиме рефлектрона, содержал соответствующие сигналы натриевых аддуктов $[M + Na]^+$ и $[M - H + 2Na]^+$ для три-, тетра- и пентаацильных типов липида А в диапазоне m/z 1285.8–1802.2 (рис. 2, табл. 2).

Для подтверждения строения липида А и доказательства положения вторичных кислот были записаны МС/МС-спектры наиболее интенсивных сигналов в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов. Спектры второго порядка $[M - H]$ -иона с m/z 1514.0 (рис. 3) подтверждали предполагаемое строение липида А и содержали сигналы осколочных ионов, указывающие на последовательное элиминирование остатков 14:0(3-ОН)- и 18:1-ЖК. Отщепление вторичной кислоты 18:1 происходило в виде нейтральной молекулы, так как в спектре присутствовали только сигналы с характеристичной разницей масс 282 Да, но не наблюдались таковых, возникающих в ходе отщепления кетена и альдегида с разницами масс 264 и 222 Да, соответственно [23].

Элиминирование остатка ЖК 14:0(3-ОН) происходило различными путями, о чем свидетельствовало присутствие в спектре сигналов с разни-

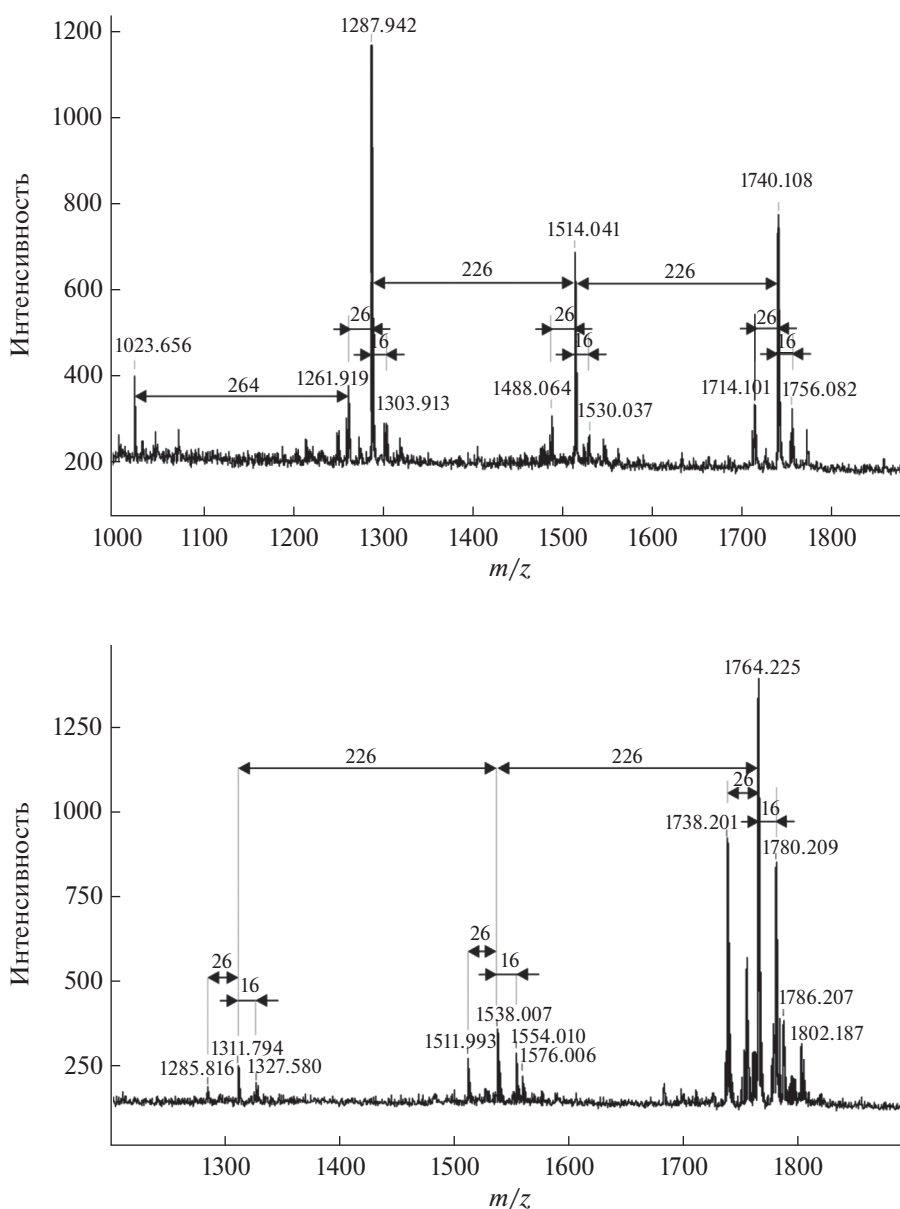


Рис. 2. МАЛДИ-масс-спектры липида *A. rugosum*, записанные в режиме детектирования отрицательных (вверху) и положительных (внизу) ионов.

цей 244, 226 и 184 Да. Максимальная разница масс 244 Да соответствовала отщеплению кислоты в виде нейтральной молекулы, отличие в 226 Да отвечало потере кетена, а 184 Да – альдегида, протекающему через перегруппировку МакЛафферти. Хотя последний тип фрагментации наиболее часто упоминается для *N*-связанных ЖК [24, 25], он отмечен и для ЖК-остатков, связанных сложной эфирной связью [26].

В средней области МС/МС-спектра $[M - H]^-$ -иона с m/z 1514.0 наблюдались сигналы при m/z 987.8, 1005.6 и 1047.7 (рис. 3), соответствующие отщеплению одного ацильного остатка 18:1 и од-

ного остатка 14:0(3-ОН) от родительского иона $-(282 + 244)$, $-(282 + 226)$, $-(282 + 184)$ Да, соответственно). Образование промежуточного продукта фрагментации с m/z 742.3 происходило в результате потери родительским ионом с m/z 1514.0 остатка 18:1 в виде нейтральной молекулы (-282 Да) с образованием осколка с m/z 1232.0 и его последующей диссоциации по пути 0_2A_2 (здесь и далее используется номенклатура фрагментации углеводов Домон и Каstellо [27]). Диацильный фрагмент с m/z 742.3 (рис. 3) в ходе дальнейшего расщепления теряет остаток 14:0(3-ОН) в виде

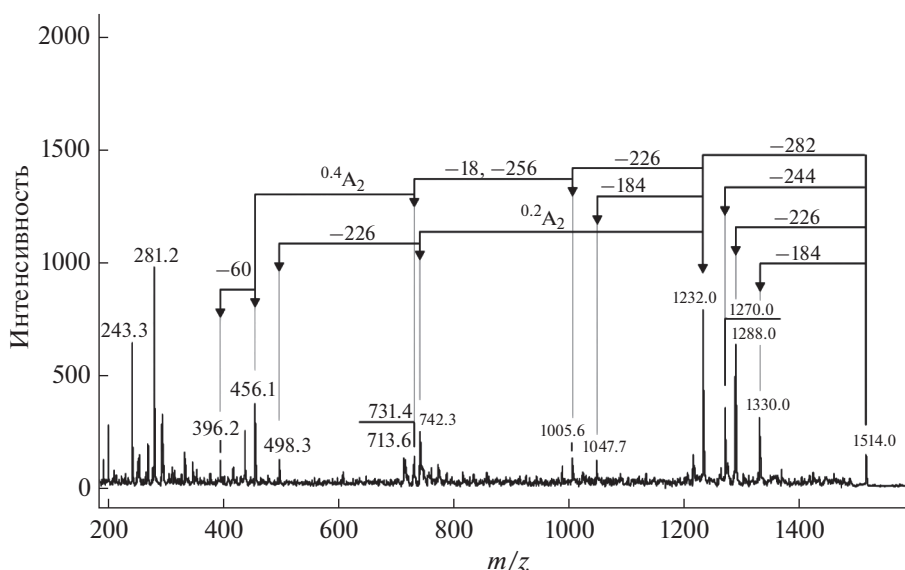


Рис. 3. МАЛДИ-МС/МС иона с m/z 1514.0 липида *A. rugosum*.

нейтральной ЖК (-244 Да) с образованием иона при m/z 498.3.

Последовательное отщепление остатка *N*-связанной ЖК 16:0(3-ОН) в виде кетена и воды от осколка с m/z 1005.6 приводило к образованию фрагмента с m/z 731.7. В результате дегидратации последнего происходило образование иона при m/z 713.7, а его фрагментация по пути $^{0.4}A_2$ приводила к возникновению осколка с m/z 456.2, отщепление гликольальдегида (-60 Да) от которого, предположительно, приводило к образованию иона, детектируемого при m/z 396.2. В области низкомолекулярных продуктов МС/МС-спектра также присутствовали ионы $[M - H]^-$ депротонированных молекул 14:0(3-ОН)- и 18:1-ЖК при m/z 243.3 и 281.2 соответственно.

Предполагаемые структуры и пути фрагментации $[M - H]^-$ -иона с m/z 1514.1 липида *A. rugosum* в МС/МС-спектрах приведены на рис. 4. МС/МС-спектр иона $[M - H]^-$ при m/z 1287.9 содержал характеристичные осколки при m/z 1005.6, 731.7, 456.2, образование которых происходило по аналогии с приведенной схемой.

Таким образом, были отнесены наиболее интенсивные сигналы в МС/МС-спектре $[M - H]^-$ -ионов. Следует отметить, что представленная на рисунке схема фрагментации $[M - H]^-$ -иона тетраацильного липида *A* при m/z 1514.0, в котором 14:0(3-ОН) находится в положении 3 проксимального остатка GlcN будет также справедлива и для липида *A*, в котором ЖК 14:0(3-ОН) замещает положение 3 дистального кольца GlcN. В то же время, о положении вторичной кислоты 18:1, ацилирующей 16:0(3-ОН) дистального звена GlcN, однозначно свидетельствовало наличие

иона $[^{0.4}A_2 - H]^-$ при m/z 456.2, поскольку фрагментация альтернативного по структуре иона, в котором ЖК 18:1 связана с 16:0(3-ОН)-кислотой проксимального GlcN, не приводила бы к образованию осколков, наблюдаемых в МС/МС-спектрах.

МС/МС-спектр иона $[M + Na]^+$ при m/z 1738.2 (рис. 5), соответствующего пентаацильному типу липида *A*, несущего по два остатка 14:0(3-ОН) и 16:0(3-ОН), а также один остаток 16:0, содержал характеристичные сигналы осколков, образующихся в результате последовательного отщепления GalA по путям C_2 и B_2 [27] с разницей масс 176 и 194 Да соответственно, остатка 14:0(3-ОН) в виде кислоты или кетена (-244 или -226 Да), остатка 16:0 (-256 Да) и фрагмента 16:0(3-ОН) в виде альдегида (-212 Да) в диапазоне m/z 605.0–1562.1. Серия наиболее интенсивных сигналов осколочных ионов, получающихся в ходе данного пути фрагментации, присутствовали в рассматриваемом спектре в диапазоне m/z 1073.5–1562.1 и соответствовали потере одного, двух или трех вышеуказанных фрагментов. Менее интенсивные сигналы $[M + Na]^+$ при m/z 817.4, 831.2 и 861.3 соответствовали отщеплению четырех фрагментов, а ион при m/z 605.0 отвечал элиминированию GalA, двух остатков 14:0(3-ОН), а также по одному остатку 16:0(3-ОН) и 16:0 от родительского иона.

В средней области МС/МС-спектра присутствовали интенсивные сигналы осколка $[^{0.4}A_2 + Na]^+$ при m/z 962.4, дальнейшая фрагментация которого сопровождалась последовательным элиминированием остатков 16:0 и 14:0(3-ОН) с образованием осколка с m/z 461.8. МС/МС-спектр также содержал менее интенсивный сигнал иона при

Таблица 2. Результаты масс-спектрометрии и предполагаемый состав жирных кислот липида А *A. rugosum*

$[M - H]^-$ эксп. (Да)	$[M - H]^-$ расч. (Да)	$[M + Na]^+$ эксп. (Да)	$[M + Na]^+$ расч. (Да)	$[M - H + 2Na]^+$ эксп. (Да)	$[M - H + 2Na]^+$ расч. (Да)	Состав ЖК
Триацильные типы						
1261.919	1261.8518	1285.816	1285.8483	Н.о.	1307.8303	2 × 16:0 (3ОН) 1 × 16:0
1287.942	1287.8675	1311.794	1311.8640	Н.о.	1333.8459	2 × 16:0 (3ОН) 1 × 18:1
1303.913	1303.88988	1327.850	1327.8953	Н.о.	1349.8772	2 × 16:0 (3ОН) 1 × 19:0
Тетраацильные типы						
1488.064	1488.0451	1511.993	1512.0416	Н.о.	1534.0235	2 × 16:0 (3ОН) 1 × 14:0 (3ОН) 1 × 16:0
1514.041	1514.0607	1538.007	1538.0572	1559.987	1560.0392	2 × 16:0 (3ОН) 1 × 14:0 (3ОН) 1 × 18:1
1530.037	1530.0920	1554.010	1554.0885	1576.006	1577.1080	2 × 16:0 (3ОН) 1 × 14:0 (3ОН) 1 × 19:0
Пентаацильные типы						
1714.101	1714.2384	1738.201	1738.2349	1760.199	1761.2246	2 × 16:0 (3ОН) 2 × 14:0 (3ОН) 1 × 16:0
1740.108	1740.2540	1764.225	1764.2505	1786.207	1787.2403	2 × 16:0 (3ОН) 2 × 14:0 (3ОН) 1 × 18:1
1756.082	1756.2853	1780.209	1780.2818	1802.187	1803.2716	2 × 16:0 (3ОН) 2 × 14:0 (3ОН) 1 × 19:0

Примечание. Н.о. – не обнаружено.

m/z 902.5, соответствующего продукту B_1 фрагментации по гликозидной связи. В результате отрыва от этого фрагмента остатков 14:0(3-ОН) (–226 и –244 Да) и 16:0 (–256 Да) наблюдалось образование ионов $[M + Na]^+$ при m/z 646.2, 658.2 и 676.2 соответственно (рис. 6).

На основании комплексного анализа химического состава и МАЛДИ-масс-спектров была установлена структура липида А *A. rugosum* (рис. 7), который представляет собой смесь молекул пента-, тетра- и триацильных типов, отличающихся друг от друга количеством остатков первичной О-связанной 14:0(3-ОН). Микрогетерогенность в пределах каждого из типов липида А с разной степенью ацилирования, обусловлена природой вторичных жирных кислот, ацилирующих остаток

О-связанной 16:0(3-ОН) кольца дистального GlcN. Анализ масс-спектров второго порядка при установлении структуры липида А *A. rugosum* продемонстрировал распределение вторичных жирных кислот, аналогичное таковому для *A. lipoferum* SpBr17, предложенному ранее на основе данных масс-спектрометрии первого порядка. Отличительной особенностью липида А *A. rugosum* является присутствие остатков вторичной ЖК 19:0, не идентифицированной в липиде А штамма SpBr17.

Таким образом, на основании данных химического анализа, спектроскопии ЯМР и МАЛДИ-масс-спектрометрии для типового штамма нового вида бактерий *A. rugosum* было установлено сходство строения ОПС и липида А с таковыми компонентами изученных ранее видов *A. brasiliense* и *A. lipoferum*. Межвидовая распространенность близких

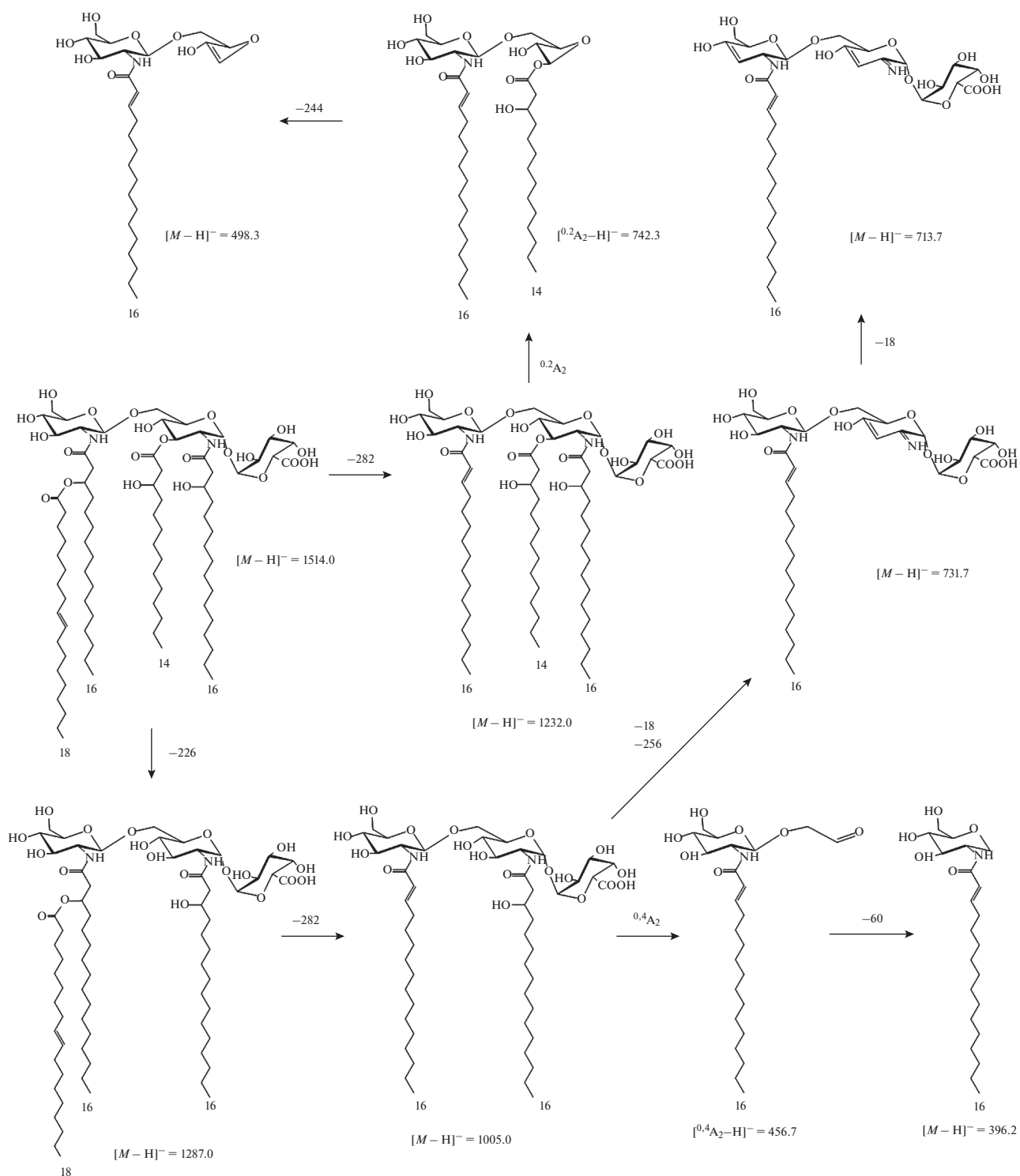


Рис. 4. Предполагаемые структуры и пути фрагментации $[M-H]^-$ -иона липида А с m/z 1514.0. Структуры изображены в виде нейтральных молекул.

по строению повторяющихся звеньев ОПС продемонстрирована ранее и для других представителей рода *Azospirillum* [15] и может свидетельствовать об отсутствии видовой приуроченности в отношении

структуры этих традиционно переменных компонентов ЛПС, которая, скорее всего, определяется особенностями экологической ниши обитания. Сходство строения липида *A. rugosum* и *A. lipoferum*

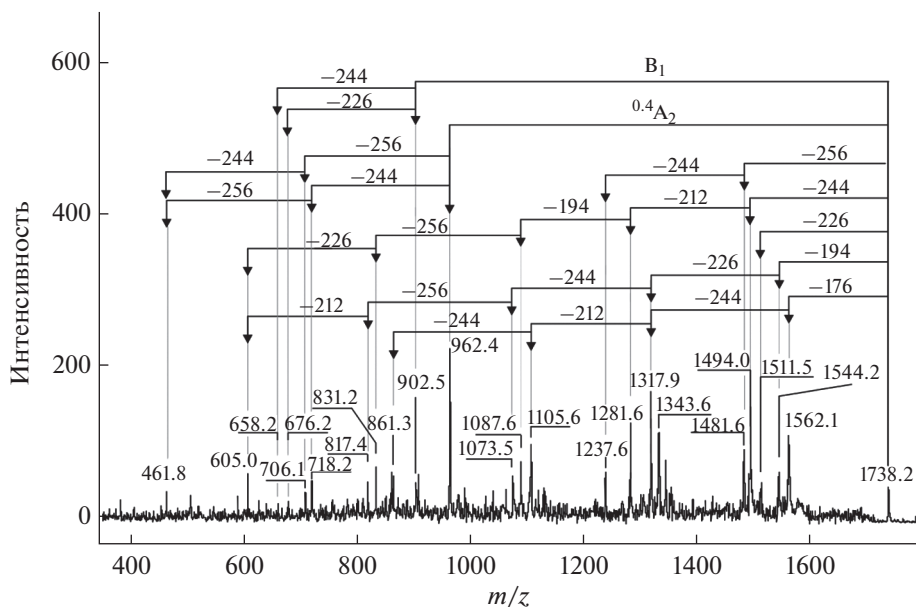


Рис. 5. МАЛДИ-МС/МС иона при m/z 1738.2 липида А *A. rugosum*.

позволяет предположить наличие близкородственных структур у других представителей данного рода.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование бактерий. Штамм *Azospirillum rugosum* DSM-19657 (IBPPM 629) предоставлен Коллекцией ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (г. Саратов). Культивирование бактерий проводили в жидкой малатно-солевой среде с витаминами [28] до окончания экспоненциальной фазы роста при температуре 30°C и перемешивании на вибростенде. Клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 0.15 М растворе NaCl и смывали с поверхности капсульный материал механическим перемешиванием в течение 5 сут с ежедневной сменой отмывающего раствора.

Выделение ЛПС, ОПС и липида А. ЛПС выделяли из высушенных ацетоном бескапсульных клеток горячим 45% водным раствором фенола без разделения слоев [29]. Примеси белков осаждали из раствора ЛПС добавлением 40% CCl_3CO_2H до конечного значения pH 2.7. Дегградацию ЛПС проводили 2% CH_3CO_2H при 100°C в течение 4 ч. Осадок липида А отделяли центрифугированием, промывали водой и трижды обрабатывали смесью $CHCl_3 : CH_3OH : H_2O$ (10 : 10 : 9, v/v) [30]. Супернатант, содержащий ОПС, разделяли гель-хроматографией на колонке с Toyopearl TSK HW-50 (Toyosoda, Япония) в 1% AcOH, контролируя элюцию с помощью дифференциального проточного рефрактометра Кнауер (Германия). Фракцию высоко-

комолекулярного О-специфического полисахарида концентрировали и лиофилизовали.

О-Дезацелирование ЛПС проводили в 12.5% NH_4OH при 37°C в течение 16 ч. Модифицированный ЛПС выделяли гель-фильтрацией на колонке с Toyopearl TSK HW-40 (Toyosoda, Япония) в 1% AcOH.

Моносахаридный анализ. Анализ моносахаридного состава и абсолютных конфигураций сахаров проводили методом ГЖХ ацетатов полиолов [31], ацелированных метилгликозидов и ацелированных 2-(S)-октилгликозидов [32] на хроматографе Hewlett-Packard 7820A с капиллярной колонкой HP-5 (Hewlett-Packard, США). Градиент температуры от 160°C (1 мин) до 290°C, скорость нагрева 7°C/мин.

Состав жирных кислот. Состав жирных кислот ЛПС в виде метиловых эфиров жирных кислот определяли с помощью ГЖХ на хроматографе GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабженном колонкой DB-5 (Agilent, США). Метилирование выполняли методом, описанным в работе [33].

ЯМР-спектроскопия. Спектры ЯМР записывали на спектрометре DRX-700 ("Bruker", Германия) в растворе 99.96% D_2O при 30°C (внутренний стандарт – ацетон, δ_C 31.45, и 3-триметилсилилпропанат- d_4 , δ_H 0.0. Образцы предварительно лиофилизовали дважды из 99.9% D_2O . Двумерные спектры записывали с использованием стандартного математического обеспечения (компания "Bruker", Германия); для сбора и обработки данных использовали программу TOPSPIN 2.1. В экспериментах TOCSY и NOESY время смешивания составляло 150 и 200 мс соответственно.

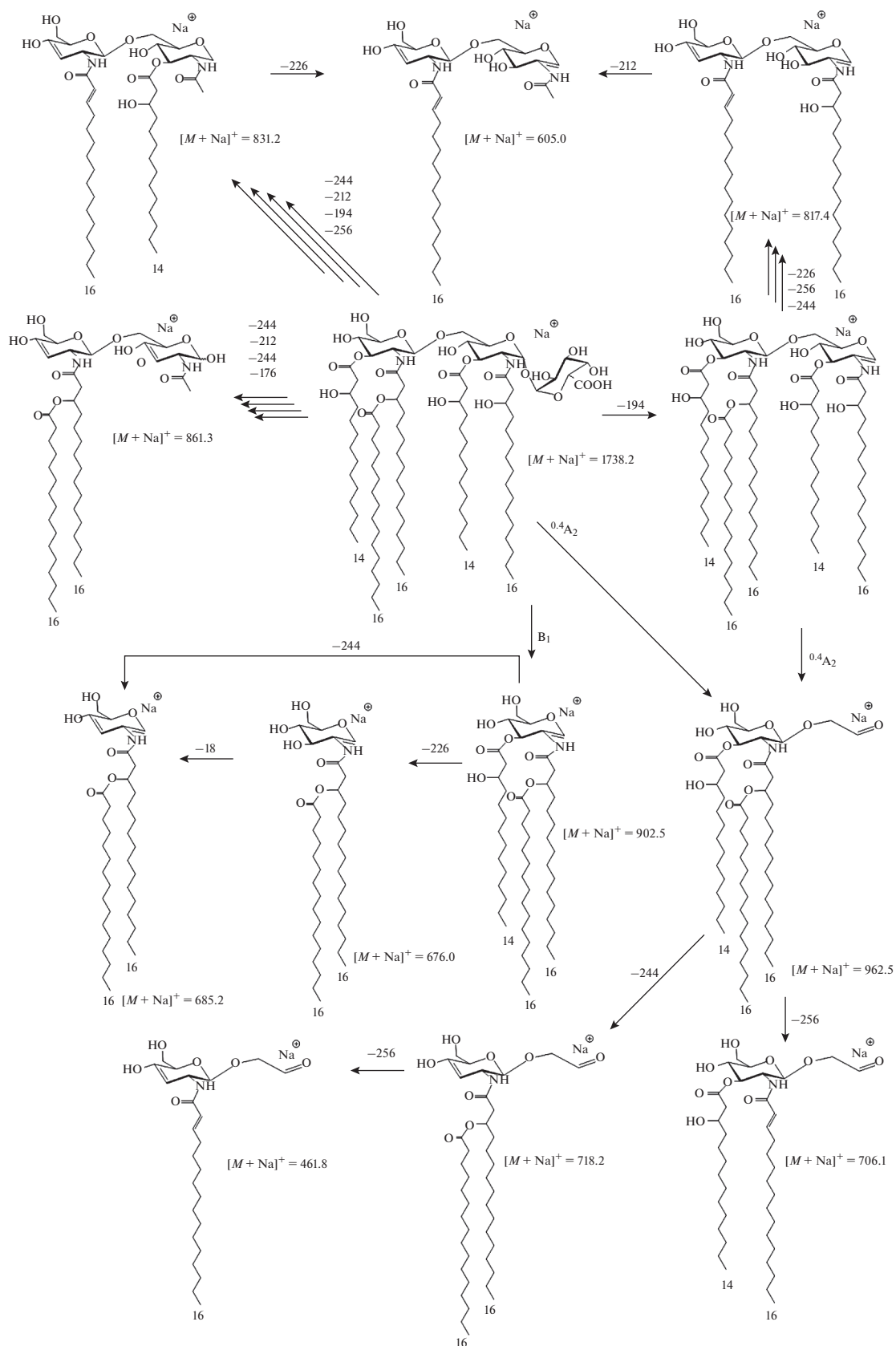


Рис. 6. Предполагаемые структуры и пути фрагментации $[M + Na]^+$ -иона при m/z 1738.2. Структуры изображены в виде натриевых аддуктов нейтральных молекул.

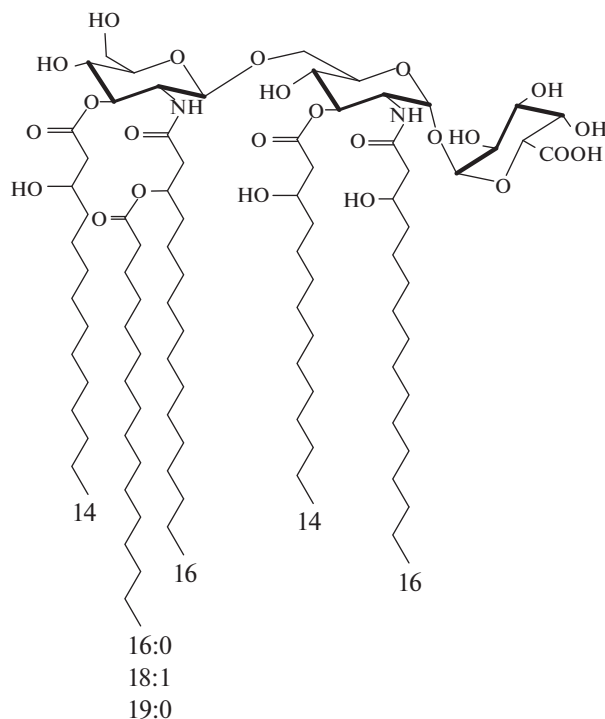


Рис. 7. Структура липида А *A. rugosum*.

МАЛДИ-масс-спектрометрия. К 1 мкл раствора липида А (1 мг/мл) добавляли 3 мкл раствора 2,5-дигидроксиацетофенона (10 мг/мл, $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O}$, 1 : 1 по объему), 1 мкл полученной смеси точно наносили на стандартные планшеты для МАЛДИ и высушивали на воздухе. Масс-спектрометрию осуществляли на время-пролетном МАЛДИ-масс-спектрометре Autoflex speed компании “Bruker Daltonics” (Германия), снабженном азотным лазером (337 нм), в режиме рефлектрона с использованием программного обеспечения FlexControl (версия 3.4; Bruker Daltonics). Спектры записывали в режиме детектирования положительных и отрицательных ионов. МС/МС-спектры записывали в режиме диссоциации, индуцированной соударениями (CID). Для внешней калибровки масс использовали смесь сульфатированных олигосахаридов [34]. Обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения Flexanalysis (версия 3.4; Bruker Daltonics). МС-спектры получали аккумуляцией 1500 выстрелов лазера, МС/МС-спектры – 6000–7000 выстрелов при минимальной энергии лазера, требующейся для ионизации образца.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования “Симбиоз” при ИБФРМ РАН за проведение ГЖХ.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследования поддержаны грантом Российского научного фонда (проект 18-74-00060).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steenhoudt O., Vanderleyden J. // FEMS Microbiol. Rev. 2000. V. 24. P. 487–506.
2. Bashan Y., de-Bashan L.E. // Adv. Agron. 2010. V. 108. P. 77–136.
3. Fukami J., Cerezini P., Hungria M. // AMB Express. 2018. V. 8. P. 73.
4. Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y. // FEMS Microbiol. Lett. 2012. V. 326. P. 99–108.
5. Skvortsov I.M., Ignatov V.V. // FEMS Microbiol. Lett. 1998. V. 165. P. 223–229.
6. Knirel Y.A. // Bacterial Lipopolysaccharides / Eds. Knirel Y.A., Valvano M.A. Wien: SpringerWien-NewYork, 2011. P. 41–115.
7. Molinaro A., Holst O., Di Lorenzo F., Callaghan M., Nurisso A., D’Errico G., Zamyatina A., Peri F., Berisio R., Jerala R., Jiménez-Barbero J., Silipo A., Martín-Santamaría S. // Chemistry. 2015. V. 21. P. 500–519.
8. Pereg L., Luz E., Bashan Y. // Plant Soil. 2016. V. 399. P. 389–414.
9. Lin S.Y., Young C.C., Hupfer H., Siering C., Arun A.B., Chen W.M., Lai W.A., Shen F.T., Rekha P.D., Yassin A.F. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2009. V. 59. P. 761–765.
10. Lavrinenko K., Chernousova E., Gridneva E., Dubinina G., Akimov V., Kuever J., Lysenko A., Grabovich M. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2010. V. 60. P. 2832–2837.
11. Yang Y., Zhang R., Feng J., Wang C., Chen J. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019.
12. Anandham R., Heo J., Krishnamoorthy R., SenthilKumar M., Gopal N.O., Kim S.J., Kwon S.W. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 1369–1375.
13. Zhou S., Han L., Wang Y., Yang G., Zhuang L., Hu P. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013. V. 63. P. 2618–2624.
14. Young C.C., Hupfer H., Siering C., Ho M.J., Arun A.B., Lai W.A., Rekha P.D., Shen F.T., Hung M.H., Chen W.M., Yassin A.F. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008. V. 58. P. 959–963.
15. Муратова А.Ю., Турковская О.В., Антонюк Л.П., Макаров О.Е., Позднякова Л.И., Игнатов В.В. // Микробиология. 2005. Т. 74. № 2. С. 248–254.
16. Федоненко Ю.П., Сигида Е.Н., Коннова С.А., Игнатов В.В. // Изв. АН. Сер. хим. 2015. Т. 64. № 5. С. 1024–1031.

17. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Arbatsky N.P., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Knirel Y.A. // Beilstein J. Org. Chem. 2016. V. 12. P. 636–642.
18. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Knirel Y.A. // Carbohydr. Res. 2019. V. 478. P. 54–57.
19. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Konnova S.A., Ignatov V.V. // Carbohydr. Res. 2018. V. 465. P. 40–43.
20. Choma A., Komaniecka I. // Carbohydr. Res. 2008. V. 343. P. 799–804.
21. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Knirel Y.A. // Carbohydr. Res. 2015. V. 416. P. 37–40.
22. Silipo A., Lanzetta R., Amoresano A., Parrilli M., Molinaro A. // J. Lipid Res. 2002. V. 43. P. 2188–2195.
23. Murphy R.C., Axelsen P.H. // Mass Spectrom. Rev. 2011. V. 30. P. 579–599.
24. Phillips N.J., Schilling B., McLendon M.K., Apicella M.A., Gibson B.W. // Infect. Immun. 2004. V. 72. P. 5340–5348.
25. Schilling B., McLendon M.K., Phillips N.J., Apicella M.A., Gibson B.W. // Anal. Chem. 2007. V. 79. P. 1034–1042.
26. Shaffer S.A., Harvey M.D., Goodlett D.R., Ernst R.K. // J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2007. V. 18. P. 1080–1092.
27. Domon B, Costello C. // Glycoconjugate J. 1988. V. 5. P. 397–409.
28. Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V. // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 118. P. 93–99.
29. Westphal O., Jann K. // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
30. Que N.L.S., Ribeiro A.A., Raetz C.R.H. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 28017–28027.
31. Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A. // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602–1603.
32. Leontein K., Lindberg B., Lönngren J. // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 359–362.
33. Mayer H., Merkofer T., Warth C., Weckesser J. // J. Endotox. Res. 1996. V. 3. P. 345–352.
34. Шевченко Н.М., Анастюк С.Д., Герасименко Н.И., Дмитренко П.С., Исаков В.В., Звягинцева Т.Н. // Биоорг. хим. 2007. Т. 33. № 1. С. 96–107.

Structure of the O-specific Polysaccharide and Lipid A of the Type Strain *Azospirillum rugosum* DSM-19657

E. N. Sigida^{*, #}, M. S. Kokoulin^{}, P. S. Dmitrenok^{**}, V. S. Grinev^{*, ***},
Y. P. Fedonenko^{*, ***}, and S. A. Konnova^{*, ***}**

[#]Phone: +7 (8452) 97-04-44; fax: +7 (8452) 97-04-03; e-mail: si_elena@mail.ru

^{*}Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms Russian Academy of Sciences,
pr. Entuziastov 13, Saratov, 410049 Russia

^{**}Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences,
pr. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia

^{***}Chernyshevsky Saratov State University, ul. Astrahanskaya 83, Saratov, Saratovskaya obl., 410012 Russia

Structure of the lipopolysaccharide from the type strain of soil nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum rugosum* isolated from oil contaminated soil was studied. On the basis of chemical analyses, 1D and 2D ¹H and ¹³C NMR spectroscopy data it was determined that the O-specific polysaccharide consists of two types of repeating units identical those reported earlier for *Azospirillum brasilense* Jm125A2. Structural analysis of the lipid A using GLC and MALDI mass spectroscopy revealed the presence of penta-, tetra- and triacylated species. Primary fatty acids are N-linked 16:0(3-OH) and O-linked 14:0(3-OH). Microheterogeneity within each species arises from the presence of different secondary fatty acids (16:0, 18:1 и 19:0) that acylate 16:0(3-OH) of distal GlcN.

Keywords: *Azospirillum rugosum*, lipopolysaccharide, O-specific polysaccharide, lipid A, NMR spectroscopy, MALDI mass-spectrometry