



УДК 547.917:579.22

ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ И ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА О-АНТИГЕНОВ *Azospirillum zeae* N7(T), *Azospirillum melinis* ТМСУ 0552(T) И *Azospirillum palustre* В2(T)

© 2022 г. Е. Н. Сигида*, **, #, В. С. Гринёв*, Э. Л. Здоровенко**, А. С. Дмитренко**,
Г. Л. Бурьгин*, Н. К. Кондюрина***, С. А. Коннова*, ***, Ю. П. Федоненко*

*Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ Саратовский научный центр РАН,
Россия, 410049 Саратов, просп. Энтузиастов, 13

**Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Россия, 119991 Москва, Ленинский просп., 47

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

Поступила в редакцию 09.11.2021 г.

После доработки 01.12.2021 г.

Принята к публикации 13.12.2021 г.

Впервые выделены и исследованы О-специфические полисахариды из липополисахаридов типовых штаммов трех видов бактерий: *Azospirillum zeae* N7, *Azospirillum melinis* ТМСУ 0552 и *Azospirillum palustre* В2. На основании результатов моносахаридного анализа, включающего определение абсолютной конфигурации моносахаридов, одномерной и двумерной спектроскопии ¹H- и ¹³C-ЯМР установлено, что выделенные полисахариды состоят из разветвленных тетрасахаридных повторяющихся звеньев следующей структуры: →3)-α-L-Rhap2OAc-(1→2)-[β-D-Glcp-(1→3)]-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→, описанной ранее для ряда штаммов азоспириллы, отнесенных к серогруппе III. Функции генов, ответственных за биосинтез О-антигенов, определены путем сравнения с последовательностями, представленными в доступных базах данных; показан высокий уровень их гомологии.

Ключевые слова: *Azospirillum*, липополисахарид, О-специфический полисахарид, структура бактериальных полисахаридов, кластер генов О-антигена

DOI: 10.31857/S0132342322030174

ВВЕДЕНИЕ

Грамотрицательные альфа-протеобактерии рода *Azospirillum* широко распространены в ассоциациях с дикими и культурными злаками в различных климатических зонах [1]. Впервые азоспириллы были описаны в 1925 г., но получили широкую известность только после повторного “открытия” в 1970-х гг. в Бразилии [2], которое стало краеугольным камнем в изучении феномена ассоциативности и дало толчок развитию этой отрасли науки. За 40 лет исследований растительно-микробных ассоциаций с участием азоспириллы представления об их рост-стимулирующем действии эволюционировали от аддитивной гипотезы, заключающейся в способности фиксировать азот и продуцировать фитогормоны, до гипотезы множественных механизмов, включающей также улучшение минерального питания,

снижение биотических и абиотических стрессов, биоконтроль патогенов [1, 3]. На сегодняшний день род *Azospirillum* включает 22 вида [4], большинство из которых ризосферные, однако в последнее время все чаще сообщается о выделении новых видов из нехарактерных для азоспириллы экологических ниш, к примеру, сульфидных и термальных источников, оработанного дорожного покрытия, торфяных болот [5]. Высокий адаптационный потенциал этих бактерий объясняется избыточностью и пластичностью их генома и высокой долей генов, привнесенных путем горизонтального переноса [6].

Как наиболее изученные среди бактерий, стимулирующих рост и развитие растений, азоспириллы входят в состав биоудобрений и широко используются в ряде стран Южной Америки, приводя к значимому увеличению урожайности злаков – на 5–30% в 60–70% случаев полевых экспериментов [3, 7]. Для минимизации нежелательных эффектов при инокуляции азоспириллами необходимо учитывать ряд факторов, в их числе состояние аборигенной микрофлоры, уровень

Сокращения: ЛПБК – липополисахарид-белковый комплекс; ЛПС – липополисахарид; ОПС – О-специфический полисахарид.

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

минерального питания почвы, варибельность сортов растений и характеристик используемых штаммов-иннокулятов с точки зрения оказываемого на растения рост-стимулирующего эффекта [8]. Расширение фундаментальных знаний о молекулярных механизмах ассоциативного взаимодействия растений и азоспирилл, с учетом штаммовой варибельности, необходимо для повышения эффективности их использования в сельском хозяйстве.

Известно, что начальные стадии формирования ассоциаций, такие как прикрепление клеток, адсорбция и образование биопленок на поверхности корней, реализуются с участием гликополимеров, формирующих поверхность бактериальных клеток, — капсульных полисахаридов и липополисахаридов (ЛПС) [9]. ЛПС — основной структурный компонент внешней мембраны грамотрицательных бактерий, также он обнаруживается в составе экстраклеточных полимерных субстанций. В среде культивирования азоспирилл ЛПС находится в виде липополисахарид-белкового комплекса (ЛПБК) [9] и может использоваться бактериями в качестве источника углерода в условиях голодания [10]. Показана способность ЛПС азоспирилл к индукции деформации корневых волосков [10], повышению пероксидазной активности и продукции пероксида водорода, увеличению длины и массы корней у проростков пшеницы [11], а также их положительное влияние на морфогенность каллусов и выход растений-эксплантов [12].

ЛПС — амфифильная макромолекула, состоящая из трех доменов, связанных друг с другом ковалентными связями: гидрофобного липида А и гидрофильного полисахарида, включающего коровый олигосахарид и О-специфический полисахарид (ОПС) (О-антиген). Разнообразие природы моносахаридов, входящих в состав ОПС, в сочетании с различными типами связей между ними, предоставляет практически безграничные возможности структурного многообразия этих биополимеров, обуславливая серологическую варибельность штаммов одного вида. В последние годы установлено более 20 типов повторяющихся звеньев ОПС для представителей семи видов азоспирилл: *A. brasilense*, *A. lipoferum* [13], *A. halopraeferens* [14], *A. dobereinae* [15], *A. fermentarium* [16], *A. formosense* [17] и *A. rugosum* [18]. Большая часть ОПС — разветвленные гетерополисахариды, за исключением *A. baldaniorum* Sp245 и серологически родственной ему группы штаммов, а также типовых штаммов *A. dobereinae* и *A. fermentarium*. Регулярность строения ОПС ряда штаммов азоспирилл маскируется наличием нескольких типов повторяющихся звеньев, а также нерегулярным метилированием и ацетилизацией моносахаридных остатков, что затрудняет применение данных о строении ОПС для построения хемо-

типических классификационных схем. В большинстве случаев типовые штаммы азоспирилл характеризуются наличием уникального по структуре ОПС, за исключением штамма *A. baldaniorum* Sp245(Т), для которого показано структурное родство ОПС с рядом штаммов *A. lipoferum* и *A. brasilense* [13], а также штамма *A. rugosum* DSM 19657(Т), имеющего в составе ОПС два полисахарида, обнаруженных ранее у *A. brasilense* Jm125A2 [18].

Биосинтез О-антигенов подробно изучен на примере энтеробактерий, у которых гены синтеза нуклеотидных предшественников моносахаридов, гены гликозилтрансфераз и гены трансмембранного переноса и полимеризации О-единиц, ответственные за синтез ОПС, обычно сгруппированы вместе в кластер, расположенный на хромосоме [19]. Сборка и синтез ОПС осуществляется по трем известным путям: Wzx/Wzy-зависимому пути, посредством ABC-транспортера или синтазы [19]. Для азоспирилл до сих пор не сообщалось о структуре кластера генов, ответственного за биосинтез О-антигена.

Цель настоящей работы — получение сведений о строении О-антигенов типовых штаммов ранее не изученных видов *A. zeaе* N7(Т) [20], *A. melinis* ТМСУ 0552(Т) [21] и *A. palustre* В2(Т) [5] и анализ генов, вовлеченных в биосинтез их ОПС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате скрининга серологической специфичности экстрактов ЛПС ранее не изученных видов азоспирилл из Коллекции микробных культур ИБФРМ РАН были отобраны штаммы *A. zeaе* N7(Т), *A. melinis* ТМСУ 0552(Т) и *A. palustre* В2(Т), демонстрировавшие иммунохимический перекрест с антисыворотками к ЛПБК штамма *A. lipoferum* Sp59b. Наличие в составе поверхностных гликополимеров указанных штаммов эпитопов, обуславливающих серологический перекрест со штаммом *A. lipoferum* Sp59b, позволило отнести их к серогруппе III, представители которой характеризуются присутствием фрагмента $\rightarrow 3$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3 в составе ОПС [13].

Детальный иммунохимический анализ был проведен с использованием препаратов ЛПС, выделенных водно-фенольной экстракцией из сухой биомассы исследуемых бактерий. В тесте двойной радиальной иммунодиффузии было детектировано слияние полос преципитации антигенов к ЛПБК штамма *A. lipoferum* Sp59b с гомологичными и исследуемыми антигенами (рис. 1а) и отсутствие взаимодействия с ЛПС *A. baldaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* Jm6B2, *A. brasilense* SR80. В ИФА наблюдались межштаммовые различия в интенсивности взаимодействия антиген-антитело, однако тенденция взаимодействия

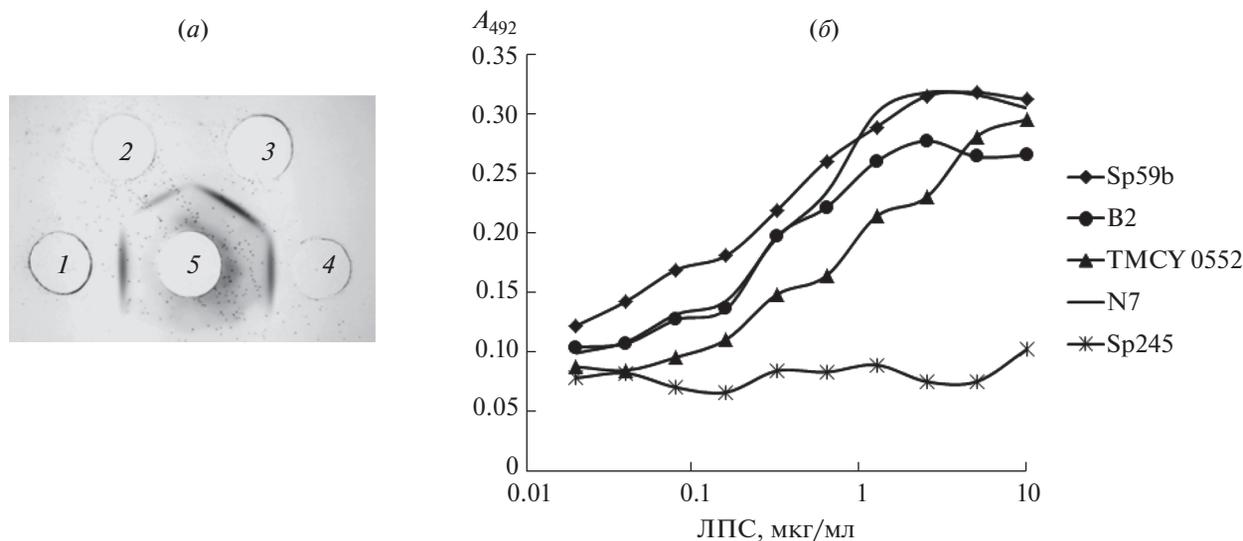


Рис. 1. (а) – Результат двойной радиальной иммунодиффузии препаратов липополисахаридов *A. palustre* B2 (1), *A. melinis* TMCY 0552 (2), *A. zeae* N7 (3) и *A. lipoferum* Sp59b (4) с антителами к липополисахарид-белковому комплексу *A. lipoferum* Sp59b (5); (б) – результат иммуноферментного анализа препаратов липополисахаридов исследуемых штаммов с антителами к липополисахарид-белковому комплексу *A. lipoferum* Sp59b.

ЛПС изучаемых штаммов с антителами была сходна гомологичному антигену (рис. 1б).

Электрофоретический анализ выделенных препаратов ЛПС в SDS-ПААГ с последующим окрашиванием нитратом серебра демонстрировал превалирование ОПС-содержащих фракций, визуализирующихся в верхней части трека, а также наличие в нижней части трека высокоподвижных фракций, содержащих кор и липид А (рис. 2). В отличие от ЛПС гамма-протеобактерии *Pseudomonas putida* TSh-18, представлявшего собой смесь молекул в широком диапазоне молекулярной массы, отличающихся на одно повторяющееся звено, у ЛПС азоспирилл наблюдалось преобладание фракций ЛПС в диапазоне молекулярных масс 20–25 кДа. Высокомолекулярная природа ЛПС исследуемых штаммов свидетельствует о доминировании S-форм молекул, следовательно, идентичные или сходные антигенные детерминанты, обуславливающие перекрест со штаммом Sp59b, могут быть локализованы в составе их ОПС.

Выполнен анализ состава и физико-химических свойств ЛПС и структуры ОПС исследуемых штаммов для выявления химической природы серологического перекреста. Анализ состава жирных кислот ЛПС методом ГЖХ после получения соответствующих метиловых эфиров выявил преобладание во всех препаратах 3-гидрокситетрадекановой и 3-гидроксигексадекановой кислот, суммарное содержание которых превышало 70% от суммы всех идентифицированных производных, а также присутствие гексадекановой, гексадеценовой и октадеценовой кислот. Учитывая

консервативность строения липида А в пределах бактериального рода, профиль жирных кислот исследуемых штаммов согласовывался с данны-

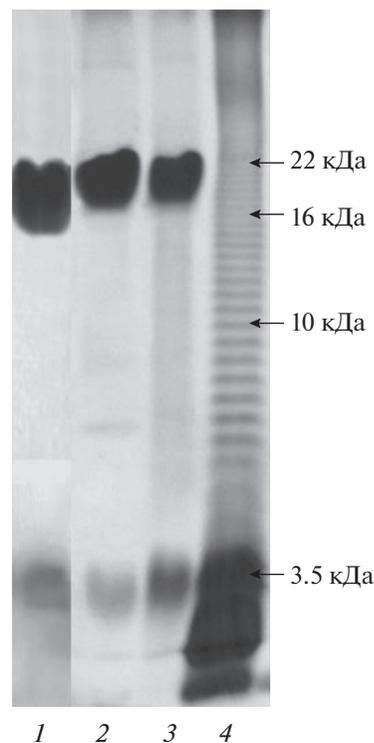


Рис. 2. Электрофореграмма препаратов липополисахаридов в 13.5%-ном ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия: *A. palustre* B2 (1), *A. zeae* N7 (2), *A. melinis* TMCY 0552 (3), *P. putida* TSh-18 (4).

Таблица 1. Данные динамического рассеяния света для водных растворов липополисахаридов *A. palustre* B2 и *A. zeae* N7

Штамм	Показатели динамического рассеяния света				
	I , kcps	d_m , нм	ζ -потенциал, мВ	$N_{отн}$, %	$C_{отн}$, %
<i>A. zeae</i> N7(T)	644 ± 4	27.5 ± 0.9	-9.02 ± 0.24	100.0 ± 17.9	100.0 ± 8.7
<i>A. palustre</i> B2(T)	951 ± 7	41.0 ± 2.6	-5.50 ± 0.10	10.6 ± 3.4	37.1 ± 6.7

ми, полученными ранее для ЛПС представителей других видов азоспирилл [15–18].

В силу амфифильной природы в водных растворах препараты ЛПС могут формировать надмолекулярные комплексы (мицеллы). Основная движущая сила самоагрегации ЛПС – гидрофобное взаимодействие между ацильными цепями липида А. Размер мицелл определяется строением липида А и ОПС и соотношением этих компонентов в препарате ЛПС [22], таким образом, при схожести строения отдельных структурных компонентов ЛПС могут существенно отличаться по функциональной активности, т.к. различным образом агрегируют в водных растворах. Измерение методом динамического рассеяния света размера и ζ -потенциала мицелл (табл. 1), образованных из молекул ЛПС *A. zeae* N7(T) и *A. palustre* B2(T), выявило, что оба препарата в концентрации 2 мг/мл при температуре 37°C в водной среде образовывали отрицательно заряженные мицеллы размером 27.5 и 41.0 нм соответственно. Интенсивность рассеяния света (I) раствора ЛПС *A. palustre* была в 1.5 раза выше таковой для ЛПС *A. zeae*. Поскольку электрофоретический анализ не выявил значительных отличий в степени полимеризации ОПС исследуемых штаммов, наблюдаемые отличия в размере мицелл их ЛПС могут быть обусловлены микрогетерогенностью строения липида А (соотношением форм с различной степенью ацилирования). Определение относительной численной концентрации ($N_{отн}$) и относительной массово-объемной концентрации ($C_{отн}$) по формулам, описанным нами ранее [23], показало, что в исследованных условиях количество мицелл, образованных ЛПС *A. palustre* B2(T), и количество ЛПС, участвующего в мицеллообразовании, существенно ниже, чем ЛПС *A. zeae* N7(T).

ОПС исследуемых штаммов были получены мягким кислотным гидролизом ЛПС с последующей гель-фильтрацией. Анализ моносахаридного состава методом ГЖХ ацетатов полиолов, полученных после полного кислотного гидролиза всех препаратов ОПС, позволил идентифицировать в их составе наличие Rha и Glc в соотношении ~3 : 1 (отклик детектора). В результате анализа ГЖХ ацетилированных (S)-2-октилглицозидов

была установлена D-конфигурация Glc и L-конфигурация остатков Rha.

Структура ОПС изучаемых штаммов была установлена с применением 1D и 2D ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии. Спектры ^1H - и ^{13}C -ЯМР ОПС исследуемых штаммов были практически идентичны (рис. 3), что свидетельствовало о структурном сходстве О-антигенов.

^1H -ЯМР-спектр содержал пять сигналов в слабopольной области при δ 4.63–5.24, сигналы метильных групп рамнозы при δ 1.26–1.32, сигнал О-ацетильной группы при δ 2.21 и сигналы протонов моносахаридных циклов при δ 3.31–4.39. ^{13}C -ЯМР-спектр содержал сигналы четырех аномеров при δ 99.8–105.3, сигналы метильных групп рамнозы при δ 17.8–18.0, сигнал О-ацетильной группы при δ 22.2 (CH_3), δ 175.5 (CO), сигнал CH_2OH -группы при δ 62.2 и сигналы углерода моносахаридных циклов при δ 70.3–81.3. Отсутствие в спектре сигналов углерода моносахаридных циклов в области δ 83–88 свидетельствовало о пиранозной форме моносахаридных остатков [24].

Сигналы ^1H - и ^{13}C -ЯМР-спектров были отнесены с применением 2D-спектров ЯМР (гомоядерные эксперименты ^1H , ^1H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерные эксперименты ^1H , ^{13}C HSQC и HMQC). Химические сдвиги сигналов моносахаридных остатков приведены в табл. 2. На основании внутризвеньевых корреляций H, H и H, C и констант спин-спиновой взаимодействия $^3J_{\text{H,H}}$ были идентифицированы спин-спиновые системы четырех моносахаридов: А, В и С, имеющих манно-конфигурацию, и D, имеющего глюко-конфигурацию. Спектр TOCSY продемонстрировал наличие H1/H2 и H2/H3 – H-6 кросспиков для остатков А–С и H1/H2 – H-6 кросспики для остатка D. Сигналы внутри каждой спин-спиновой системы были отнесены с помощью спектров COSY.

Альфа-конфигурация остатков А–С и бета-конфигурация остатка D были установлены на основании характеристических химических сдвигов сигналов C-5 при сравнении с литературными данными [24, 25].

Позиции замещения моносахаридов были установлены на основании сдвига в слабое поле сигналов C2 и C3 остатка А, C-3 остатков В и С

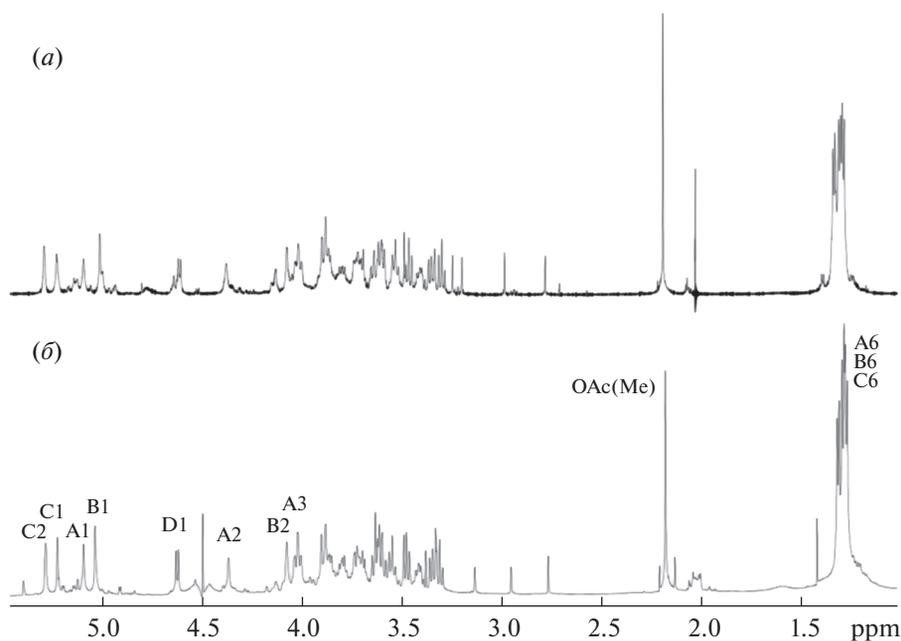


Рис. 3. ^1H -ЯМР-спектры O-специфических полисахаридов *A. palustre* B2 (а) и *A. zeae* N7 (б).

по сравнению с соответствующими незамещенными моносахаридами [24, 25]. Химические сдвиги C2–C6 остатка **D** были близки к таковым O-метил- β -GlcP [24] и указывали на то, что остаток **D** занимает терминальное положение в боковой цепи. Последовательность моносахаридов была установлена на основании спектров ROESY, которые демонстрировали межзвеньевые корреляции между аномерными протонами и протонами при трансгликозидных связях: **A** H1/B H3 при δ 5.11/3.74; **B** H1/C H3 при δ 5.03/4.04, **C** H1/A H2 при δ 5.24/4.39, **D** H1/A H3 при δ 4.63/4.03. В спектрах ^1H - и ^{13}C -HMBC наблюдались соответствующие корреляции между аномерными протонами и атомами углерода при гликозидной связи: **A** H1/B C3 при δ 5.11/78.6; **B** H1/C C3 при δ

5.03/77.0, **C** H1/A C2 при δ 5.24/78.5, **D** H1/A C3 при δ 4.63/81.3.

На основании проведенных исследований была идентифицирована структура повторяющегося звена ОПС исследуемых микроорганизмов: три остатка рамнозы в основной цепи и остаток глюкозы в боковой цепи (рис. 4). На основании интегральной интенсивности сигналов аномерного протона остатка **C** с ацетильной и без ацетильной групп (δ_{H} 5.13 м.д. [26]) степень ацетилирования остатка **C** составила $\sim 75\%$. Данная структура повторяющихся звеньев ОПС распространена среди азоспирилл серогруппы III, для которых продемонстрирована различная степень ацетилирования остатка Rha [13]. Наблюдаемое сходство строения O-антигенов различных видов бактерий может служить косвенным подтверждением ши-

Таблица 2. Данные ^2H - и ^{13}C -ЯМР-спектров O-специфического полисахарида *A. zeae* N7(T) (химические сдвиги, м.д.)

Моносахаридный остаток	H1	H2	H3	H4	H5	H6 (6a; 6b)
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
$\rightarrow 2,3$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow A	5.11 102.2	4.39 78.5	4.03 81.3	3.64 72.4	3.88 70.3	1.32 18.0
$\rightarrow 3$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow B	5.03 103.3	4.08 71.1	3.74 78.6	3.55 72.7	3.72 70.7	1.28 17.9
$\rightarrow 3$ - α -L-Rhap2OAc-(1 \rightarrow C	5.24 99.8	5.30 73.0	4.04 77.0	3.61 73.1	3.81 70.6	1.26 17.8
β -D-GlcP-(1 \rightarrow D	4.63 105.3	3.35 74.9	3.48 76.9	3.31 71.0	3.42 77.1	3.61; 3.90 62.2

Таблица 3. Белки биосинтеза О-антигена *A. oryzae* КАСС 14407, *A. lipoferrum* Sp59b и *A. palustre* B2 и их ближайшие гомологи

Ген	Кодируемый белок	Штамм (код доступа)					
		<i>A. oryzae</i> КАСС 14407 (CP054615.1)		<i>A. lipoferrum</i> Sp59b (VTTN01000010.1)		<i>A. palustre</i> B2 (GCF_002573965.1)	
		CDS (ID белка)	ближайший гомолог* покрытие/ идентичность, % (длина совпадающего фрагмента, п.н.)	CDS (ID белка)	ближайший гомолог* покрытие/ идентичность, % (длина совпадающего фрагмента, п.н.)	CDS (ID белка)	ближайший гомолог* покрытие/ идентичность, % (длина совпадающего фрагмента, п.н.)
<i>wzm</i>	ABC-транспортная пермеаза	9766..10596 (QKS48944.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9458094.1) 97/62 (271)	218879..219706 (КАА0593813.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9458094.1) 97/61 (271)	296241..297647 (WP_204561567.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9458094.1) 94/62 (271)
<i>wzi</i>	ABC-транспортный АТР-связывающий белок	8349..9710 (QKS49155.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9497562.1) 97/65 (450)	217471..218874 (КАА0593866.1)	<i>Nitrospira</i> sp. (МСА9497562.1) 96/64 (450)	297652..298500 (WP_098734702.1)	<i>Oleisolibacter albus</i> (WP_114395858.1) 94/67 (449)
GT	Гликозилтрансфераза	4647..8171 (QKS48943.1)	<i>Mesorhizobium</i> sp. LNHC221B00 (ESY81438.1) 93/47 (1121)	213844..217302 (КАА0593812.1)	<i>Mesorhizobium</i> sp. LNHC232B00 94/46 (1121)	292593..296072 (WP_092859550.1)	<i>Mesorhizobium</i> sp. (TIR25666.1) 94/46 (1115)
<i>rfbC</i>	dTDP-4-дегидроманнозо-3,5-эпимераза	4092..4643 (QKS48942.1)	<i>Methylobacterium</i> sp. B34 (WP_042673940.1) 100/94 (183)	213289..213840 (КАА0593811.1)	<i>Methylobacterium</i> sp. B34 (WP_042673940.1) 100/91 (183)	292038..292589 (WP_098734700.1)	<i>Albimonas pacifica</i> (WP_092859550.1) 100/73 (183)
<i>rfbB</i>	dTDP-глюкозо-4,6-дегидратаза	2951..4018 (QKS48941.1)	<i>Pararhodospirillum photometricum</i> (WP_051013520.1) 98/80 (353)	212136..213203 (КАА0593810.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06590.1) 98/80 (358)	289986..290876 (WP_098734699.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06590.1) 98/80 (358)
<i>rfbD</i>	dTDP-4-дегидроманнозоредуктаза	2052..2942 (QKS49154.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 97/63 (300)	211237..212127 (КАА0593809.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 97/63 (300)	290873..291940 (WP_098734698.1)	<i>P. photometricum</i> DSM 122 (CCG06589.1) 97/62 (300)
<i>rfbA</i>	Глюкозо-1-фосфат-тимидилтрансфераза	1177..2040 (QKS48940.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 100/79 (288)	210362..211225 (КАА0593808.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 100/79 (288)	289108..289971 (WP_098734697.1)	<i>P. photometricum</i> (WP_041795448.1) 98/81 (288)

Примечание: CDS — кодирующая последовательность (CoDing Sequence). * Бактериальный таксон (код GenBank ближайшего гомолога).

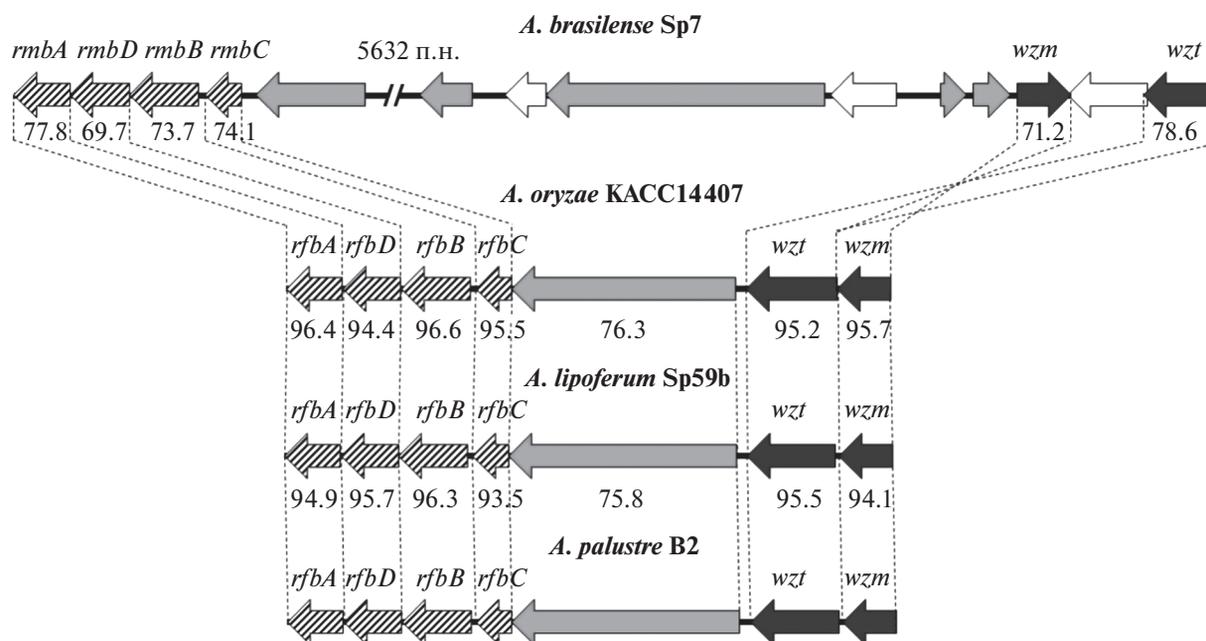


Рис. 5. Схематичное расположение кластеров генов биосинтеза L-Rha. Заштрихованными стрелками обозначены гены синтеза L-Rha, серыми — аннотированные гликозилтрансферазы, темно-серыми — гены процессинга *wzl* и *wzm*, белыми — гены с неизвестными функциями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование бактерий. Штаммы *A. melinis* TMCY 0552 (IBPPM 547), *A. zeaе* N7 (IBPPM 550) и *A. palustre* B2(T) (IBPPM 633) предоставлены Коллекцией ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов, Россия). Культивирование бактерий проводили в жидкой малатно-солевой среде с витаминами [27] 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 и ОПС. ЛПС выделяли из высушенных ацетоном бескапсульных клеток горячим 45%-ным водным раствором фенола без разделения слоев [28]. Примеси белков осаждали из раствора ЛПС добавлением 40%-ной CCl_3COOH до конечного значения pH 2.7. Растворы диализовали против дистиллированной воды, концентрировали на роторном испарителе Laborota 4000 (Heidolph, Германия) и лиофилизовали на лиофильной сушке Bench Top VirTis (США). Деградацию ЛПС проводили 2%-ной CH_3COOH при 100°C в течение 4 ч. Супернатант, содержащий ОПС, разделяли гель-хроматографией на колонке с Sephadex G-50 Fine (GE Healthcare, США) в 0.025 М пиридин-ацетатном буфере, контроли-

руя элюцию с помощью дифференциального проточного рефрактометра (Кнауер, Германия). Фракцию высокомолекулярного О-специфического полисахарида концентрировали и лиофилизовали.

Электрофорез препаратов ЛПС выполняли в 13.5%-ном SDS-ПААГ [29]. Визуализацию компонентов осуществляли окрашиванием гелей красителем на основе азотнокислого серебра [30].

Динамическое рассеяние света растворами, приготовленными из лиофилизованных препаратов ЛПС в деионизованной воде (Milli-Q) в концентрации 2.0 мг/мл, измеряли с использованием установки Malvern Nano-ZS (Malvern, Великобритания) в пластиковых 4-сторонних кюветах (10 мм) (Sarstedt, Германия). Измерения проводили при 37°C и фиксированной фокусировке гелей-неонового лазера ($\lambda = 633$ нм в вакууме) в центре кюветы (4.65 мм) и постоянном диаметре диафрагмы (установленный аттенюатор: 7). Определяли интенсивность рассеяния света под углом 173° (выраженную в единицах скорости счета числа фотонов — kcps) и поправочную функцию флуктуаций интенсивности рассеяния во времени. По этим данным производили оценку наиболее вероятного мода гидродинамического диаметра (d_m) мицелл. Относительные значения числовой концентрации ($N_{\text{отн}}$) и массово-объемной концентрации диспергированных биополимерных веществ ($C_{\text{отн}}$) определяли по уравнению из работы Burygin et al. [23]. ζ -Потен-

циал мицелл ЛПС (2.0 мг/мл) измеряли при 37°C с помощью системы Malvern Nano-ZS (Malvern, Великобритания). Измерения проводили с настройками по умолчанию, рекомендованными производителем.

Иммунохимические исследования ЛПС проводили с использованием поликлональных антител кролика к ЛПБК *A. lipoferum* Sp59b методами двойной радиальной иммунодиффузии [31] и твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Преципитат в иммунодиффузии окрашивали кумасси голубым R-250. Взаимодействие антигенов и антител в ИФА детектировали в полистироловых 96-луночных планшетах, используя козы антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, при добавлении перекиси водорода и *o*-фенилендиамина. Измерения оптической плотности исследуемых проб проводили при длине волны 490 нм на иммуноферментном анализаторе Tescan (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ моносахаридного состава и абсолютных конфигураций сахаров после гидролиза ОПС 2 М CF₃COOH (120°C, 2 ч) осуществляли методом ГЖХ ацетатов полиолов [32] и ацелированных 2-(*S*)-октилглюкозидов [33] 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 Mayer et al. [34].

ЯМР-спектроскопия. Спектры ЯМР записывали на спектрометре DRX-600 (Bruker, Германия) в растворе 99.96%-ной D₂O при 30°C (внутренний стандарт – триметилсилилпропаноат-*d*₄, δ_C –1.6 и δ_H 0.0). Образцы предварительно лиофилизовали дважды из 99.9%-ной D₂O. Двумерные спектры записывали с использованием стандартного математического обеспечения компании 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.

Анализ генов биосинтеза О-антигенов. Гены биосинтеза L-Rha были извлечены из полногеномных сиквенсов *A. brasilense* Sp7 (GenBank: AN013753.2), *A. oryzae* KACC 14407 (CP054615.1) и *A. lipoferum* Sp59b (VTTN01000010.1) и из доступных предварительных данных полногеномного сиквенса *A. palustre* B2 (GCF_002573965.1, сборка ASM257396v1). Предсказание функций идентифицированных последовательностей генов про-

водили путем выравнивания соответствующих и известных белковых последовательностей (полученных из GenBank), участвующих в биосинтезе О-антигенов других бактерий, с помощью инструмента BLASTn [35]. Трех- и четырехбуквенные обозначения генов *A. brasilense* Sp7 приведены в соответствии с аннотацией GenBank. Трехбуквенные (*wzm* и *wzi*) и четырехбуквенные обозначения (*rfaA–rfbD*) присвоены генам *A. oryzae* KACC 14407, *A. lipoferum* Sp59b и *A. palustre* B2 в соответствии с их аннотациями, а также результатами попарных выравниваний их нуклеотидных последовательностей. Изображение генных кластеров изучаемых штаммов азоспирилл было получено с помощью визуализатора Easyfig версии 2.2.5 [36]. Гомологию нуклеотидных последовательностей генов оценивали с помощью попарных выравниваний соответствующих последовательностей, выполненных с помощью программы BLASTn.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гликанам клеточной поверхности ризобактерий отводится важная роль на всех этапах существования популяции клеток, как при жизни в почве и ризосфере, так и при формировании симбиотических отношений с растениями. Липополисахариды – конструктивные компоненты клеточной стенки бактерий, которые могут экспортироваться в окружающую среду. Полисахариды, формируя внешний слой клеточной поверхности грамотрицательных бактерий, составляют основу для защиты клетки от неблагоприятного воздействия экстраклеточного окружения, а в случае симбиотических микроорганизмов они играют важную роль во взаимодействии с эукариотическими клетками организма-хозяина.

Прогресс в изучении структурных особенностей строения ЛПС (в том числе их ОПС) грамотрицательных бактерий во многом обусловлен их ролью в развитии патофизиологических процессов, сопровождающих бактериальные инфекции человека и животных. Эти молекулы вызывают иммунный ответ организма животных и человека и распознаются их антителами, что успешно применяется в клинике для идентификации и классификации патогенных бактерий. Коллекции О-антиген-специфичных антисывороток используются для классификации грамотрицательных организмов в серологическом тестировании, что эффективно и для непатогенных микроорганизмов, к которым относятся и почвенные диазотрофы рода *Azospirillum*.

У *E. coli* нуклеотидные последовательности генных кластеров биосинтеза О-антигенов могут использоваться в качестве генетических маркеров для штаммовой идентификации этих бактерий [37]. Бактерии рода *Azospirillum* в этом отношении исследованы явно недостаточно. В настоящей ра-

боте представлены результаты анализа структур ОПС представителей трех ранее не изученных в этом отношении видов азоспирилл, а также выявления в их геномах генных кластеров, ответственных за биосинтез О-антигенов, с высоким уровнем идентичности. Используемый подход может быть весьма эффективным для дальнейшей молекулярной серодиагностики азоспирилл по генным кластерам их О-антигенов, учитывая тот факт, что для представителей этого рода весьма характерно явление молекулярной мимикрии [13]. При этом следует отметить, что идентичность структур О-антигенов не приводит к унификации свойств поверхности этих микроорганизмов, возможно, в силу многообразия экспонированных биомакромолекул либо в силу выявленных в ходе представленных исследований различий в мицеллообразовании амфифильных молекул ЛПС в водном растворе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д.х.н., проф. А.С. Шашкову за регистрацию ЯМР-спектров *A. zeaе* и *A. melinis*.

В работе использованы ресурсы Центра коллективного пользования “Симбиоз” при Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cassán F., Coniglio A., López G., Molina R., Nievas S., Le Noir de Carlan C., Donadio F., Torres D., Rosas S., Olivera P.F., de Souza E., Díaz Zorita M., de-Bashan L., Mora V. // Biol. Fertil. Soils. 2020. V. 56. P. 461–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
2. Döbereiner J., Marriel I.E., Nery M. // Can. J. Microbiol. 1976. V. 22. P. 1464–1473. <https://doi.org/10.1139/m76-217>
3. Bashan Y., de-Bashan L.E. // Adv. Agron. 2010. V. 108. P. 77–136. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8)
4. Genus *Azospirillum* // In: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN). <https://bacterio.net/genus/azospirillum>
5. Tikhonova E.N., Grouzdev D.S., Kravchenko I.K. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2019. V. 69. P. 2787–2793. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003560>
6. Wisniewski-Dyé F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alexandre G., Sukharnikov L.O., Wuichet K., Hurst G.B., McDonald W.H., Robertson J.S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Condemine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A.H., González V., Mavingui P., Zhulin I.B. // PLoS Genet. 2011. V. 7. P. e1002430. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>
7. Bomfim C.A., Coelho L.G.F., do Vale H.M.M., de Carvalho Mendes I., Megias M., Ollero F.J., Dos Reis Junior F.B. // Braz. J. Microbiol. 2021. V. 52. P. 2215–2232. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00618-9>
8. Cassán F., Diaz-Zorita M. // Soil Biol. Biochem. 2016. V. 103. P. 117–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13150.x>
9. Skvortsov I.M., Ignatov V.V. // FEMS Microbiol Lett. 1998. V. 165. P. 223–229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13150.x>
10. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Toukach P.V., Shelud'ko A.V., Zdorovenko E.L., Knirel Y.A., Konnova S.A. // Int. J. Biol. Macromol. 2019. V. 126. P. 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.229>
11. Hernández-Esquivel A.A., Castro-Mercado E., García-Pineda E. // J. Plant Growth Regul. 2021. V. 40. P. 1903–1911. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10241-x>
12. Tkachenko O.V., Burygin G.L., Evseeva N.V., Fedonenko Y.P., Matora L.Y., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2021. V. 147. P. 147–155.
13. Fedonenko Y.P., Sigida E.N., Konnova S.A., Ignatov V.V. // Russ. Chem. Bull. 2015. V. 64. P. 1024–1031. <https://doi.org/10.1007/s11172-015-0971-x>
14. 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. <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.62>
15. 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. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.04.009>
16. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Konnova S.A., Ignatov V.V. // Carbohydr. Res. 2018. V. 465. P. 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.06.003>
17. Sigida E.N., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Fedonenko Y.P. // Carbohydr. Res. 2020. V. 494. P. 108060. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2020.108060>
18. Сигида Е.Н., Кокоулин М.С., Дмитренко П.С., Гринёв В.С., Федоненко Ю.П., Коннова С.А. // Биоорг. химия. 2020. Т. 46. С. 65–76. [Sigida E.N., Kokoulin M.S., Dmitrenok P.S., Grinev V.S., Fedonenko Y.P., Konnova S.A. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 60–70.] <https://doi.org/10.1134/S1068162020010112>
19. Samuel G., Reeves P. // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. P. 2503–2519. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.009>

20. *Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 2805–2809. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65128-0>
21. *Peng G., Wang H., Zhang G., Hou W., Liu Y., Wang E.T., Tan Z.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 56. P. 1263–1271. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64025-0>
22. *D'Errico G., Silipo A., Mangiapia G., Vitiello G., Radulescu A., Molinaro A., Lanzetta R., Paduano L.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2010. V. 12. P. 13574–13585. <https://doi.org/10.1039/c0cp00066c>
23. *Burygin G.L., Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Khlebtsov B.N., Shchyogolev S.Y.* // Biophysics. 2016. V. 61. 547–557. <https://doi.org/10.1134/S0006350916040059>
24. *Bock K., Pedersen C.* // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.
25. *Lipkind G.M., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Vinogradov E.V., Kochetkov N.K.* // Carbohydr. Res. 1988. V. 175. P. 59–75. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(88\)80156-3](https://doi.org/10.1016/0008-6215(88)80156-3)
26. *Choma A., Komaniecka I., Sowinski P.* // Carbohydr. Res. 2009. V. 344. P. 936–939. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.02.021>
27. *Konnova S.A., Makarov O.E., Skvortsov I.M., Ignatov V.V.* // FEMS Microbiol. Lett. 1994. V. 118. P. 93–99.
28. *Westphal O., Jann K.* // Methods Carbohydr. Chem. 1965. V. 5. P. 83–91.
29. *Hitchcock P.J., Brown T.M.* // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
30. *Tsai C.M., Frasch C.E.* // Anal. Biochem. 1982. V. 119. P. 115–119.
31. *Ouchterlony O., Nilsson L.-A.* // In: Handbook of Experimental Immunology / Ed. Weir D.M. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1978. P. 19.16–19.23.
32. *Sawardeker J.S., Sloneker J.H., Jeanes A.* // Anal. Chem. 1965. V. 37. P. 1602–1603.
33. *Leontein K., Lindberg B., Lönnngren J.* // Carbohydr. Res. 1978. V. 62. P. 359–362.
34. *Mayer H., Merkofer T., Warth C., Weckesser J.* // J. Endotox. Res. 1996. V. 3. P. 345–352. <https://doi.org/10.1177/096805199600300409>
35. *Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J.* // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. P. 3398–3402.
36. *Sullivan M.J., Petty N.K., Beatson S.A.* // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 1009–1010.
37. *Liu B., Furevi A., Perepelov A.V., Guo X., Cao H., Wang Q., Reeves P.R., Knirel Y.A., Wang L., Widmalm G.* // FEMS Microbiol. Rev. 2020. V. 44. P. 655–683. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>

O-Antigens of *Azospirillum zeae* N7(T), *Azospirillum melinis* TMCY 0552(T) and *Azospirillum palustre* B2(T): Structure Elucidation and Analysis of Biosynthesis Genes

E. N. Sigida*^{*, #}, V. S. Grinev*, E. L. Zdorovenko, A. S. Dmitrenok**, G. L. Burygin*, N. K. Kondurina***, S. A. Konnova*^{*, ***}, and Y. P. Fedonenko***

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

^{*}Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, FRC Saratov Scientific Centre of RAS, prosp. Entuziastov 13, Saratov, 410049 Russia

^{**}N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 47, Moscow, 119991 Russia

^{***}Chernyshevsky Saratov State University, ul. Astrakhanskaya 83, Saratov, 410012 Russia

O-specific polysaccharides were isolated from lipopolysaccharides of type bacterial strains *Azospirillum zeae* N7, *Azospirillum melinis* TMCY 0552 and *Azospirillum palustre* B2. Based on the results of sugar analysis, including the determination of the absolute configurations of monosaccharides, one- and two-dimensional ¹H and ¹³C NMR spectroscopy, it was found that the isolated polysaccharides built up of branched tetrasaccharide repeating units with the following structure: →3)-α-L-Rhap2OAc-(1→2)-[β-D-Glcp-(1→3)]-α-L-Rhap-(1→3)-α-L-Rhap-(1→, previously described for a number of *Azospirillum* strains, assigned to serogroup III. Functions of genes, responsible for the biosynthesis of O-antigens were identified by comparison with the sequences presented in the available databases; a high level of their homology was shown.

Keywords: *Azospirillum*, lipopolysaccharide, O-specific polysaccharide, structure of bacterial polysaccharides, O-antigen gene cluster