

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики
Работа выполнена
на базе УНЦ физико-химической биологии
СГУ и ИБФРМ РАН

**ХАРАКТЕРИСТИКА СОСТАВА ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ
ГАЛОФИЛЬНЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ШТАММОВ
1QL3 И 5S2**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления подготовки 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Рыбальченко Дарьи Александровны

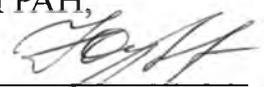
Научный руководитель

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор

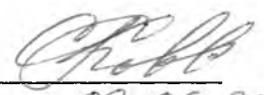

С.А. Коннова
08.06.2018

Научный консультант

Зав. лабораторией биохимии ИБФРМ РАН,
к.б.н., доцент


Ю.П. Федоненко
08.06.2018

Зав. кафедрой биохимии и
биофизики, д.б.н., профессор


С.А. Коннова
08.06.2018

Саратов, 2018

Введение. Галофильные микроорганизмы представляют особый интерес для исследования, так как имеют широкий спектр биотехнологического применения – это и производство биополимеров, морской соли, ферментация продуктов и многое другое. Для ряда галофильных микроорганизмов была показана способность разлагать углеводороды и другие токсичные химические вещества, что позволяет рассматривать их в качестве перспективных агентов биоремедиации комплексных загрязнений. Полисахариды бактериальной поверхности обладают большим потенциалом для использования в процессах извлечения нефти, фармацевтической и пищевой промышленности. Некоторые из них, связываясь с токсичными соединениями, такими как фенол, фосфорорганические соединения и другие, образующиеся при производстве либо использовании пестицидов и гербицидов, способствуют их дальнейшему разложению и, следовательно, очистке от них окружающей среды. При этом гликополимеры могут обладать выраженной биологической активностью в отношении теплокровных животных.

Галофильные микроорганизмы — это экстремофилы, способные расти в присутствии высоких концентраций хлористого натрия.

Объект исследования – липополисахариды (ЛПС) двух галофильных бактериальных изолятов, идентифицированных как *Chromohalobacter salexigens* 1QL3 и *Halomonas ventosae* 5S2, которые выделены из образцов соли из озер Карун (Египет) и Эльтон (Россия). Это грамотрицательные палочкоподобные бактерии, имеющие жгутики, растущие в условиях 5-25 % концентрации NaCl. Одним из компонентов бактериальной клетки, позволяющей ей адаптироваться к условиям солевого стресса, является ЛПС. ЛПС – это термостабильный компонент наружной части клеточной мембраны всех грамотрицательных микроорганизмов. ЛПС – амфифильная молекула, состоящая из следующих доменов: гидрофобный липид А, который заякоривает молекулу в фосфолипидном слое мембраны, и представляет собой гликолипид, а также гидрофильный домен, обращенный в

окружающую среду, который состоит из олигосахарида кора и О-специфического полисахарида (ОПС), построенного из повторяющихся олигосахаридных звеньев.

ЛПС грамотрицательных бактерий выполняет много важных для клетки функций: обеспечивает структурную целостность бактериальной клетки; защищает мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды; определяет антигенную специфичность; является одним из главных факторов патогенности, обладает эндотоксическими свойствами, определяемыми липидом А. В связи с этим характеристика их структурных особенностей является актуальной задачей.

Цель работы: охарактеризовать структуру липополисахаридов двух исследуемых изолятов галофильных грамотрицательных бактерий.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) выделить из бактериальной массы исследуемых бактерий препаративные количества ЛПС;
- 2) охарактеризовать химический состав липидных и углеводных компонентов ЛПС, а также гетерогенность молекулярных форм ЛПС;
- 3) определить структуру повторяющегося звена О-специфического полисахарида (ОПС) из ЛПС *Halomonas ventosae* 5S2.

Исследования выполнялись с использованием методов, адекватных поставленным задачам. Было проведено культивирование микроорганизмов в оптимальных для роста условиях, клетки отмыты, высушены ацетоном и из них выделены ЛПС экстракцией горячим фенолом. Охарактеризован химический состав компонентов ЛПС колориметрическими методами. Состав жирных кислот и моносахаридный состав углеводных компонентов изучены методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) после необходимой пробоподготовки. Гетерогенность препаратов ЛПС оценена методом электрофореза, а фракционирование компонентов ЛПС после гидролиза с помощью гель-фильтрации. Структурные особенности повторяющихся звеньев ОПС исследованы на основе анализа протонных и углеродных

спектров ЯМР.

Структура бакалаврской работы: работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен на основе анализа 51 источника, в нем рассмотрены следующие вопросы: общая характеристика галофильных микроорганизмов в том числе представителей родов *Halomonas* и *Chromohalobacter*; механизмы адаптации их к условиям повышенной солености; биотехнологические аспекты применения галофильных микроорганизмов и их метаболитов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Исследуемые бактериальные изоляты являются представителями семейства Halomonadaceae, но относятся к разным родам. Изолят 5S2 с озера Эльтон идентифицирован как *Halomonas ventosae*, а изолят, полученный из озера Карун 1QL3 как *Chromohalobacter salexigens*. Работа по идентификации осуществлялась аспирантом кафедры биохимии и биофизики СГУ им. Н. Г. Чернышевского И. М. Ибрахимом.

Данные микроорганизмы являются умеренно галофильными, т.е. демонстрируют способность к росту на средах с содержанием NaCl 5-20 %. Оба микроорганизма представляют собой свободноживущие единичные грамотрицательные палочки.

Нас интересовала структура поверхностных гликанов исследуемых бактерий, а поскольку они являются грамотрицательными, то в первую очередь наше внимание было обращено на основной компонент их внешней мембраны – липополисахарид.

Для получения препаративных количеств ЛПС необходимо сначала получить достаточное количество бактериальной массы, освободить ее от примесей капсульных полисахаридов и высушить ацетоном. Выход ЛПС составил для 1QL3–2,84 %, для 5S2 – 6 % от веса сухих клеток.

Были получены два препарата ЛПС исследуемых штаммов. Для ЛПС характеризовали биополимерный состав, электрофоретический профиль, состав жирных кислот и моносахаридов. Они содержали в своем составе

углеводы, КДО – характеристический для ЛПС компонент, и остатки фосфорной кислоты, которая часто входит в состав липидов А. Содержание всех компонентов представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Биополимерный состав ЛПС штаммов *C. salexigens* 1QL3 и *H. ventosae* 5S2.

Компоненты	Штамм	
	1QL3	5S2
	Содержание, %	
углеводы	18,3±1,6	27,9±2,5
белки	0,71±0,06	2,4±0,1
КДО	0,33±0,01	0,30±0,04
фосфор	1,78±0,21	1,14±0,25

В составе липидов А методом ГЖХ метиловых эфиров жирных кислот было показано присутствие предельных, непредельных и 3-гидроксиалкановых жирных кислот. Последние также являются характеристическими для ЛПС грамотрицательных бактерий. В составе обоих препаратов ЛПС преобладающими являлись 3-гидроксидодекановая кислота, гексадекановая и октадеценановая кислоты. В липиде А *H. ventosae* 5S2 также было показано присутствие гексадеценановой кислоты, а в липиде А *C. salexigens* 1QL3 – додекановой кислоты.

Результаты электрофореза в ДСН-ПААГ препаратов ЛПС свидетельствовали о том, что ЛПС штамма *C. salexigens* 1QL3 представлен, главным образом, молекулами R-формы, т.е. в гидрофильный компонент которых входит только коровый олигосахарид, в то время как в ЛПС штамма *H. ventosae* 5S2 преобладали S-формы молекул, причем для них отмечается характерная гетерогенность (так называемая лестница), обусловленная разной степенью полимеризации ОПС. Результаты электрофореза представлены на рисунке 1.

разной степени полимеризации ОПС. Результаты электрофореза представлены на рисунке 1.

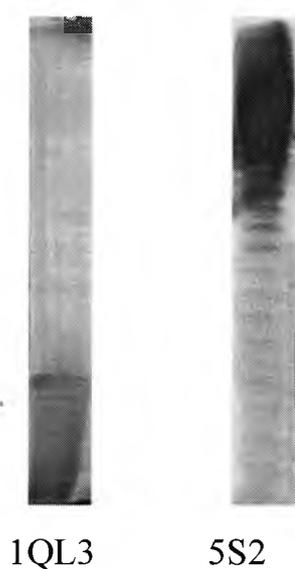


Рисунок 1 — Результат ДСН-ПААГ электрофореза ЛПС бактерий штаммов *C. salexigens* 1QL3 и *H. ventosae* 5S2.

Мягкий кислотный гидролиз ЛПС позволил разрушить кислотолабильную молекулу КДО, соединяющую липид А с олигосахаридом кора. ОПС и олигосахарид кора были фракционированы с помощью гель-фильтрации на колонке с Sephadex G-50. В результате были получены две фракции – ОПС и кор. Выход для ОПС штамма *H. ventosae* 5S2 составил 38,3 % и 13,5 % для олигосахарида кора от общей массы навески 100 мг. В гидролизате ЛПС *C. salexigens* 1QL3 было выявлено незначительное содержание ОПС – 2 %, а преобладающим компонентом гидрофильной части ЛПС этого штамма являлся коровый олигосахарид – около 40%, что согласуется с данными электрофоретического анализа.

Анализ моносахаридного состава методом ГЖХ ацетатов полиолов (рисунок 2) продемонстрировал, что в ЛПС обоих штаммов преобладают рамноза и глюкоза, но в несколько разных соотношениях.

Для ЛПС *H. ventosae* 5S25S2 выход ОПС составил около 30 %. Поэтому дальнейшие структурные исследования проведены для ОПС этого штамма. В его составе было установлено наличие 3-замещенных, 4-замещенных, 3,4-дизамещенных остатков рамнозы и терминального остатка глюкозы.

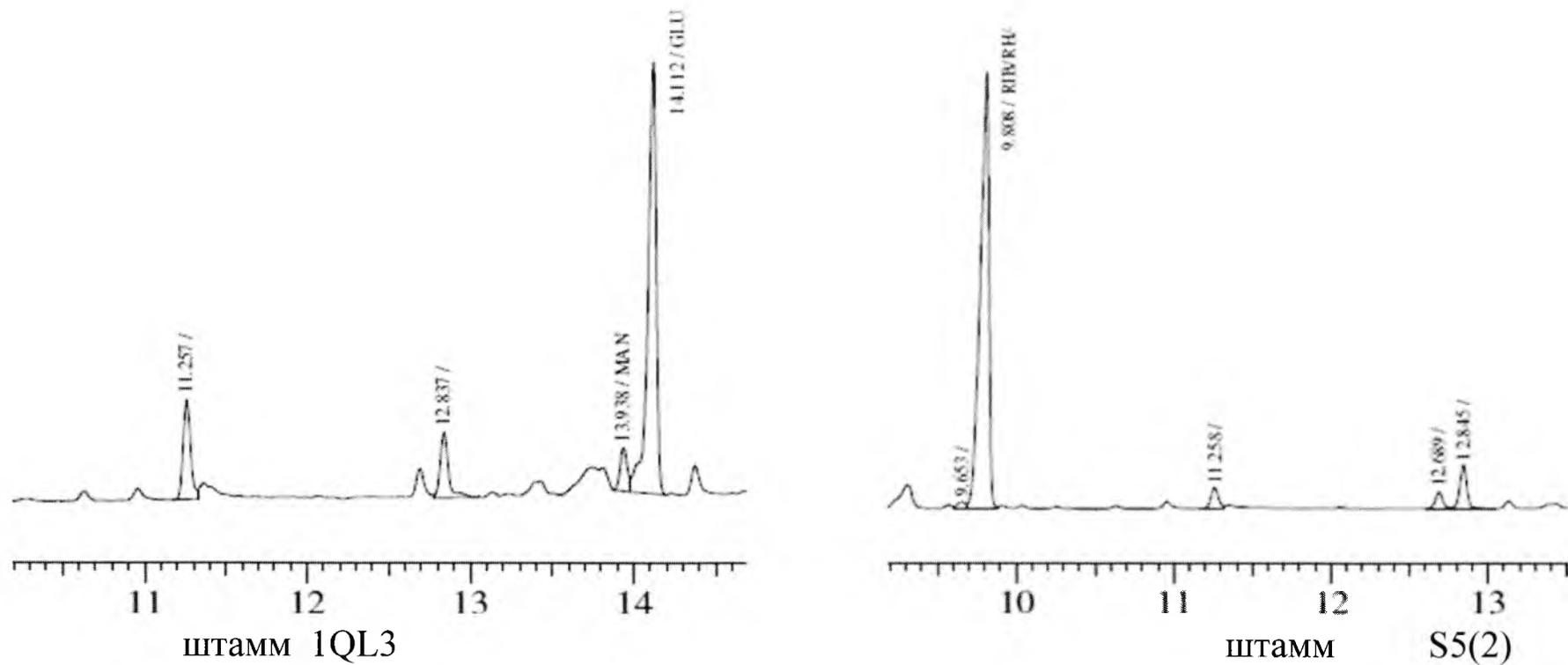


Рисунок 2 — Хроматограммы ГЖХ ацетатов полиолов ЛПС.

строения морфологических структур участвующих в адаптации.

Кроме этого, учитывая способность галофильных микроорганизмов продуцировать уникальных по своим свойствам соединения, отмечается возросший интерес к изучению их биотехнологического потенциала. Возможность широкого применения их в человеческой деятельности позволяет характеризовать их как практически значимые объекты.

В ходе работы была установлена структура ЛПС исследуемых микроорганизмов. Данный компонент имеет ряд важнейших функций, в том числе для адаптации к условиям высокой солености. Установление его структуры является существенным этапом в исследовании функциональной нагрузки этих молекул. Отмечается также и практическая значимость ЛПС в производственной деятельности. В настоящее время активно проводятся исследования по установлению структуры ЛПС И ОПС различных микроорганизмов, что отражается в появлении специальных баз данных о накопленных структурах. Это значительно облегчает процессы установления родства или сходства микроорганизмов. Однако, в большинстве случаев, установленные структуры являются уникальными для конкретного организма, что свидетельствует об их высокой вариабельности, которая позволяет успешно приспосабливаться к меняющимся условиям окружающей среды.

ВЫВОДЫ

1. Из биомассы изолятов двух штаммов галофильных бактерий 1QL3 и *H. ventosae* 5S2 были выделены препаративные количества липополисахаридов с выходами для 1QL3–2,84 %, для 5S2 6 % от веса сухих клеток.

2. В составе липополисахаридов галофильных бактерий штаммов 1QL3 и 5S2 показано наличие углеводов (18 и 28 % соответственно), 2- кето-3-дезоксиктоновой кислоты (до 0,3 %), фосфора от 1,1 до 1,8 %, и минимальной концентрации белков (от 0,7 до 2,4 %). Охарактеризован состав и соотношение жирных кислот в липидах А.

3. Из ЛПС *H. ventosae* 5S2 был получен O-специфический полисахарид, повторяющееся звено которого представлено пентасахаридом, в котором в основной цепи присутствуют α -1-3 и β -1-4 связанные остатки L-рамнозы, а в боковой цепи – терминальный остаток D-глюкозы.

