

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ  
ГЛИКОПОЛИМЕРОВ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ  
*HERBASPIRILLUM LUSITANUM P6-12***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Багавовой Арапат Рустамовны

Научный руководитель  
доцент, канд. биол. наук

\_\_\_\_\_

подпись, дата

Ю.П. Федоненко

Научный консультант  
канд. биол. наук

\_\_\_\_\_

подпись, дата

Н.С. Величко

Зав. кафедрой:  
профессор, док. биол. наук

\_\_\_\_\_

подпись, дата

С.А. Коннова

Саратов 2020

## Введение

**Актуальность работы.** Изучение взаимоотношений между растениями и микроорганизмами является одним из активно развивающихся направлений современной биологии. Наибольший интерес для исследований представляют эндофиты, колонизирующие внутренние ткани растения и не оказывающие отрицательного влияния на его развитие.

*Herbaspirillum* spp. грамотрицательные  $\beta$ -*Proteobacteria* широко распространенные в окружающей среде [1, 2]. Одним из двух представителей рода гербаспирилл, обнаруженных в клубеньках бобовых, является *Herbaspirillum lusitanum* P6-12.

Существенную роль в формировании ассоциативных взаимодействий играют биополимеры бактериальной поверхности [3]. Их детальное изучение может внести существенный вклад в понимание молекулярных механизмов формирования и функционирования симбиоза микроорганизм–макропартнер.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы является оценка способности к биопленкообразованию, выделение и характеристика биополимеров планктонной и биопленочной форм бактерий *H. lusitanum* P6-12, исследование особенностей взаимодействий *H. lusitanum* P6-12 с фасолью обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*).

Для реализации цели решали следующие задачи:

1. изучение способности к биопленкообразованию *H. lusitanum* штамма P6-12 на абиотических поверхностях;
2. выделение гомогенных препаратов биополимеров из планктонной и биопленочной форм роста культуры *H. lusitanum* P6-12;
3. анализ различий выделенных биополимеров;
4. оценка устойчивости *H. lusitanum* P6-12 к стрессу, вызванному химическими соединениями;
5. исследование колонизирующей активности *H. lusitanum* P6-12 в отношении фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*).

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являются граммотрицательные бактерии *H. lusitanum* P6-12, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Питательная среда для выращивания микроорганизмов готовилась согласно [4]. Микроорганизмы культивировали до окончания экспоненциальной фазы роста. В стационарных условиях на поверхности жидкой среды, гидрофобной и гидрофильной поверхностях при температуре 30 °С происходило формирование биопленки.

Выделение биополимеров из планктонных клеток осуществляли следующим образом. Культуральную жидкость отделяли от биомассы центрифугированием, затем с поверхности клеток отмывали капсульный материал. Культуральную жидкость и капсульный материал концентрировали на вакуумном роторном испарителе и диализовали 2 суток против  $H_2O_{\text{дист}}$ . При добавлении в полученную суспензию этанола, выпадал осадок, который отделяли центрифугированием и лиофилизировали. Таким образом получили грубые экстракты КПС и ЭПС. После растворения их в воде и ультрацентрифугирования образовался прозрачный гелеобразный осадок (КПС I) и супернатанты. Препараты очищали от солей и пигментов хроматографией на колонке с Sephadex G-50. В результате получили образцы ЭПС, КПС I и КПС II.

Для изучения ПС из биопленочной культуры использовали биопленку, образованную на поверхности жидкой среды в микроаэробных условиях без встряхивания при 30 °С. Биопленку отделили от культуральной жидкости путем пропускания ее через стальное решето, затем промыли, дважды обработали ультразвуком и центрифугировали. Супернатант, содержащий ВПМ, концентрировали и диализовали 48 ч против дистиллированной воды.

Культуральную жидкость, в которой росли биопленки, собирали, концентрировали и центрифугировали. Получили клетки, которые не были в составе биопленки и культуральную жидкость. Клетки отмыли от капсулы и

получили капсульный полисахарид клеток, вышедших из биопленки (КПС<sub>ВБФ</sub>). Культуральную жидкость диализовали и получили ЭПС<sub>СВ</sub>.

Анализ полученных образцов биополимеров включал определение содержания углеводов [5], белков [6], КДО [7] и фосфора [8]. Определение моносахаридного состава и состава жирных кислот осуществляли с помощью ГЖХ частично метилированных ацетатов полиолов.

Устойчивость *H. lusitanum* P6-12 к химическим соединениям определяли путем внесения в жидкую культуру серий разведений фенола, SDS, нарингенина и рутина. Через 24 ч измеряли оптическую плотность относительно контроля [9].

При изучении колонизирующей активности *H. lusitanum* P6-12 в качестве растительного объекта использовали проростки фасоли обыкновенной (*P. vulgaris*), выращиваемые в стерильных условиях. Предварительно семена фасоли подвергали поверхностной стерилизации [10] и проращивали 48 ч на минеральной среде. Затем корни *P. vulgaris* инкубировали культурой и помещали в пробирки с питательной средой для растений. Корни 3-дневных проростков анализировали через 1, 3, 4, 5, 6 и 7 дней после инокуляции. После этих интервалов примерно 0,05 г корней подвергали поверхностной стерилизации, гомогенизировали, разбавляли ФБ и наносили на твердую среду. Через 48 ч определяли количество КОЕ с помощью чашечного метода Коха [11].

**Структура и объем работы.** Работа включает в себя такие структурные элементы, как Содержание, Обозначения и сокращения, Введение, Основная часть, Заключение, Выводы и Список литературы. Работа проиллюстрирована 8 рисунками и 3 таблицами. Список литературы состоит из 102 наименований. Объем работы составляет 51 страница.

### **Основное содержание работы**

Глава «Основная часть» содержит анализ данных о генетических и физиолого-морфологических особенностях *Herbaspirillum* spp, о роли

экзополисахаридов бактерий, об особенностях образования биопленки, о формировании взаимоотношений между микроорганизмами и растениями.

Глава «Результаты исследования и их обсуждение» включает экспериментально полученные данные о способности штамма *H. lusitanum* P6-12 к биопленкообразованию на абиотических поверхностях. При постоянном перемешивании в микроаэрофильных условиях получили планктонную культуру, достигающую стационарной фазы роста к 12 часам. В стационарных условиях культивирования через 3 дня после инокуляции жидкой среды культурой на ее поверхности начинался процесс биопленкообразования. В течение 7 суток рост биопленки продолжался, увеличивалась ее толщина. Биопленки выращивали также на гидрофильной (стекло) и гидрофобной (полистирол) поверхностях.

Интенсивность биопленкообразования на гидрофобной поверхности достигала максимального значения на 7 сутки исследования. Сравнивая результаты по интенсивности биопленкообразования исследуемой культурой и других бактериальных штаммов, определено, что *H. lusitanum* P6-12 характеризуется низкой способностью к формированию биопленки на поверхности полистирола.

На гидрофильной поверхности через 24 часа от начала эксперимента, с применением специфического окрашивания и световой микроскопии наблюдали упорядоченное расположение бактерий, объединенных межклеточным матриксом. Показано, что *H. lusitanum* P6-12 хорошо образует биопленки на гидрофильных поверхностях.

В результате выделения и изучения ПС планктонных клеток были получены данные об их биополимерном составе. Показано наличие в ЭПС и КПС углеводов, белка, фосфора и КДО. Методом ГЖХ после метанолиза в препаратах ЭПС и КПС были найдены кислоты с длиной цепи от C<sub>10</sub> до C<sub>18</sub>. Основными по содержанию в КПС были 3-ОН-C<sub>10:0</sub>, 3-ОН-C<sub>12:0</sub>, C<sub>12:0</sub>, 2-ОН-C<sub>12:0</sub>. КПС отличался от ЭПС наличием C<sub>16:0</sub> и C<sub>17:0</sub> кислот. Кроме того, в КПС

были найдены  $C_{16:1}$  и  $C_{18:1}$  (от 3 до 6%), а также изо- и антиизоалкановые ЖК, суммарное содержание которых составило ~ 1% для каждого из препаратов.

Наличие КДО и гидроксикислот в составе препаратов ЭПС и КПС могло свидетельствовать о том, что они представлены экстраклеточными формами ЛПС. Для выделения ЛПС из исходных препаратов ЭПС и КПС мы воспользовались методом ультрацентрифугирования их 10% водных растворов. Для КПС был получен гелеобразный осадок и супернатант. Для ЭПС ультрацентрифугированием не удалось получить гелеобразный осадок. Для исследования отбирали супернатанты и осадок, предположительно являющийся капсульным липополисахаридом. Гель-фильтрацией всех образцов после ультрацентрифугирования получили ЭПС II, КПС I и КПС II. В их составе были найдены углеводы, КДО, фосфор и белок.

Основными по содержанию кислотами в ЭПС II были 3-ОН- $C_{10:0}$ , 2-ОН- $C_{12:0}$ ,  $C_{12:0}$ , 3-ОН- $C_{12:0}$ , а также три неидентифицированных кислоты (ЖК1, ЖК2 и ЖК3). Профили ЖК КПС I и КПС II были представлены 3-ОН- $C_{10:0}$ , 2-ОН- $C_{12:0}$ ,  $C_{12:0}$ , 3-ОН- $C_{12:0}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{17:0}$  и  $C_{18:1}$  кислотами.

Анализ моносахаридного состава КПС I и КПС II показал преобладание Gal и GlcN в соотношении 1:2 и 1:1 соответственно. В меньших количествах были обнаружены Glu, Glyc и Ery. В составе ЭПС мажорным компонентом оказалась Glu, содержание которой составляло 72,1 %. Помимо упомянутых выше сахаров, экстраклеточный ПС имел в своем составе Ara, Man и Rha. Интересен тот факт, что в КПС I и КПС II содержится Ery, который полностью отсутствует в образцах ПС из биопленочной культуры.

Для выяснения химического состава ПС биопленочной формы взяли биопленку, образованную на поверхности жидкой среды. Из биопленки получили ВПМ, ЭПС<sub>СВ</sub> и капсульные полисахариды из клеток, вышедших из биопленки (КПС<sub>ВБФ</sub>). В составе этих препаратов были найдены углеводы, белки, фосфор и КДО. Также показано присутствие незначительного количества углеводов.

Анализ состава жирных кислот выделенных образцов выявил наличие насыщенных, ненасыщенных жирных и оксикислот с длиной цепи от 10 до 18 углеродных атомов. Доминировали  $C_{16:0}$  и  $C_{12:0}$  кислоты, содержание которых было значительным как в условиях биопленочной модели роста, так и в условиях планктона. Из оксикислот присутствовали 3-ОН- $C_{12:0}$ , 2-ОН- $C_{12:0}$ . Необходимо отметить, что ненасыщенные жирные кислоты  $C_{16:1}$  и октадеценовая  $C_{18:1}$  выявлены только в экзополимерах биопленочной формы роста. Считают, что присутствие подобных жирных кислот является способом адаптации микроорганизмов к условиям среды обитания. Ненасыщенные жирные кислоты в экзополимерном комплексе биопленки способствует увеличению ее активности. Липиды, вступая в связи с другими видами молекул, особенно с белками и полисахаридами, способствуют стабилизации экзополимерного матрикса. Для экзополимеров биопленки показано присутствие  $C_{15:0}$  кислот, чаще всего обнаруживаемых у гидрофобных бактерий. В то время как в экзополимерах планктонной культуры данная кислота полностью отсутствовала.

При анализе моносахаридного состава ВПМ, ЭПС<sub>СВ</sub> и КПС<sub>ВБФ</sub> было показано, что преобладающим компонентом является Glu, и на ее долю приходится от 35 до 75 %. В ВПМ также были обнаружены Gal, GlcN, Man и Rha; содержание каждого из них не превышало 4–8 %. Главным отличием ЭПС<sub>СВ</sub> и КПС<sub>ВБФ</sub> от ВПМ было наличие в их составе Ara и Gluc.

Была оценена устойчивость штамма *H. lusitanum* P6-12 к действию химического стресса. В результате проведения эксперимента выяснили, что *H. lusitanum* P6-12 реагирует отсутствием роста на химический стресс, вызванный фенолом и SDS, однако устойчив к защитным метаболитам растений, таким как нарингенин и рутин.

В литературе имеются данные о том, что штамм *H. lusitanum* P6-12 обладает значительным потенциалом к эндофитной колонизации фасоли обыкновенной (*P. vulgaris*), и это было подтверждено в ходе исследования. Из

ризосферы бактерии проникают в корни фасоли и колонизируют растение изнутри, со временем распространяясь на другие его части.

Результаты показали, что данные бактерии заселяют корни *P. vulgaris* постепенно с первого по седьмой день после инокуляции. Количество бактерий, полученных из поверхностно стерилизованных корней, увеличилось с 4,75 lg КОЕ/г в 1-й день после инокуляции до 6,99 lg КОЕ/г на 7-й день после инокуляции. Положительная динамика наблюдалась и в отношении стебля *Phaseolus vulgaris*. Количество бактериальных клеток увеличилось с 3,92 lg КОЕ/г с начала его развития до 6,23 lg КОЕ/г на 7-й день эксперимента.

### Выводы

1. Показана способность *H. lusitanum* P6-12 образовывать стабильную биопленку на поверхности жидкой среды в стационарных условиях культивирования. Отмечена низкая интенсивность биопленкообразования культурой *H. lusitanum* P6-12 на гидрофобной поверхности и высокая – на гидрофильной.
2. Проведено выделение образцов биополимеров бактерий *H. lusitanum* P6-12 в различных условиях роста. Показано, что в культуральной жидкости содержался комплекс ПС с липидом.
3. Произведен сравнительный анализ биополимерного состава, а также состава жирных кислот экстраклеточных ПС бактерий *H. lusitanum* P6-12 в различных условиях роста. Показаны, отличия биополимерного состава полисахаридов планктонной и биопленочной форм роста. Полисахаридсодержащие компоненты биопленочной культуры содержат больше белков, чем углеводов. Такие белки отвечают за адгезию клеток. В экзополимерах биопленочной формы роста выявлены C<sub>16:1</sub> и C<sub>18:1</sub> кислоты, в то время как у планктонной культуры такие кислоты обнаружены не были. Очевидно, что присутствие подобных ЖК является способом адаптации микроорганизмов к условиям среды обитания. Капсульные ПС планктонных клеток содержали остатки глицерола и эритритола, в отличие от гликополимеров биопленочной культуры, в составе которых был обнаружен только глицерол.

4. Показана различная устойчивость штамма Р6-12 к химическим соединениям. *H. lusitanum* устойчив к минимальным концентрациям нарингенина, рутина, фенола и SDS.
5. Доказана способность *H. lusitanum* Р6-12 колонизировать корни фасоли обыкновенной *P. vulgaris*. Вследствие стремительного размножения бактерий, происходит их проникновение в стебель и листья растения.

### Список литературы

1. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb.nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3 / J. I. Baldani [et al.] // Int J Syst Bacteriol. – 1996. – V. 46. – P. 802-810.
2. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in the leaves of *Sorghum bicolor* / E. K. James [et al.] // J. Exp. Bot. – 1997. – V. 48. – P. 785-798.
3. Maize root lectins mediate the interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-acetyl glucosamine residues of lipopolysaccharides / E. Balsanelli [et al.] // PLoS One. – 2013. – V. 8.
4. Оводов, Ю. С. Химия иммунитета / Ю. С. Оводов. – Сыктывкар: Изд-во Сыктывкарского ГУ, 1997. – 203 с.
5. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois [et al.] // Anal. Chem. – 1956. – V. 28, N. 3. – P. 350-356.
6. Bredford, M. A rapid and sensitive method for protein analysis the principle of protein-dye binding / M. Bredford // Anal. Biochem. – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
7. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria / D. Karkhanis [et al.] // Anal. Biochem. – 1978. – V. 85, N. 2. – P. 595-601.

8. Berenblum, I. An improved method for the colorimetric determination of phosphate / I. Berenblum, E. Chain // *Biochem. J.* – 1938. – V. 32, N. 2. – P. 295-298.
9. Exopolysaccharide biosynthesis enables mature biofilm formation on abiotic surfaces by *Herbaspirillum seropedicae* / E. Balsanelli [et al.] // *PLoS ONE.* – 2014. – V. 9, N. 10.
10. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae* / M. A. Schmidt [et al.] // *Braz. J. Med. Biol. Res.* – 2011. – V. 44, N. 3. – 182-185.
11. Лавренчук, Л. С. Микробиология: практикум / Л. С. Лавренчук, А. А. Ермошин; М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Урал. федер. ун-т. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2019. – 107 с.