

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**ВЫЯВЛЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ОСОБЕННОСТЕЙ
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ *HALOMONAS*
CASEINILYTICA EG33S7QL И *HALOMONAS SALINA* EG19S7QL**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Матевосян Соны Гайковны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

(подпись, дата)

М.В. Каневский

Научный консультант:

к.б.н., с.н.с. лаборатории
биохимии ИБФРМ РАН

(подпись, дата)

Е.Н. Сигида

Зав. кафедрой:

д.б.н., профессор

(подпись, дата)

С.А. Коннова

Саратов 2020

Введение. Весьма востребованным в микробиологии и биохимии является изучение галофильных бактерий — микроорганизмов, обитающих в условиях высокой солёности — солончаках, солёных озёрах, морях и океанах. Благодаря особенностям строения и метаболизма галофильные микроорганизмы способны к активной жизнедеятельности в средах с высоким содержанием NaCl.

Галофильные бактерии представляют особый интерес для исследований, так как имеют широкий спектр биотехнологического применения — они перспективны при получении ферментов, утилизации органических отходов, синтезе биополимеров, а также в пищевой биотехнологии.

Основным компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий, обеспечивающим взаимодействие с окружающей средой, является липополисахарид (ЛПС), который у галофильных микроорганизмов часто характеризуется наличием уникальных по структуре компонентов. С одной стороны, строение ЛПС галофильных бактерий вызывает интерес исследователей для построения бактериальных внутривидовых серологических классификационных схем, а с другой стороны, может использоваться для изучения механизмов адаптации микроорганизмов к условиям засоления.

Объектами данной работы являлись штаммы *Halomonas caseinilytica* EG33S7QL и *Halomonas salina* EG19S7QL, выделенные среди других изолятов галофильных и галотолерантных микроорганизмов из образцов соли озера Карун (Египет) и охарактеризованные ранее на Кафедре биохимии и биофизики СГУ им. Н.Г. Чернышевского и в лаборатории биохимии ИБФРМ РАН.

Целью данной работы являлось выявление структурных особенностей компонентов ЛПС внешней мембраны галофильных бактерий *H. caseinilytica* EG33S7QL и *H. salina* EG19S7QL.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1) культивирование исследуемых штаммов и выделение из бактериальной массы препаративных количеств ЛПС;

2) определение содержания в ЛПС углеводов, 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) и фосфатов, состава моносахаридов и жирных кислот;

3) оценка макромолекулярной организации ЛПС в полиакриламидном геле (ПААГ), выделение О-специфических полисахаридов (ОПС) и липидов А;

4) применение инфракрасной спектроскопии (ИК-спектроскопия) для анализа состава ЛПС.

Исследование выполнялось с использованием современных методов, обычно используемых для решения поставленных задач. Проведено культивирование бактерий в оптимальных для роста условиях. Из биомассы изолятов выделены препаративные количества ЛПС. Колориметрическими методами охарактеризован биополимерный состав ЛПС. Хроматографическими методами определён моносахаридный и жирнокислотный состав ЛПС. Методом электрофореза в ПААГ исследована молекулярная гетерогенность ЛПС. Методами гидролиза и гель-фильтрации выделены фракции ОПС и липидов А. Методом ИК-спектроскопии выявлены характерные для ЛПС функциональные группы.

Структура бакалаврской работы: работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы написан на основе анализа 72 источников, в нём рассмотрены следующие вопросы: общая характеристика галофильных бактерий, в том числе бактерий рода *Halomonas*; их характеристика по отношению к засолённости среды; механизмы адаптации галофильных бактерий к засолённости среды; биотехнологические аспекты использования галофильных бактерий; структурные исследования ЛПС бактерий рода *Halomonas*.

Основное содержание работы. Для реализации цели исследования проводили культивирование галофильных бактерий *H. caseinilytica* EG33S7QL и *H. salina* EG19S7QL в жидкой питательной среде на основе ГРМ до окончания экспоненциальной фазы роста. Для получения биомассы,

достаточной для препаративного выделения ЛПС, было получено 1,5 л культуры *H. caseinilytica* EG33S7QL и 3 л культуры *H. salina* EG19S7QL.

После культивирования бактериальные клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 0,15 М NaCl для освобождения от капсульного материала, поскольку наличие капсульных гликополимеров затрудняет интерпретацию результатов структурного исследования ЛПС. Клетки дегидрировали ацетоном, высушивали на воздухе и диспергировали. В результате выход сухой биомассы для *H. caseinilytica* EG33S7QL составил 1,3 г/л, для *H. salina* EG19S7QL — 1,7 г/л.

Экстракцию ЛПС из высушенных бактериальных клеток проводили модифицированным методом Вестфаля — горячим водным фенолом без разделения фаз. Выход ЛПС для *H. caseinilytica* EG33S7QL составил 23,4 % от сухой биомассы, а для *H. salina* EG19S7QL — 3,2%.

Исследование биополимерного состава ЛПС колориметрическими методами показало наличие всех характерных для ЛПС компонентов — углеводов, включая КДО, а также остатков фосфорной кислоты (таблица 1).

Таблица 1 – Биополимерный состав ЛПС штаммов *H. caseinilytica* EG33S7QL и *H. salina* EG19S7QL (содержание, %)

Компоненты	ЛПС штамма	
	EG33S7QL	EG19S7QL
Углеводы	34,5 ± 3,8	12,6 ± 1,2
КДО	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,00
Фосфор	2,6 ± 0,4	4,8 ± 1,9

Содержание углеводов, определённое фенол-сернокислотным методом, составляло ~35 % от массы ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL и ~13% от массы ЛПС *H. salina* EG19S7QL. Невысокий процент углеводов мог свидетельствовать как о низкой молекулярной массе ОПС и высоком содержании R-форм в составе ЛПС, так и о присутствии аминсахаров, не

образующих окрашенные соединения в ходе данной реакции, либо заместителей неуглеводной природы.

КДО является универсальным структурным маркером ЛПС — связующим звеном между липидом А и олигосахаридом кора. КДО присутствует во всех молекулах ЛПС, таким образом, наличие этого компонента подтверждает, что выделенные нами препараты относятся к классу ЛПС.

Наличие фосфора, а точнее фосфатных групп, в составе липида А, обуславливает отрицательный заряд молекулы ЛПС, что увеличивает её «сродство» к катионам или другим положительно заряженными молекулам, а также обеспечивает стабилизацию гидрофобной части молекулы ЛПС. Высокое содержание фосфатов в ЛПС могло указывать как на наличие примесей фосфолипидов в ЛПС, так и на присутствие фосфатных групп в ОПС.

При спектрофотометрическом анализе методом Бредфорда в исследуемых ЛПС выявлялось присутствие примесного белкового компонента (13-15%), однако окрашивание ЛПС после электрофоретического разделения в ПААГ красителем Кумасси голубым R-250 не подтвердило его присутствие.

Исследование молекулярной гетерогенности ЛПС обоих штаммов методом электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием красителем на основе AgNO_3 после периодатного окисления продемонстрировало присутствие на электрофореграммах (рисунок 1, А) полос в средней части трека для обоих ЛПС, что указывало на невысокую молекулярную массу ОПС исследуемых штаммов, и согласовалось с невысоким процентным содержанием углеводов в составе ЛПС данных штаммов. Однако, визуализация ЛПС исследуемых штаммов после электрофореза красителем толуидиновым синим позволила сделать вывод о наличии в ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL высокомолекулярных отрицательно заряженных компонентов (рисунок 1, Б). Фиолетовое окрашивание свидетельствовало о наличии сульфатных групп, которые также могли повлиять на результаты анализа содержания углеводов.

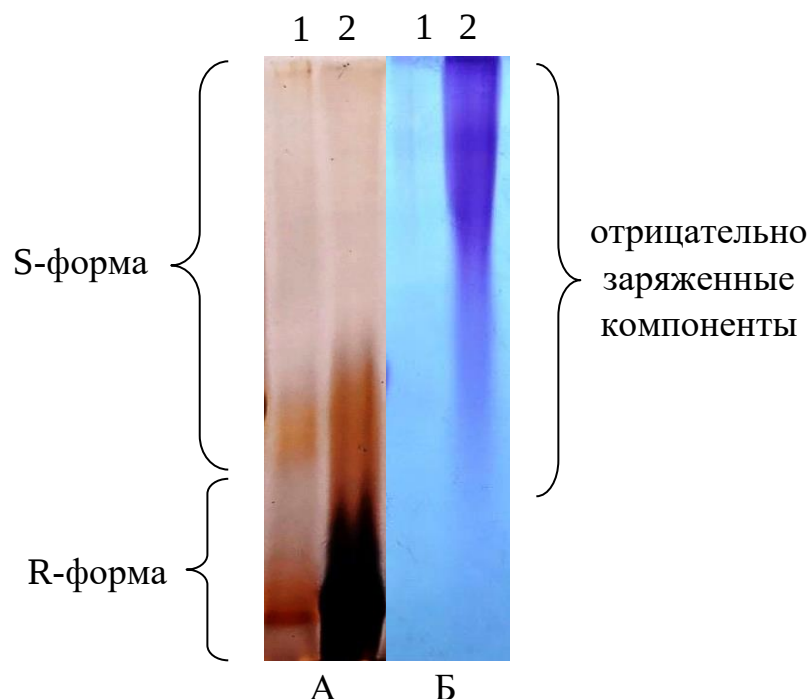


Рисунок 1 – Электрофореграмма ЛПС в ПААГ при окрашивании AgNO_3 после периодатного окисления (А) и толуидиновым синим (Б);
1 – *H. salina* EG19S7QL; 2 – *H. caseinilytica* EG33S7QL

Структурный анализ целой молекулы ЛПС затрудняется её амфифильной природой и способностью к образованию мицелл. Поэтому нами были получены отдельные структурные компоненты ЛПС — ОПС и липид А. Для этого был проведён мягкий гидролиз ЛПС в 2%-ной уксусной кислоте, в результате которого был получен осадок липида А и полисахарид-содержащий супернатант, который впоследствии был фракционирован гель-фильтрацией.

Профили элюции супернатантов, полученных после гидролиза ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL и *H. salina* EG19S7QL, представлены на рисунке 2. В результате фракционирования с выходом 35% от массы ЛПС был выделен препарат ОПС *H. caseinilytica* EG33S7QL, элюировавшийся с нулевым объёмом, а также три фракции олигосахаридных препаратов.

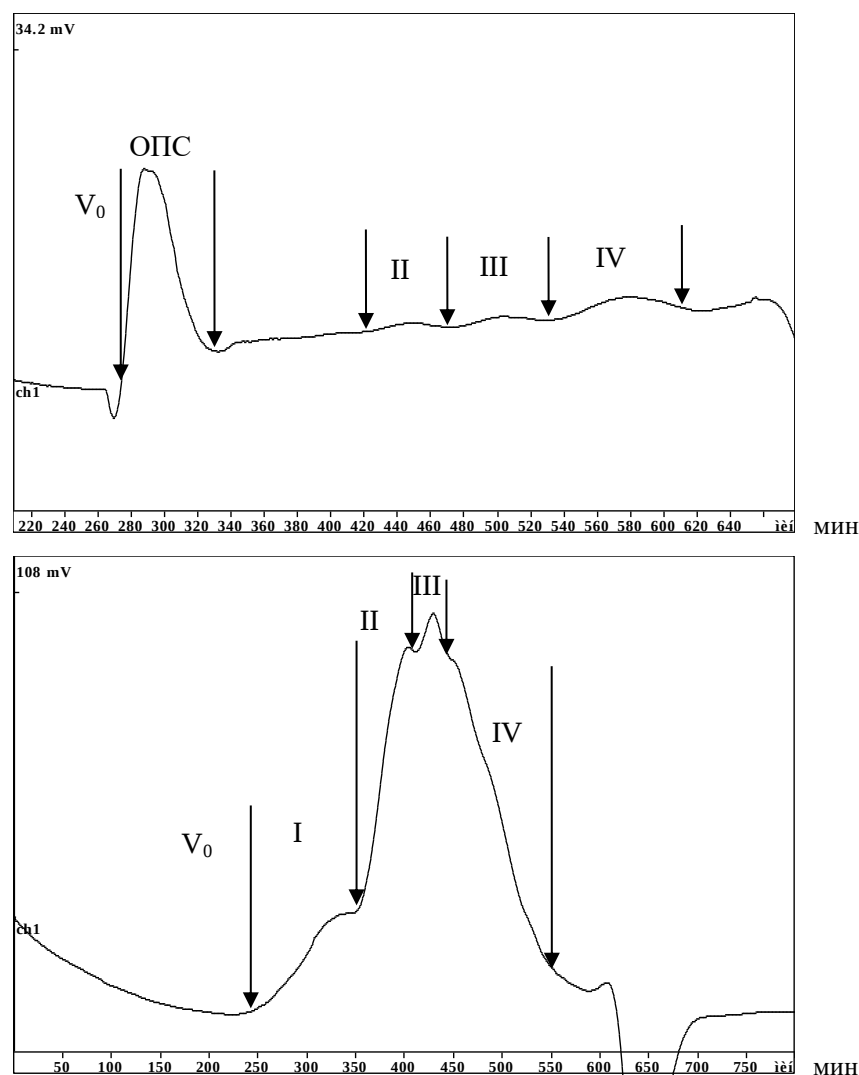


Рисунок 2 – Профиль элюции углеводсодержащей фракции ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL (вверху) и *H. salina* EG19S7QL (внизу) на колонке с Sephadex G-50. Римскими цифрами обозначены собранные фракции

Мягкий кислотный гидролиз ЛПС *H. salina* EG19S7QL сопровождался образованием ряда соединений в широком диапазоне молекулярной массы, что могло быть вызвано наличием кислотолабильных компонентов в составе ОПС. В связи с этим для дальнейшего структурного анализа был проведён мягкий щелочной гидролиз ЛПС в 12,5%-ном растворе NH_4OH и после обессоливания на колонке Toyopearl TSK HW-40 выделен препарат ЛПС-ОН EG19S7QL с выходом 52%.

Для характеристики моносахаридного состава углеводной составляющей ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL и *H. salina* EG19S7QL был проведён анализ

методом ГЖХ ацетатов полиолов, полученных после полного кислотного гидролиза ЛПС. Хроматограммы моносахаридного состава ЛПС вышеуказанных штаммов представлены на рисунках 3 и 4, соответственно.

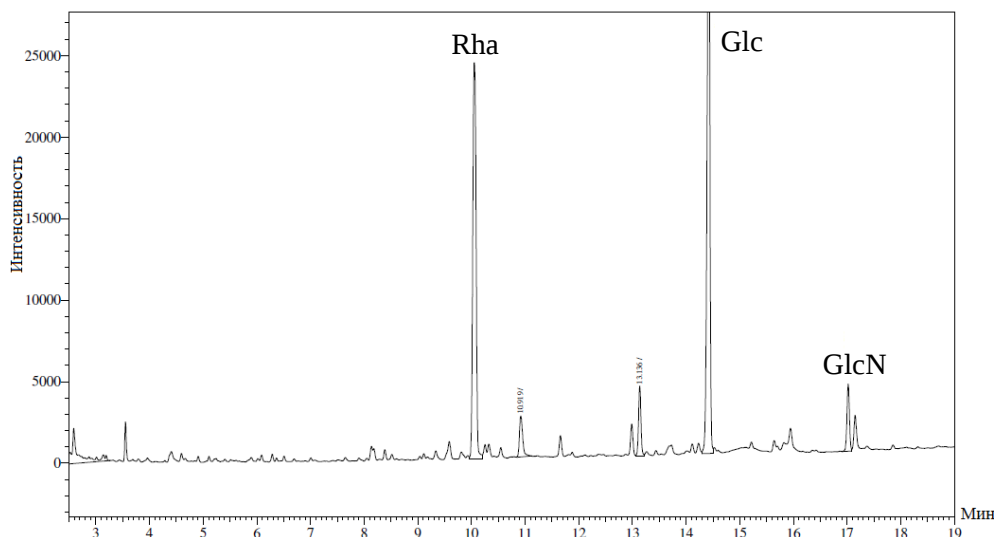


Рисунок 3 – Хроматограмма ГЖХ ацетатов полиолов ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL

Преобладающими моносахаридами в составе ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL являлись глюкоза (54,5%) и рамноза (40,4%), в меньшем количестве обнаружен глюкозамин (5,1%). В составе ЛПС *H. salina* EG19S7QL из идентифицированных моносахаридов преобладала глюкоза (67,5%), также выявлены галактозамин (20,5%), галактоза (7%) и рамноза (5%). Кроме того, на хроматограмме присутствовал интенсивный пик X с временем удерживания 9,485 мин, содержание которого в 1,5 раза превышало содержание глюкозы. Данный пик, предположительно, относится к производному метилированной рамнозы, однако его идентификация на данном этапе работы произведена не была ввиду отсутствия эталонного стандарта моносахарида.

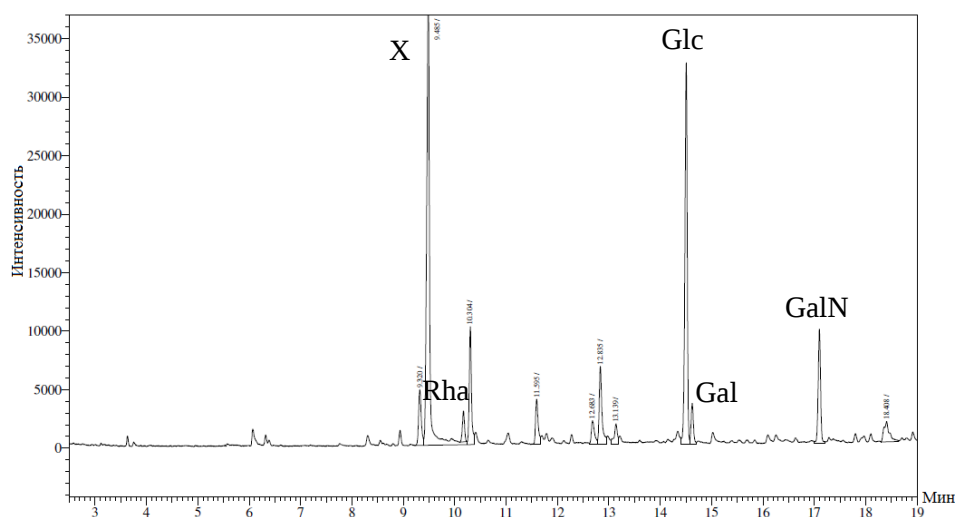


Рисунок 4 – Хроматограмма ГЖХ ацетатов полиолов ЛПС *H. salina* EG19S7QL

Мягкий кислотный гидролиз ЛПС приводил к образованию осадка липида А. После экстракции от примесных соединений смесью хлороформа, метанола и воды в соотношении 10:10:9 липиды А анализировали методом ТСХ, которая продемонстрировала их структурную гетерогенность (рисунок 5). В составе каждого препарата было обнаружено не менее пяти компонентов с разной подвижностью, которая может указывать на наличие молекул различной степени «зрелости», отличающихся степенью ацилирования и фосфорилирования.



Рисунок 5 – Хроматограмма липида А *H. caseinilytica* EG33S7QL (1) и *H. salina* EG19S7QL (2)

Методом ГЖХ в составе ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL и *H. salina* EG19S7QL после метанолиза была идентифицирована маркерная для липида А рода *Halomonas* 3-гидроксидодекановая кислота. Также были обнаружены следующие характеристичные для *Halomonas* spp. жирные кислоты: в ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL — додекановая кислота, а в ЛПС *H. salina* EG19S7QL — тетрадекановая, содержание которых было существенно ниже, чем 3-гидроксидодекановой кислоты.

Далее проводилось исследование ЛПС методом ИК-Фурье спектроскопии. ИК-спектр ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL (рисунок 6) имел характерную для этого класса соединений картину. В области высоких частот 3500 см^{-1} наблюдалась широкая полоса поглощения валентных колебаний гидроксильных групп. В регионе $2955\text{--}2853\text{ см}^{-1}$ присутствовали полосы поглощения валентных симметричных и антисимметричных С-Н колебаний метильных и метиленовых групп жирных кислот. Деформационные С-Н колебания этих групп обуславливали наличие полос поглощения в области 1453 см^{-1} . В области 1643 см^{-1} присутствовала характеристическая интенсивная полоса (амид I), обусловленная сложным колебанием, в котором, кроме карбонильной группы, принимает участие связь С-N. Кроме того, в спектре присутствовала полоса поглощения в области 1256 см^{-1} валентных колебаний фрагмента S=O и указывало на наличие сульфатов, что соответствовало данным электрофореза, продемонстрировавшего присутствие отрицательно заряженных групп. В области «отпечатков пальцев» содержались полосы поглощения, отнесённые к колебаниям С-О-С гликозидных связей (1158 см^{-1}) и С-ОН колебаний (1059 см^{-1}) углеводных остатков.

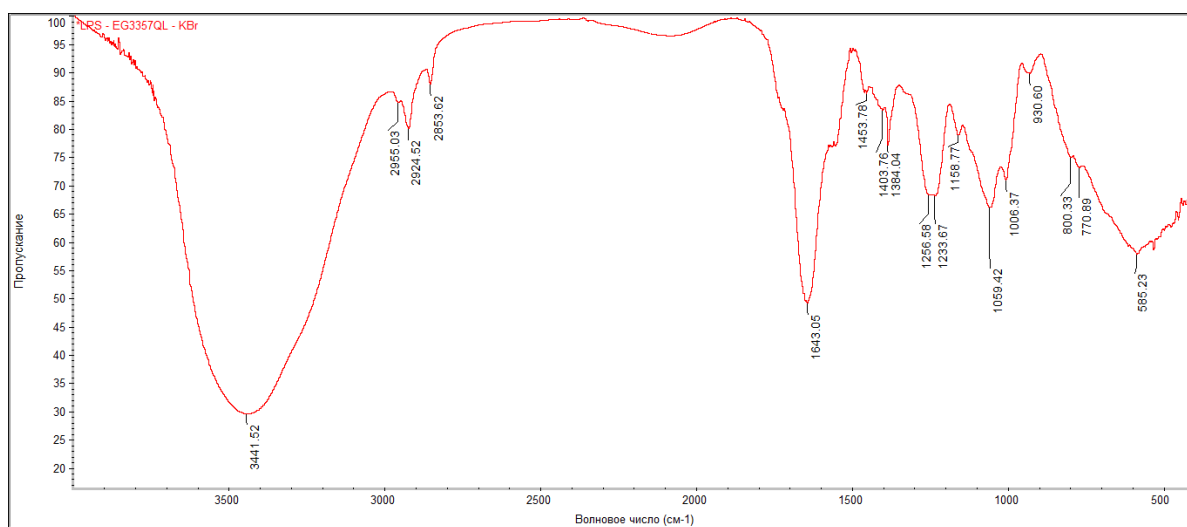


Рисунок 6 – ИК-спектр ЛПС EG33S7QL

Закключение. Галофильные бактерии приспособлены к обитанию в высоко засолённых средах благодаря различным механизмам адаптации, реализующимся благодаря особенностям метаболизма, строения мембран и т.д. В этом аспекте актуальным является изучение стратегий выживания организмов в данной экологической нише и анализ строения гликополимеров поверхности, участвующих в адаптации. Способность галофильных микроорганизмов продуцировать уникальные по структуре и свойствам соединения также обуславливает возросший интерес исследователей к изучению их биотехнологического потенциала.

ЛПС являются одними из основных компонентов внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий и представляют собой специфический класс биополимеров, которые обладают широким спектром биологического действия. Изучение ЛПС направлено на решение таких фундаментальных задач, как классификация бактерий и выяснение взаимосвязи между структурой и функцией ЛПС. Структура ЛПС является одним из хемотаксономических критериев, позволяющих устанавливать филогенетическое родство и прослеживать пути эволюции микроорганизмов.

В ходе проведения данного исследования были изучены структурные особенности компонентов ЛПС внешней мембраны галофильных бактерий *H. caseinilytica* EG33S7QL и *H. salina* EG19S7QL. Полученные данные являются

первым шагом в установлении полной структуры ЛПС исследуемых штаммов бактерий.

Выводы:

1. Проведено культивирование галофильных бактерий *H. caseinilytica* EG33S7QL и *H. salina* EG19S7QL в жидкой питательной среде на основе ГРМ. Из бактериальной массы изолятов выделены и очищены от примесей белков и нуклеиновых кислот препаративные количества ЛПС с выходами 23,4% и 3,2% от сухой биомассы, соответственно.

2. С применением колориметрических методов исследования в ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL и *H. salina* EG19S7QL определено содержание характеристичных компонентов: углеводов, КДО и фосфора. Электрофореграммы ЛПС в ПААГ после окрашивания на углеводы указывали на присутствие S-форм, содержащих ОПС. Окрашивание толуидиновым синим выявило в составе ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL присутствие высокомолекулярных компонентов, содержащих отрицательно заряженные группировки.

3. Проведён анализ состава жирных кислот и моносахаридов исследуемых ЛПС. В составе ЛПС обоих штаммов обнаружены маркерные родоспецифичные кислоты: 3-гидроксидодекановая, додекановая и тетрадекановая. ГЖХ ацетатов полиолов идентифицировано преобладание в ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL глюкозы и рамнозы, а *H. salina* EG19S7QL — глюкозы.

4. Проведена характеристика ЛПС *H. caseinilytica* EG33S7QL методом ИК-спектроскопии, выявившая наличие основных полос поглощения характерных для данного класса молекул функциональных групп, а также присутствие сульфатной группы.

5. Выделены фракции ОПС и липидов А из ЛПС обоих штаммов бактерий для дальнейшего исследования структуры этих соединений с применением одно и двумерной спектроскопии ядерного магнитного резонанса и масс-спектрометрии высокого разрешения.