

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

Кафедра биохимии и биофизики

**СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ  
ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ГАЛОФИЛЬНЫХ  
БАКТЕРИЙ *MARINOMONAS OSTREISTAGNI* EG26S8QL  
И *HALOMONAS SP.* EG30S8QL**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Сидорина Александра Сергеевича

Научный руководитель:

профессор, докт. биол. наук

\_\_\_\_\_

С.А. Коннова

Научный консультант

с.н.с., канд. биол. наук

\_\_\_\_\_

Е.Н. Сигида

Зав. кафедрой:

профессор, докт. биол. наук

\_\_\_\_\_

С.А. Коннова

Саратов 2020

**Введение.** Галофильные и галотолерантные микроорганизмы, представленные разнообразными филогенетическими группами доменов архей, бактерий и эукариот, широко распространены по всему миру в природных и антропогенных экосистемах с повышенным уровнем минерализации. Интерес к изучению этих микроорганизмов обусловлен перспективностью применения в различных сферах биотехнологии. Среди представителей галофильных и галотолерантных бактерий обнаружены деструкторы углеводов и продуценты широкого спектра биологически активных соединений, в том числе разнообразных гидролитических ферментов и экзополисахаридов (ЭПС).

Галофильные бактерии используют различные стратегии для приспособления к существованию в соленых условиях, при которых происходит изменение метаболических путей и модификация структуры биомембран. Преобладающим компонентом внешней мембраны грамотрицательных бактерий является эндотоксин - липополисахарид (ЛПС). ЛПС является жизненно важной структурой для бактериальной клетки, обеспечивающей целостность клеточной стенки, защиту от агрессивных факторов внешней среды и опосредующей взаимодействие с окружающими объектами.

Биологические свойства молекулы ЛПС обусловлены особенностями химической структуры его компонентов: О-специфического полисахарида (ОПС), корового олигосахарида и липида А (ЛА). Вариабельность строения ОПС (О-антигена) определяет серологическое разнообразие грамотрицательных бактерий и может использоваться в качестве молекулярной основы при создании внутривидовых классификационных схем. Структура липида А обуславливает биологическую активность ЛПС, связанную с проявлением его эндотоксических свойств, таких как острая токсичность, пирогенность, адьювантность и др. В отличие от ЛПС патогенных для человека энтеробактерий, структурные особенности которых хорошо изучены за последние десятилетия, ЛПС галофильных и галотолерантных бактерий охарактеризованы крайне фрагментарно.

Объектом данного исследования являлись липополисахариды из двух умеренно галофильных бактериальных изолятов, выделенных из образцов соли из озера Карун (Египет), которые на основании биохимических и культурально-морфологических характеристик, а также последовательности 16S рРНК идентифицированы как *Marinomonas ostreistagni* EG26S8QL и *Halomonas* sp. EG30S8QL.

*Цель настоящей работы:* выявление структурных особенностей липополисахаридов внешней мембраны галофильных бактерий *Marinomonas ostreistagni* EG26S8QL и *Halomonas* sp. EG30S8QL.

Для достижения цели решались следующие задачи:

- 1) выделить из бактериальной массы исследуемых бактерий препаративные количества ЛПС;
- 2) охарактеризовать биополимерный состав и макромолекулярную организацию ЛПС;
- 3) охарактеризовать химический состав липидных и углеводных компонентов ЛПС.

Исследования выполнялись с использованием современных методов, обычно используемых для решения поставленных задач. Было проведено культивирование микроорганизмов в оптимальных для роста условиях, клетки отмыты, высушены ацетоном. Экстракцию ЛПС проводили горячим фенолом. Охарактеризован биополимерный 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 методами электрофореза и восходящей тонкослойной хроматографии. Фракционирование компонентов ЛПС после гидролиза проводили с помощью гель-фильтрации. Структурные особенности ЛПС 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 94 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: общая характеристика галофильных микроорганизмов в том числе представителей родов *Halomonas* и *Marinomonas*; механизмы адаптации их к условиям повышенной солености; биотехнологические аспекты применения галофильных микроорганизмов и их метаболитов; характеристика ЛПС родственных видов.

**Основное содержание работы.** Для реализации цели исследования было выполнено культивирование микроорганизмов *M. ostreistagni* EG26S8QL и *Halomonas sp.* EG30S8QL в жидкой среде ГРМ, содержащей 5 % NaCl, до окончания экспоненциальной фазы роста. Было выращено 2,5 л культуры *M. ostreistagni* EG26S8QL и 3 л культуры *Halomonas sp.* EG30S8QL. Перед высушиванием клетки ресуспендировали 0,15 М раствором хлорида натрия для удаления капсульного материала, примеси которого могут затруднить интерпретацию результатов структурного анализа ЛПС. Выход высушенной ацетоном биомассы *M. ostreistagni* EG26S8QL и *Halomonas sp.* EG30S8QL составил, соответственно, 2,1 г/л, и 1,7 г/л.

Экстракцию биомассы с целью выделения очищенных препаратов ЛПС, проводили методом Вестфалья. Выход продукта ЛПС для *M. ostreistagni* EG26S8QL составил 240 мг – 5,8% от сухой массы, а для *Halomonas sp.* EG30S8QL – 90 мг (1,8%).

Для ЛПС колориметрическими методами охарактеризовали биополимерный состав: содержание углеводов, в том числе КДО, и фосфора. Содержание этих компонентов представлено в таблице 1. Содержание углеводов в препарате ЛПС EG26S8QL было в два раза выше, чем в ЛПС EG30S8QL и составляло около 90 %. Это может указывать на примесь полисахаридов, сопутствующих при экстракции ЛПС, зачастую имеющих глюкановую природу.

Таблица 1 – Биополимерный состав ЛПС штаммов *M. ostreistagni* EG26S8QL и *Halomonas sp.* EG30S8QL

Компоненты	Штамм	
	EG26S8QL	EG30S8QL
	Содержание, %	
Углеводы	90,3 ± 7,0	46,5 ± 2,8
КДО	0,3 ± 0,02	0,1 ± 0,01
Фосфор	1,5 ± 0,3	6,2 ± 0,8

КДО является универсальным маркером молекул ЛПС. Ее наличие подтверждает, что исследуемое вещество относится к этому классу соединений. Фосфаты являются обязательным компонентом липидов А бактерий *Marinomonas* и *Halomonas spp.* Наличие фосфатных групп в составе липида А, КДО и других заряженных моносахаридов в коровой области обуславливает отрицательный заряд молекулы ЛПС и позволяет модулировать заряд бактериальной поверхности при взаимодействии с двухвалентными катионами ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), присутствующими в окружающей среде. Данный феномен вносит существенный вклад в стабилизацию внешней мембраны и снижение ее пропускной способности, что важно для формирования эффективного защитного барьера, в том числе, в условиях повышенной солености.

В составе липидной части ЛПС методом ГЖХ после метанолиза были идентифицированы насыщенные, ненасыщенные и гидроксикислоты с длиной углеродной цепи от C12 до C19. В составе обоих препаратов были идентифицированы тетрадекановая (C14:0), гексадекановая (C16:0) и октадекановая (C18:0) кислоты. Для штамма EG30S8QL было отмечено преобладание 13-метилтетрадекановой кислоты, а для EG26S8QL – гексадекановой кислоты.

Молекулярная гетерогенность ЛПС исследована методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рисунок 3). Окрашивание геля серебром после периодатного окисления выявило в препарате ЛПС

EG30S8QL присутствие интенсивно окрашенных полос по всему треку, свидетельствующих о гетерогенности ЛПС по молекулярной массе и о его принадлежности к S форме, содержащей высокомолекулярный O-специфический полисахарид (рисунок 1). Для препарата ЛПС EG26S8QL, напротив, наблюдалось наличие полос в нижней части трека, что указывало на преобладание низкомолекулярных R-ЛПС, лишенных O-специфического полисахарида.



1- EG26S8QL, 2- EG30S8QL

Рисунок 1 – Электрофореграмма препаратов ЛПС бактерий *M. ostreistagni* EG26S8QL и *Halomonas sp.* EG30S8QL с окрашиванием азотнокислым серебром для визуализации углеводов

Для дальнейшего структурного анализа ЛПС были получены отдельные его составные компоненты: липид А и O-специфический полисахарид. Для этого был проведен мягкий кислотный гидролиз ЛПС в 2% уксусной кислоте до выпадения осадка липида А. Образование осадка липида А штамма EG30S8QL наблюдалось через 2 часа, а гидролиз ЛПС EG26S8QL в течение 4 часов не приводил к выпадению осадка, что может быть обусловлено особенностями его строения.

Очищенный препарат ЛА EG30S8QL изучали методом восходящей тонкослойной хроматографии на пластинах SORBFIL (рисунок 2), которая выявила его гетерогенность. Характерной особенностью изолированного липида А является его гетерогенность, обусловленная присущей ему неоднородностью химического состава и строения формирующих его жирных кислот. Данная гетерогенность показывает наличие в образце смеси веществ с разной полярностью, обусловленной степенью фосфорилирования и ацилирования дисахаридного остова липида А.



Рисунок 2 – Хроматограмма липида А штамма *Halomonas* sp. EG30S8QL

Полисахариды, полученные после гидролиза ЛПС и отделения липидной составляющей центрифугированием, были фракционированы гель-фильтрацией на колонке Sephadex G-50.

Профиль элюции деградированного ЛПС штамма EG26S8QL, представленный на рисунке 3, свидетельствует о преобладании в гидролизате высокомолекулярного полисахарида (его выход составил 60 %) и незначительном содержании олигосахаридов коровой области. Эти данные согласуются с колориметрическим анализом содержания углеводов, но противоречат результатам электрофореза. Мы предполагаем, что в полученном нами препарате ЛПС EG26S8QL присутствует примесь свободного полисахарида.

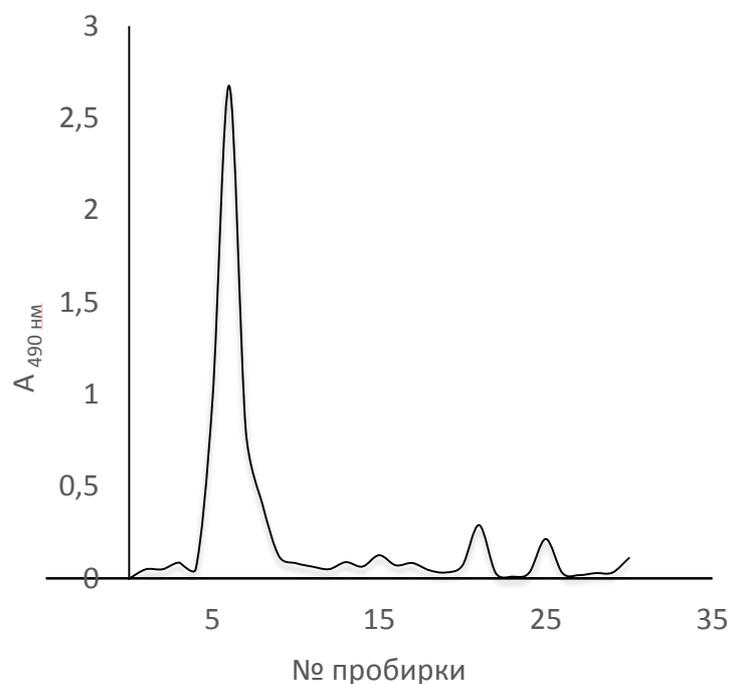


Рисунок 3 – Профиль элюции деградированного ЛПС штамма EG26S8QL

В результате гидролиза ЛПС EG30S8QL была получена смесь олигосахаридов, что свидетельствовало о наличии кислотолабильных сахаров в его составе. В дальнейшем для структурного анализа углеводной составляющей ЛПС этого штамма будет проведен мягкий щелочной гидролиз и получен препарат О-дезацелированного ЛПС.

Для характеристики углеводной составляющей ЛПС штаммов EG26S8QL и EG30S8QL было проведено определение моносахаридного состава методом ГЖХ ацетатов полиолов.

В составе ЛПС EG30S8QL идентифицированы глюкоза (61 %), рамноза (15%), галактозамин (12 %), а также манноза, фукоза и ксилоза, содержание которых не превышало 5%.

В ЛПС EG26S8QL преобладающим моносахаридом являлась глюкоза, содержание которой превышало 97 % от суммы всех идентифицированных сахаров. Этот факт подтверждал наше предположение о выделении сопутствующего ЛПС полисахарида глюкановой природы.

Полисахарид, полученный в результате гидролиза ЛПС *M. ostreistagni* EG26S8QL, был проанализирован методом спектроскопии  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР.

Спектр  $^1\text{H}$  ЯМР (рисунок 4) содержал сигнал аномерного атома углерода при 5,39 м.д. (дублет, КССВ = 3.5 Гц) (также наблюдался сигнал аномерного протона в минорной серии при 4,98 м.д.), и сигналы протонов моносахаридных колец в диапазоне при 3,42-3,98 м.д. Спектр  $^{13}\text{C}$  ЯМР (рисунок 5) содержал 6 преобладающих сигналов: при 101,0 м.д. (сигнал аномерной группы), 78,3 м.д., 74,6 м.д., 72,8 м.д., 72,5 м.д. (сигналы  $-\text{C}\text{H}-\text{OH}$  групп) и 61.7 м.д. (сигнал  $-\text{C}\text{H}_2-\text{OH}$  группы). При соотношении химических сдвигов атомов  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  с литературными данными ЯМР спектров глюкозидов различного строения было установлено, что в выделенном полисахариде преобладающими являлись остатки глюкозы с  $\alpha$ -1,4-связью. В минорной серии спектра  $^{13}\text{C}$  ЯМР наблюдались сигналы терминальных остатков глюкозы боковых цепей, присоединенных к основной цепи  $\alpha$ -1,6-связями. Таким образом, выделенный полисахарид напоминает по структуре гликоген. Сигналы 4,6-дизамещенных остатков глюкозы в точках ветвления обнаружены не были, ввиду нерегулярного расположения боковых цепей в полисахариде. Гликогенподобные полисахариды являются важнейшим резервным источником энергии и были выделены вместе с ЛПС у некоторых бактерий, в том числе в ответ на изменение условий культивирования.

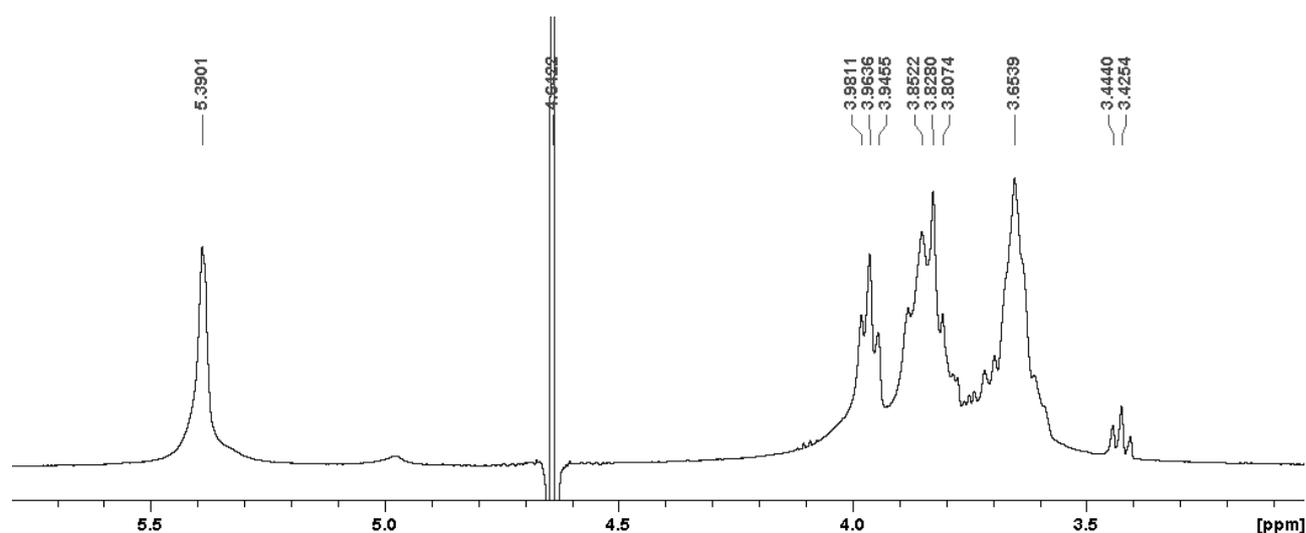


Рисунок 4 –  $^1\text{H}$  ЯМР спектр полисахарида, выделенного из клеток

*M. ostreistagni* EG26S8QL

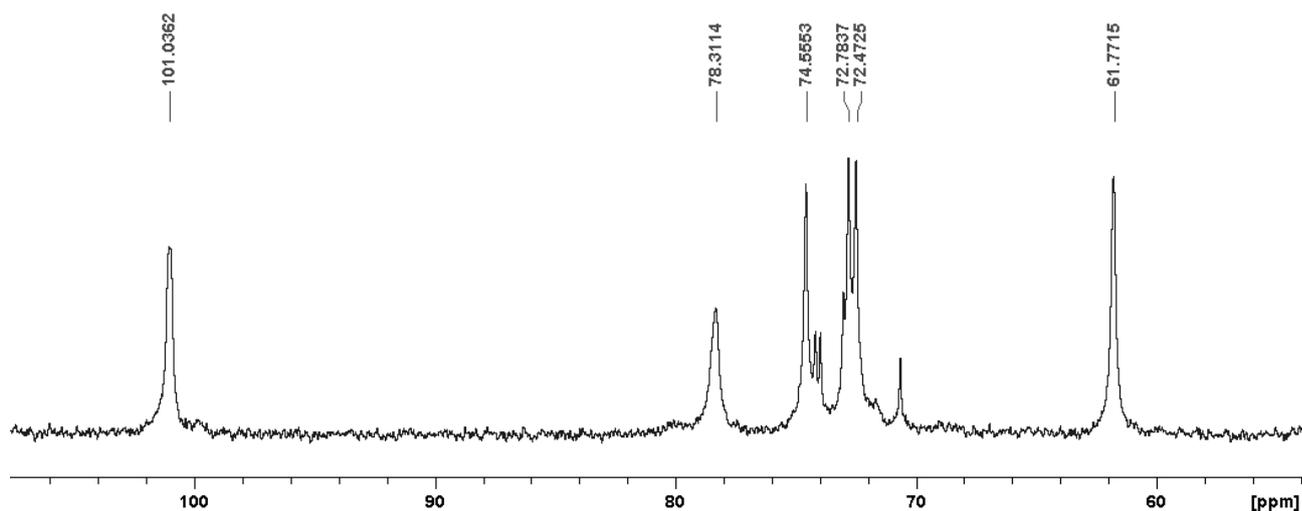


Рисунок 5 –  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр полисахарида, выделенного из клеток *M. ostreistagni* EG26S8QL

**Заключение.** Подводя итоги, можно отметить, что галофилы занимают особое место среди остальных микроорганизмов. Они выживают в среде с высоким содержанием соли. Соленые водоемы относятся к малоизученным водным объектам, поэтому работы в данном направлении являются актуальными для исследования биоразнообразия экологических ниш и изучения механизмов адаптации микроорганизмов, населяющих их.

В результате проведенных исследований были изучены структурные особенности компонентов внешней мембраны галофильных бактерий *M. ostreistagni* EG26S8QL и *Halomonas* sp. EG30S8QL, адаптированных к существованию в условия осмотического шока. Выявлено, что ЛПС этих микроорганизмов имеют R и S формы соответственно. Об этом свидетельствует результаты электрофоретического исследования. Показано наличие КДО - универсального маркера ЛПС, и фосфатов, которые являются обязательными компонентами липидов А бактерий *Marinomonas* и *Halomonas* spp. Охарактеризован моносахаридный состав и состав жирных кислот методом ГЖХ. Для детального структурного анализа ЛПС были получены отдельные его составные компоненты: липид А и О-специфический полисахарид. Для этого был проведен мягкий кислотный гидролиз ЛПС. Молекулярная гетерогенность молекулы липида А штамма EG30S8QL доказана проведенной восходящей

тонкослойной хроматографией. Полисахарид, полученный в результате гидролиза ЛПС *M. ostreistagni* EG26S8QL, был проанализирован методом спектроскопии  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР.

**Выводы.** 1. Из биомассы изолятов двух штаммов галофильных бактерий *M. ostreistagni* EG26S8QL и *Halomonas sp.* EG30S8QL были выделены препаративные количества липополисахаридов с выходами для EG26S8QL - 5,8%, для EG30S8QL - 1,8 % от веса сухих клеток.

2. В составе липополисахаридов галофильных бактерий штаммов EG26S8QL и EG30S8QL показано наличие углеводов (90,3 и 46,5 % соответственно), 2- кето - 3- дезоксиоктоновой кислоты (до 0,3 %), фосфора от 1,5 до 6,2 %. Охарактеризован состав и соотношение жирных кислот в липидах А.

3. По данным спектроскопии  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР полисахарид из ЛПС *M. ostreistagni* EG26S8QL является гомополисахаридом из  $\alpha$ -1,4-связанной глюкозы. Нерегулярные терминальные остатки глюкозы боковых цепей, связаны с основной цепью  $\alpha$ -1,6-связями.