

ПРИМЕНЕНИЕ И РАЗВИТИЕ МЕТОДА ДИНАМИЧЕСКОГО РАССЕЙЯНИЯ СВЕТА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ НАДМОЛЕКУЛЯРНЫХ СТРУКТУР В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ

© 2016 г. Г.Л. Бурыгин, Е.Н. Сигида, Ю.П. Федоненко, Б.Н. Хлебцов, С.Ю. Щеголев

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, 410049, Саратов, просп. Энтузиастов, 13

E-mail: shegolev_s@ibppm.ru

Поступила в редакцию 29.10.15 г.

Методом динамического рассеяния света исследована температурная зависимость интенсивности рассеяния, среднего размера и распределения по размерам надмолекулярных частиц в водных растворах липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum*. Получены соотношения, обеспечивающие количественную сравнительную оценку массово-объемной концентрации биополимерного вещества во взвесах и числовой концентрации надмолекулярных частиц с учетом их размера и степени полидисперсности. В диапазоне 0–60°C обнаружены интервалы температурной зависимости интенсивности рассеяния двух типов: а) с нерегулярным скачкообразным изменением интенсивности рассеяния и значительной гетерогенностью систем по размерам частиц и б) с более сглаженным характером этой зависимости и существенным уменьшением гетерогенности взвесей. В интервалах второго типа, чье положение зависело от штаммовой принадлежности препаратов липополисахаридов, оказалось возможным корректное определение параметров надмолекулярных частиц (предположительно образовавшейся мицеллярной фазы) методом динамического рассеяния света. Выявленные статистически достоверные различия размера и концентрации мицеллярных частиц объяснены их зависимостью от особенностей химического строения липополисахаридов. В качестве независимой морфологической оценки препаратов использован метод атомно-силовой микроскопии, показавший хорошее согласие с результатами, полученными методом динамического рассеяния света.

Ключевые слова: липополисахариды бактерий, надмолекулярные структуры, мицеллообразование, температурная зависимость, динамическое рассеяние света, атомно-силовая микроскопия.

Липополисахариды (ЛПС) грамотрицательных бактерий являются основным классом молекул, формирующих внешний слой их наружной мембраны, в состав которой входят также фосфолипиды (расположенные в основном во внутреннем слое и имеющие сходство с липидами цитоплазматической мембраны) и трансмембранные белки порины, образующие гидрофильные поры [1]. При попадании в организм позвоночных животных молекулы ЛПС, называемые также бактериальными эндотоксинами, могут активировать их иммунную систему, вызывать развитие воспалительных реакций и т.п. [1,2].

Большой интерес представляют относительно менее изученные (по сравнению с ЛПС эн-

теробактерий) ЛПС почвенных бактерий, в том числе представителей рода *Azospirillum*. Данные микроорганизмы были выделены из ризосферы и корней растений в различных климатических зонах, от тропиков до тундры, и относятся к группе широко распространенных ризосферных бактерий, стимулирующих рост растений (в англоязычной литературе plant-growth-promoting rhizobacteria – PGPR), благодаря их способности формировать ассоциативные взаимоотношения со многими партнерами [3]. Установлено, что ЛПС бактерий (О-антиген, см. ниже), являясь чрезвычайно изменчивой структурой, играет важнейшую роль в формировании растительно-микробного симбиоза. В частности, было показано, что ответные реакции растений на их обработку препаратами изолированных ЛПС азоспирилл оказываются сопоставимыми с реакциями на действия нативных бактериальных культур, что свидетельствует об активном участии бактериальных ЛПС в растительно-

Сокращения: ЛПС – липополисахарид, ОПС – О-специфический полисахарид, НМЧ – надмолекулярные частицы, ДРС – динамическое рассеяние света, АСМ – атомно-силовая микроскопия.

микробных ассоциативных взаимодействиях [4]. При этом структура и фазовое состояние препаратов ЛПС азоспирилл в водной среде, так или иначе опосредующей их взаимодействия с различными объектами окружающей среды в широком диапазоне физико-химических условий, в настоящее время мало исследованы.

Молекулы ЛПС являются гликолипидами и содержат в своем составе три участка, имеющие своеобразную структуру и выполняющие разные функции [5]. Гидрофобный липид А, закрепляющий молекулу в биомембране, характеризуется наличием олигосахаридного остова, ацилированного несколькими остатками жирных кислот, состав, количество и распределение которых варьирует у разных бактерий. Среди изученных наиболее распространена структура липида А, в которой остовом служит $\beta(1 \rightarrow 6)$ -димер N-ацетил-D-глюкозамина, фосфатированный в положениях 1 и 4', а количество остатков жирных кислот равно шести. Связанный с нередуцирующим остатком N-ацетил-D-глюкозамина олигосахаридный кор, обычно разветвленный и содержащий остатки уроновых кислот и фосфаты, служит неким «мостом», соединяющим гидрофобный липид А и гидрофильную часть молекулы – регулярный O-специфический полисахарид (ОПС), присутствующий в большинстве молекул ЛПС и отличающийся по строению от олигосахаридов кора. ОПС (О-антигену) принадлежит важная функция определения серологической специфичности и индивидуальности бактериальных штаммов, а также участия в контактных взаимодействиях бактерий между собой и с другими организмами [6].

В водных препаратах изолированных из клеток ЛПС (как и в их естественных природных средах) вследствие амфифильности макромолекул при определенных условиях могут возникать надмолекулярные комплексы различного биохимического состава, формы и размера. Способность препаратов ЛПС к образованию в водной среде стабильных дисперсных систем подобных комплексов в значительной степени определяется относительным размером и химической структурой гидрофильной части молекул – их ОПС.

Формирование надмолекулярных структур в водных средах бактериальных эндотоксинов, отличающихся большим морфологическим разнообразием [7], может служить одним из способов регулирования их токсичности (и других биологических свойств) в направлении ее усиления или ослабления [8]. По различным оценкам [7–11] форма и размер надмолекулярных частиц (НМЧ), образуемых молекулами ЛПС,

могут соответствовать однослойным мицеллам, липосомам и другим типам ламеллярных структур. Для последних отмечается существенное уменьшение или даже полное исчезновение токсичности [8,9], что обусловлено, вероятно, эффектом экранирования липидных участков молекул ЛПС, локализованных внутри гидрофильных углеводных оболочек. Кроме того, как показано в работе [12], включение белкового экзотоксина грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* в состав поверхности искусственных липосом приводит к практически полной утрате их способности лизировать клетки млекопитающих. При этом сами липосомы, созданные авторами из природных липидов, служили неинвазивными «провоцирующими мишенями» для иммунизации токсинов в организме животных и достижения терапевтического эффекта.

Информативными инструментами изучения надмолекулярной организации дисперсных систем биомолекул являются методы статического и динамического рассеяния света (ДРС) [11,13]. Метод ДРС позволяет определять размер (средний гидродинамический диаметр) надмолекулярных комплексов, а в ряде случаев и распределение частиц по размерам. В частности, использование метода ДРС в сочетании с блочным электрофорезом в полиакриламидном геле позволило охарактеризовать гетерогенность наноагрегатов ЛПС *Escherichia coli* O55:B5 [14]. Совместное применение метода ДРС с другими спектральными методами обеспечило получение сведений о микроструктуре липосом ЛПС бактерий *Burkholderia cenocepacia* ET-12, *B. multivorans* C1576 и *Agrobacterium tumefaciens* TT111 [10]. В указанных работах метод ДРС использован при фиксированной температуре 25°C. При этом в той же работе [10] методом электронного парамагнитного резонанса был продемонстрирован переход ацильных цепей липида А из состояния геля в жидкокристаллическую фазу при температуре 30–35°C, что косвенно указывает на вероятность фазового перехода с образованием дисперсной фазы НМЧ в данном температурном интервале.

Однако нам неизвестны публикации, в которых метод ДРС обеспечивал бы также корректную оценку концентрации биополимерного вещества дисперсной фазы и числовой концентрации частиц во взвесах с учетом их размера и степени полидисперсности. Такое развитие метода ДРС, проведенное нами в актуальных исследованиях структурной организации водных препаратов ЛПС ряда штаммов бактерий рода *Azospirillum* в широком диапазоне температуры, позволяющих судить об их фазовом

состоянии, было главной целью данной работы. Важным аспектом работы был также поиск оптимального интервала температур, обеспечивающих корректное измерение размеров НМЧ в исследуемых препаратах бактериальных липополисахаридов методом ДРС.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные штаммы. Объектом наших исследований являлись ЛПС четырех штаммов почвенных diazotrophic бактерий рода *Azospirillum* из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Выбор штаммов был обусловлен тем, что три из них – *A. irakense* KBC1, *A. halopraeferens* Au4 и *A. lipoferum* Sp59b – являются типовыми штаммами, а штамм *A. brasilense* Cd – детально охарактеризованным типичным представителем своего вида.

Получение липополисахаридов. Бактерии *A. brasilense* Cd, *A. irakense* KBC1 и *A. halopraeferens* Au4 культивировали на жидкой синтетической среде с малатом натрия и хлоридом аммония [15]. При культивировании *A. halopraeferens* Au4 среда дополнительно содержала 85 мМ NaCl. Для выращивания культуры *A. lipoferum* Sp59b использовали среду с тем же исходным солевым составом [15], но с фруктозой в качестве источника углерода. Клетки освобождали от капсулы пятикратным механическим перемешиванием в 15 мМ NaCl в течение пяти суток, ресуспендировали в ацетоне и высушивали. Препараты ЛПС из высушенных бактериальных клеток были экстрагированы водно-фенольным методом [16]. Экстракты диализовали и освобождали от примеси нуклеиновых кислот и белков обработкой 40%-м водным раствором трихлоруксусной кислоты при рН 2,7. Затем экстракты вновь диализовали, концентрировали и лиофилизировали.

Подготовка растворов ЛПС к измерениям. Лиофилизированные препараты бактериальных ЛПС растворяли в воде (очищенной с помощью системы Milli-Q (Millipore, США)) в концентрации 2 мг/мл, охлаждали и выдерживали замороженными в течение не менее 16 ч при температуре -20°C , т.е. существенно ниже диапазона температуры плавления жирных кислот, входящих в состав исследованных ЛПС. Растворы размораживали непосредственно перед началом измерения при комнатной температуре и помещали в кювету для инкубации при 0°C на 10 мин.

Исследованные препараты ЛПС были выделены из бактерий, обитающих в различных эколого-климатических зонах, отличающихся в

том числе различным ионным составом окружающей их водной среды. С целью унификации условий эксперимента и упрощения интерпретации полученных результатов в данном исследовании в качестве растворителя нами была использована чистая дистиллированная вода.

Определение параметров дисперсных систем методами динамического рассеяния света и атомно-силовой микроскопии. С использованием установки Malvern Nano-ZS (Malvern, Великобритания) определяли интенсивность рассеяния света под углом 173° (выраженную в единицах скорости счета числа фотонов – cps) при длине волны гелий-неонового лазера $\lambda = 633$ нм (в вакууме) и корреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеяния во времени (именуемую далее для краткости как «корреляционная функция»). Оценивали числовое распределение по размеру частиц и определяли их средние размеры: наиболее вероятный модалный гидродинамический диаметр d_m (соответствующий максимуму числового распределения), а также средние значения d_N и d_C , обеспечивающие учет полидисперсности систем при определении числовой концентрации частиц N и массово-объемной концентрации биополимерного вещества во взвеси C по турбидиметрическим и нефелометрическим данным (см. ниже). Использовали пластиковые четырехсторонние кюветы (10 мм) (SARSTED, Германия). Измерения проводили в диапазоне температур от 0 до 60°C с шагом $0,5-1,0^{\circ}\text{C}$ при фиксированной фокусировке лазера в центр кюветы (4,65 мм) и постоянном диаметре диафрагмы (что обеспечивало постоянство рассеивающего свет объема), выдерживая растворы перед каждым измерением при заданной температуре в течение 2 мин. По оценкам, сделанным в работах [17,18], максимальная погрешность определения среднего размера частиц по корреляционной функции методом ДРС при сравнении полученных данных с результатами независимых экспериментов составляет $\pm 10\%$.

Для независимой морфологической характеристики дисперсной фазы был использован метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). Препарат ЛПС *A. lipoferum* Sp59b в количестве 2 мг растворяли в 1 мл очищенной воды и инкубировали 30 мин при 40°C . Пробу полученного раствора объемом 100 мкл наносили на поверхность свежерасщепленной слюды и выдерживали 5 мин при 40°C . Затем избыток раствора удаляли, а слюду с его остатком высушивали. Анализ полученного таким образом образца проводили на атомно-силовом микроскопе Solver (NT-MDT, Россия) в полуконтактном режиме сканирования. Использовали мик-

роскоп Olympus IX71 (Olympus, Германия) и кантилевер NSG10 с резонансной частотой 250–350 кГц. Сканировали участки размером 2×2 мкм и 5×5 мкм с частотой 1 Гц (1024 точки) на линию и амплитудой модуляции около нескольких нанометров. Гистограмму числового распределения по размерам определяли по результатам измерений 190 частиц.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по стандартным процедурам, встроенным в программу Excel из пакета MS Office 2007. Для той или иной выборки данных определяли их среднеарифметическое значение, стандартную ошибку и доверительный интервал для среднеарифметического с учетом коэффициента Стьюдента $s(df, p)$ (где число степеней свободы $df = j - 1$, j – число измерений) при $p = 0,05$ (уровне значимости 95%). Кроме того, для оценки достоверности различий полученных значений размера и концентрации частиц использовали процедуры однофакторного дисперсионного анализа и двухвыборочного t -теста с различающимися дисперсиями.

В экспериментах использованы ресурсы ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Значения среднего диаметра НМЧ из ЛПС азоспирилл (порядка 10–30 нм) оказались в нашем случае существенно меньше длины волны света λ (отношение порядка $1/20$ – $1/60$), что дает основания отнести их к категории релеевских частиц [19]. При этом следует принять во внимание значения дифракционного параметра $x = \pi d \mu_0 / \lambda$ (d – диаметр частиц монодисперсной системы, μ_0 – показатель преломления дисперсионной среды) и параметра фазового сдвига $\rho = 2x(m - 1)$ ($m = \mu/\mu_0$, – относительный показатель преломления частиц, μ – показатель преломления частиц дисперсионной фазы). При указанных выше значениях d порядка 10–30 нм, $\mu_0 = 1,333$ и $\lambda = 633$ нм параметр x варьирует в пределах от 0,066 до 0,2.

Для определения m и ρ необходимо оценить значение μ для той или иной модели частиц дисперсионной фазы. При этом учитывается показатель преломления μ_1 биополимерного вещества, из которого состоят частицы, а также возможное проникновение в них молекул дисперсионной среды (эффект набухания гидрофильных биополимеров). Используя простое аддитивное приближение [20], можно принять

$$m = 1 + \phi_1(m_1 - 1), \quad (1)$$

где ϕ_1 и $m_1 = \mu_1/\mu_0$ – соответственно объемная доля биополимерного вещества в частицах и его относительный показатель преломления. Согласно данным, приведенным в работе [21], для большинства биополимеров (включая использованные в данной работе) справедлива оценка $m_1 \approx 1,14$, основанная на результатах многочисленных измерений, представленных в монографии [22].

Допуская, что из ЛПС азоспирилл могут формироваться однослойные мицеллы с гидрофобной сердцевиной из плотно упакованных остатков жирных кислот, и пренебрегая эффектом гидратации их гидрофильных углеводных оболочек, можно получить оценку максимально возможных значений $\phi_1 = 1$, $m = m_1$ и ρ в пределах от 0,019 до 0,057. Для более сложных моделей (к примеру, липосомальных частиц) с более высоким (реальным) уровнем их гидратации, значения m и ρ могут быть еще меньше.

Таким образом, для описания рассеяния и ослабления света в нашем случае можно использовать приближение оптически мягких частиц ($m \approx 1$). При значениях ρ порядка приведенных выше ($\rho \sim 0$) может быть использовано приближение Релея–Ганса–Дебая [19]. В этом случае показатель степени n (волновой экспонент) аппроксимационной зависимости от размера частиц мутности τ и интенсивности рассеяния света I (под фиксированным углом θ) меняется в пределах $2 \leq n \leq 4$. По результатам более точных расчетов по теории Ми [19], приведенным в работе [21], при оцененных нами значениях x порядка 0,07–0,2 и $m \leq 1,14$ показатель степени n весьма близок к значению 4, что служит дополнительным доводом в пользу их отнесения к категории оптически мягких релеевских частиц [19].

Объединяя формулу для I с формулой для поляризуемости α из работы [19] и принимая во внимание выражение (1), для фиксированного рассеивающего свет объема, содержащего одинаковые частицы с числовой концентрацией N (достаточно малой, чтобы можно было пренебречь эффектами многократного рассеяния), при заданном расстоянии до него и фиксированном угле рассеяния θ можно получить

$$I = PN V_p^2 = P_1 N \phi_1^2 d^6, \quad (2)$$

где P и P_1 – константы, зависящие от интенсивности и длины волны падающего пучка света, геометрии измерительного устройства и химического строения диспергированного вещества (его относительного показателя преломления m_1), $V_p = \phi_1 V$ – объем чистого биополи-

мерного вещества в составе одной частицы, V – ее объем. Для модели сферических частиц, использованной в правой части формулы (2) и всех приведенных ниже выражениях, $V = \pi d^3/6$.

Объединяя формулу (20) из работы [23] с выражением для фактора эффективности рассеяния Q из книги [19], с учетом формулы (1) получаем аналогичное формуле (2) выражение для мутности взвеси

$$\tau = TNV_p^2 = T_1 N \phi_1^2 d^6, \quad (3)$$

где T и $T_1 = \pi^2 T/36$ – константы, зависящие от длины волны света и химического строения диспергированного вещества (см. выше).

Если наряду с N рассматривать массово-объемную концентрацию диспергированного биополимерного вещества C и использовать соотношение $N = C/(V_p \delta_p)$, где δ_p – плотность биополимера, то соотношения (2) и (3) приобретают следующий вид:

$$I = P_2 C V_p = P_3 C \phi_1 d^3, \quad (4)$$

$$\tau = T_2 C V_p = T_3 C \phi_1 d^3, \quad (5)$$

где константы P_2 , $T_2 = T/\delta_p$, P_3 и $T_3 = \pi T/6\delta_p$ по-прежнему определяются условиями эксперимента и химическим строением биополимера (его плотностью и показателем преломления).

Таким образом, при принятых нами условиях зависимость от свойств дисперсной фазы интенсивности рассеянного света и мутности взвесей оптически мягких релеевских частиц произвольной формы определяется только двумя параметрами: концентрацией (числом частиц в единице объема или массово-объемной концентрацией диспергированного вещества) и объемом полимерного вещества в составе одной частицы.

При явном выражении I и τ через размер частиц d в рамках принятой модели сферических частиц появляется третий параметр ϕ_1 , зависящий от уровня гидратации частиц и определяющий значение их относительного эффективного показателя преломления m по формуле (1). Заметим, что при турбидиметрическом определении концентрации по формулам (3) или (5), в отличие от нефелометрии (формулы (2) и (4)), не требуется учет геометрических характеристик используемого прибора.

Допуская, что для всех исследованных нами препаратов ЛПС азоспирилл при достижении определенных значений температуры t в водных системах образуются однослойные мицеллы, размер и концентрация которых зависит от

химического строения ЛПС, формулы (2) и (4) можно применить для определения относительных значений их концентрации $N_{отн}$ и $C_{отн}$. Поскольку в соответствии с формулами (2) и (4) интенсивность рассеяния I гораздо более чувствительна к изменениям размера частиц по сравнению с эффектом гидратации, для оценки значений $N_{отн}$ и $C_{отн}$ используем соотношения

$$N_{отн} = 100(I/I_{ир})(d_{ир}/d)^6, \quad (6)$$

$$C_{отн} = 100(I/I_{ир})(d_{ир}/d)^3, \quad (7)$$

полагая $\phi_1 \approx \text{const}$. Для определенности здесь использованы значения интенсивности рассеяния $I_{ир}$ и соответствующего среднего диаметра частиц (см. ниже) для штамма *A. irakense* КВС1, принимая значения N и C для этого штамма за 100%.

В работах [23,24] был проведен строгий учет полидисперсности систем при турбидиметрии на примере гамма-распределения по радиусам частиц r $f(r) = \beta^{v+1} r^v \exp(-\beta r)/\Gamma(v+1)$ (где β и v – независимые параметры, $\Gamma(x)$ – гамма-функция), считающегося хорошей моделью для широкого круга унимодальных дисперсных систем. Параметр v определяет относительную полуширину гамма-распределения и, таким образом, степень полидисперсности взвеси [25]:

$$\Delta d_{1/2} = \Delta r/r_m = 2,48/v^{1/2}, \quad (8)$$

где Δr – геометрическая ширина распределения $f(r)$ на уровне, отвечающем половине его максимума при $r = r_m$ (модальном значении радиуса частиц).

Из результатов исследований [23,24] вытекает, в частности, что для полидисперсных систем оптически мягких релеевских частиц формулы (3) и (5) и все вытекающие из них соотношения сохраняют свой вид, если d заменить на средний диаметр $d_N = 2r_\gamma$, где

$$r_\gamma = \left[\int_0^\infty r^6 f(r) dr \right]^{1/6} \quad (9)$$

для формулы (3), и на средний диаметр $d_C = 2r_\lambda$, где

$$r_\lambda = \left[\int_0^\infty r^6 f(r) dr / \int_0^\infty r^3 f(r) dr \right]^{1/3} \quad (10)$$

для формулы (5). При этом параметры d_N и d_C связаны с модальным диаметром d_m соотношениями

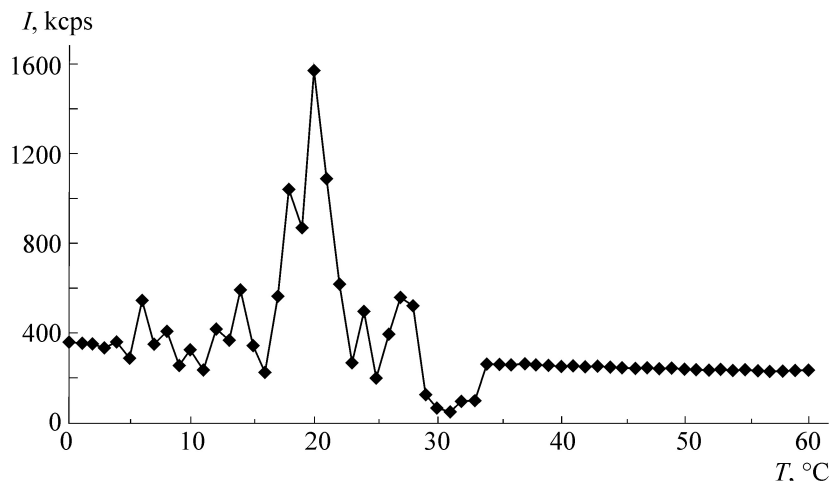


Рис. 1. Зависимость I от температуры для водного раствора ЛПС *A. halopraeferens* Au4.

$$d_N = d_m[(v+1)(v+2)(v+3)(v+4) \times (v+5)(v+6)]^{1/6}/v, \quad (11)$$

$$d_C = d_m[(v+4)(v+5)(v+6)]^{1/3}/v. \quad (12)$$

Можно показать, что те же усреднения (9)–(12) применимы и при определении относительной концентрации частиц по формулам (6) и (7), в которых значения d_{ir} и d следует заменить на d_{Nir} и d_N (для определения $N_{отн}$) и на d_{Cir} и d_C (для определения $C_{отн}$).

Результаты измерений интенсивности рассеяния света под углом $\theta = 173^\circ$ в диапазоне температуры t от 0 до 60°C , типичный пример которых приведен на рис. 1, указывают на наличие областей двух типов, отличающихся видом температурной зависимости интенсивности рассеяния. При t в пределах неких граничных значений, зависящих от бактериального штамма, эти зависимости имеют существенно более сглаженный характер по сравнению с нерегулярными скачкообразными кривыми, наблюдаемыми при значениях t за пределами этих границ. Интервалы Δt , в которых наблюдалась такая стабилизация температурной зависимости интенсивности рассеяния света для всех исполь-

зованных в работе препаратов, приведены в табл. 1.

Среди исследованных нами образцов ЛПС только для штамма *A. halopraeferens* Au4 было выявлено два таких участка (рис. 1, табл. 1). Более четко это отражено на рис. 2, откуда следует, что в интервалах температуры $0\text{--}5^\circ\text{C}$ и $34\text{--}60^\circ\text{C}$ корреляционные функции имеют вид простых логарифмических кривых, свидетельствующих о развитой структуре дисперсной системы, которая может быть корректно охарактеризована методом ДРС в терминах размеров частиц [18]. В отличие от этого, в диапазоне $6\text{--}33^\circ\text{C}$ ни одна из измеренных корреляционных функций не удовлетворяет данному условию.

Это иллюстрируют приведенные на рис. 3 результаты измерений исходных сигналов, отражающих флуктуации интенсивности рассеяния за счет броуновского движения при поступательной диффузии частиц и соответствующих им корреляционных функций для водного раствора ЛПС *A. halopraeferens* Au4. При 5 и 34°C наблюдается стабильный сигнал в течение всего времени измерения, в результате чего корреляционная функция имеет простой логарифмический вид. В то же время при 15 и 33°C общий

Таблица 1. Результаты определения параметров дисперсной фазы водных препаратов ЛПС азоспирилл

Штамм	Δt , $^\circ\text{C}$	$\Delta d_{1/2}$, %	l , нм
<i>A. lipoferum</i> Sp59b	25–57	38 ± 3	$5,0 \pm 0,4$
<i>A. irakense</i> KBC1	28–60	39 ± 3	$11,8 \pm 0,4$
<i>A. halopraeferens</i> Au4	0–5	$47,77 \pm 0,03$	$13,3 \pm 1,3$
	34–60	50 ± 2	$12,4 \pm 0,3$
<i>A. brasiliense</i> Cd	25–60	56 ± 3	$15,4 \pm 1,1$

вид флуктуационной картины и диапазон изменения сигналов существенно меняются, а соответствующие им корреляционные функции имеют вид нерегулярных кривых. Более того, в серии последовательных измерений в этом случае наблюдался существенный разброс значений корреляционной функции, что фактически исключает ее использование для определения параметров частиц.

На рис. 4 приведен пример распределения по размерам частиц в водном растворе ЛПС штамма *A. halopraeferens* Au4 при температуре $t = 47^\circ\text{C}$, соответствующей середине интервала относительной стабильности характеристик ДРС (рис. 1, табл. 1), определенного с применением программного обеспечения прибора Malvern Nano-ZS.

Итоговые результаты определения среднего размера и концентрации НМЧ в исследованных препаратах ЛПС в интервалах температуры Δt относительной стабильности параметров ДРС, приведенных в табл. 1, и их статистической обработки (доверительные интервалы для среднеарифметических значений) суммированы в табл. 1 и на рис. 5, 6. При этом достаточно слабым регулярным изменением параметров ДРС с температурой (см. рис. 1), включенным в расчет погрешностей, пренебрегали. В табл. 1 указаны средние значения полуширины распределения по размерам частиц $\Delta d_{1/2}$ (в % от значений модального диаметра d_m) и средние значения длины молекул ЛПС $l = d_m/2$, определенные в предположении об образовании в пределах указанных интервалов Δt однослойных мицелл (см. ниже). Для достаточно наглядного сравнения сильно различающихся значений концентрации $C_{\text{отн}}$ и $N_{\text{отн}}$ между разными штаммами эти значения на рис. 6 даны в логарифмических координатах.

В табл. 2 представлены итоги статистической обработки полученных результатов с применением стандартных тестов. В дисперсионном анализе использованы два набора из пяти (полный набор препаратов из всех штаммов) и четырех (препараты из *A. irakense* KBC1, *A. halopraeferens* Au4 и *A. brasilense* Cd) групп данных, показавших максимальное (пять групп) и довольно умеренное (четыре группы) изменение размера и концентрации НМЧ (рис. 5, 6). В двухвыборочном t -тесте использованы данные для препаратов из *A. irakense* KBC1 и *A. brasilense* Cd, продемонстрировавшие наибольшие отличия изучаемых параметров. Достоверными принимались различия значений, удовлетворяющих условиям $F > F_{\text{кр}}$ (критерий Фишера) и $t > t_{\text{кр}}$ (критерий Стьюдента) при $p < 10^{-2}$ (уровне значимости не менее 95%).

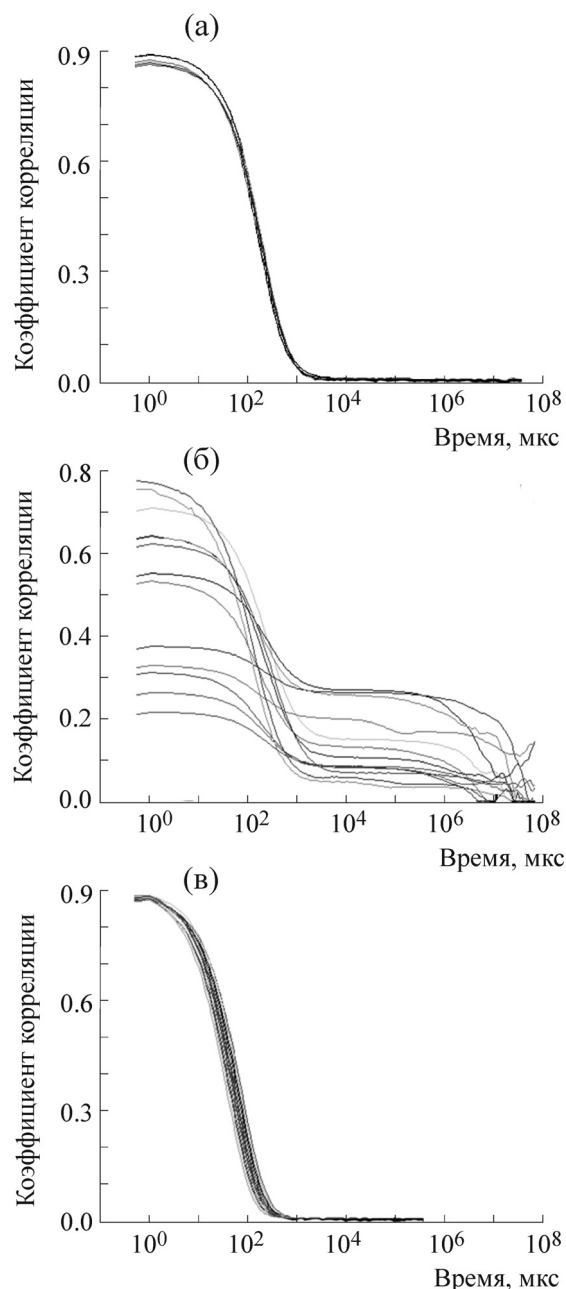


Рис. 2. Корреляционные функции для водного раствора ЛПС *A. halopraeferens* Au4 в температурных диапазонах 0–5°C (а), 6–33°C (б) и 34–60°C (в).

На рис. 7 показаны результаты независимого определения методом АСМ размеров надмолекулярных частиц для препарата ЛПС *A. lipoferum* Sp59b в сравнении с данными, полученными методом ДРС. Среди исследованных нами образцов ЛПС препарат штамма *A. lipoferum* Sp59b отличался наибольшими значениями $C_{\text{отн}}$ и $N_{\text{отн}}$ (рис. 6). Подтверждена его значительная гетерогенность по размерам частиц (в диапазоне примерно от 5 до 100 нм), с

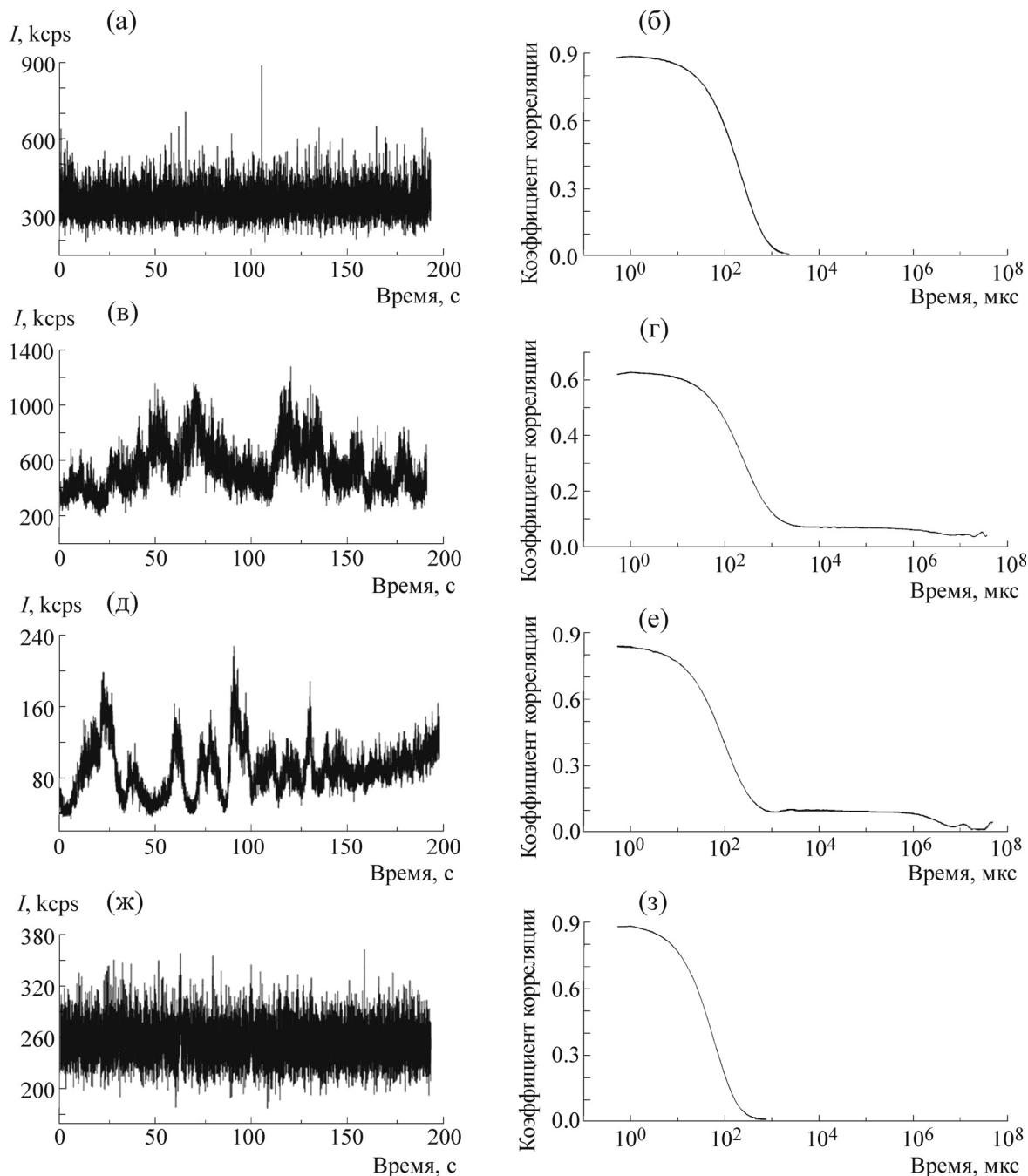


Рис. 3. Флуктуационные сигналы интенсивности рассеяния (а,в,д,ж) и соответствующие им корреляционные функции (б,г,е,з), измеренные для водного раствора ЛПС *A. halopraeferens* Au4 при 5°C (а,б), 15°C (в,г), 33°C (д,е) и 34°C (ж,з).

преобладанием частиц с диаметром 5–15 нм (56,3%) и средним модальным диаметром 7,5 нм. Отметим, что по данным ДРС средний модальный диаметр в диапазоне Δt (табл. 1) составил $9,9 \pm 0,8$ нм. Эти данные позволяют констатировать хорошее согласие результатов определения размеров надмолекулярных частиц

в водных растворах ЛПС азоспиррилл, полученных двумя независимыми методами.

Однофакторный дисперсионный анализ результатов определения размера НМЧ (рис. 5а, табл. 2) позволяет сделать вывод о достоверности его различий, установленных для препаратов ЛПС из разных бактериальных штаммов. Это справедливо как для пяти, так и для че-

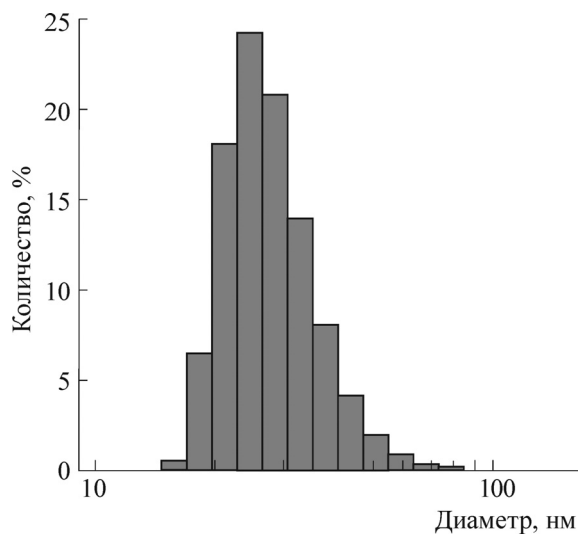


Рис. 4. Функция числового распределения по размерам частиц в водном растворе ЛПС штамма *A. halopraeferens* Au4 при 47°C.

тырех групп данных, отраженных на рис. 5. Двухвыборочный *t*-тест свидетельствует, в ча-

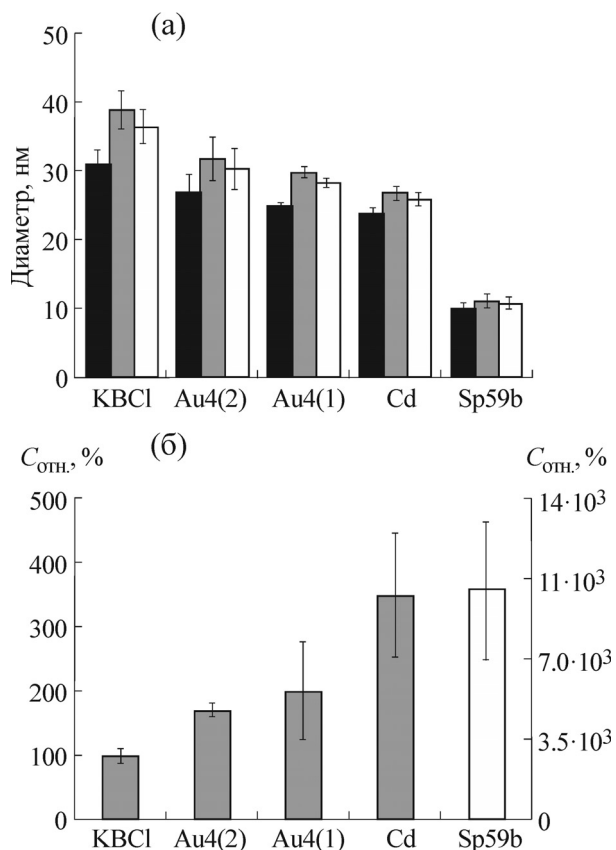


Рис. 5. Результаты определения средних размеров (а) и массово-объемной концентрации (б) НМЧ препаратов ЛПС азоспирилл. Темный, серый и прозрачный прямоугольники на рис. 5а соответствуют d_m , d_C и d_N . Правая ось на рис. 5б соответствует штамму Sp59b.

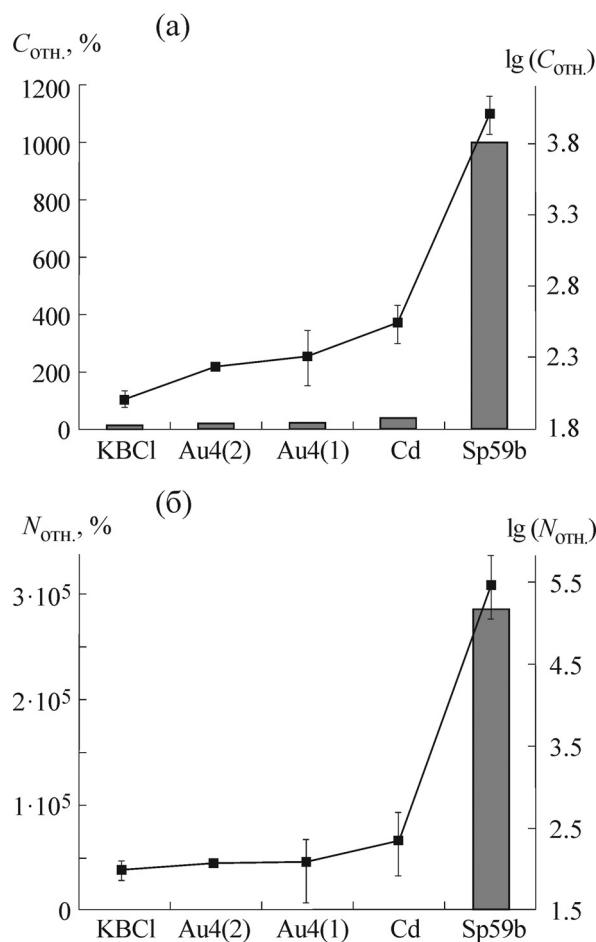


Рис. 6. Результаты определения массово-объемной (а) и числовой (б) концентрации НМЧ препаратов ЛПС азоспирилл в исходных (прямоугольники) и логарифмических (кривые) координатах.

стности, о достоверности примерно 20%-го уменьшения значения d_m для штамма *A. irakense* KBC1 по сравнению с *A. brasilense* Cd.

Аналогичный результат получен и для массово-объемной концентрации $C_{отн}$ (рис. 5б, рис. 6а, табл. 2). При этом двухвыборочный *t*-тест регистрирует достоверность увеличения примерно в 3,5 раза значения $C_{отн}$ для штамма *A. brasilense* Cd по сравнению с *A. irakense* KBC1.

Для числовой концентрации $N_{отн}$ (рис. 6б, табл. 2) достоверным является отличие ее значений для штамма *A. lipoferum* Sp59b от значений $N_{отн}$ для остальных штаммов в наборе из пяти групп данных. В то же время для четырех групп данных (штаммов *A. irakense* KBC1, *A. halopraeferens* Au4 и *A. brasilense* Cd) достоверных различий $N_{отн}$ не выявлено. Об этом говорит также двухвыборочный *t*-тест для штаммов *A. irakense* KBC1 и *A. brasilense* Cd (табл. 2).

Таблица 2. Статистическая обработка результатов измерений

Тест	Параметр	Число групп	df	F	$F_{кр}$	p
Дисперсионный анализ	d_m	5	123	178	2,45	$3 \cdot 10^{-49}$
		4	90	23	2,71	$1,8 \cdot 10^{-11}$
	$C_{отн}$	5	123	30	2,45	$3 \cdot 10^{-17}$
		4	90	15	2,71	$4 \cdot 10^{-8}$
	$N_{отн}$	5	123	6,98	2,45	$4,4 \cdot 10^{-5}$
		4	90	1,94	2,71	$1,3 \cdot 10^{-1}$
t -тест	Штаммы	Параметр	df	t	$t_{кр}$	p
	<i>A. irakense</i> KBC1 + <i>A. brasilense</i> Cd	d_m	36	6,45	2,03	$1,8 \cdot 10^{-7}$
		$C_{отн}$	29	5,23	2,05	$1,3 \cdot 10^{-5}$
		$N_{отн}$	30	1,79	2,04	$8,3 \cdot 10^{-2}$

Таким образом, для штаммов *A. irakense* KBC1, *A. halopraeferens* Au4 и *A. brasilense* Cd концентрация НМЧ либо достоверно варьирует в пределах одного порядка ($C_{отн}$), либо практически не отличается в пределах погрешности измерений ($N_{отн}$), в отличие от штамма *A. lipoferum* Sp59b, у которого концентрация НМЧ в препарате ЛПС оказалась на два-три порядка выше по сравнению с другими штаммами. При этом размер НМЧ для указанных трех штаммов также меняется сравнительно слабо (в пределах примерно 20%), в то время как для штамма *A. lipoferum* Sp59b отличие размера частиц по сравнению с другими штаммами достигает трех раз (табл. 1, рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Основываясь на полученных результатах, можно заключить, что при достижении некой минимальной температуры (в зависимости от штамма), приведенной в табл. 1, в исследованных нами водных системах ЛПС азоспирилл формируется развитая дисперсная система НМЧ с размером и концентрацией, достаточно надежно определяемыми методами ДРС и АСМ. Мы допускаем, что нижняя граница такого интервала Δt определяет минимальную температуру, при которой для данной концентрации дифильных молекул ЛПС образуется мицеллярная фаза. По аналогии с описанием процессов мицеллообразования с участием низкомолекулярных (олигомерных) поверхностно-активных веществ [26] можно принять, что данная температура соответствует граничной кривой на диаграмме состояния системы при более высоких концентрациях поверхностно-активных веществ по сравнению с точкой Крафта, определяемой минимальным значением темпе-

ратуры при критической концентрации мицеллообразования [26,27].

Формирование мицеллярной фазы при температуре выше этой границы можно связать с увеличением подвижности гидрофобных участков (остатков жирных кислот), облегчающей их встраивание в регулярную структуру мицелл с преодолением энтропийных ограничений [26]. Ниже этой температуры в исследованных нами системах имеют место, по-видимому, образующиеся случайным образом НМЧ с нерегулярной структурой (включающей ассоциаты остатков жирных кислот, сформировавшихся ниже температуры их плавления [26]) и большой полидисперсностью. Это проявляется в нерегулярной скачкообразной температурной зависимости интенсивности рассеяния и полилогарифмической форме корреляционных функций (см. рис. 1–3).

Однако для штамма *A. halopraeferens* Au4 нами был обнаружен еще один температурный участок 0–5°C относительной стабильности структурных характеристик водной системы ЛПС (рис. 1–3, табл. 1), ограниченный сверху областью нестабильности. Это свидетельствует о возможно более сложном характере диаграммы состояния данной биополимерной системы, для исследования которой необходимо проведение дополнительных экспериментов в достаточно широком диапазоне концентрации растворов.

При принятом нами допущении о том, что НМЧ, образованные в водной среде молекулами ЛПС азоспирилл, подобны однослойным мицеллам с плотной гидрофобной сердцевиной, по значениям размера НМЧ можно косвенно оценить средний эффективный размер составляющих их молекул ЛПС. Исходя из самых общих представлений [26,27] естественно допус-

туть, что размер формирующих мицеллу молекул практически соответствует ее радиусу. На этом основании по значениям размера НМЧ, приведенным на рис. 5, нами определены возможные средние (модальные) значения длины l молекул ЛПС (табл. 1, четвертый столбец).

Очевидно, что на сродство препарата ЛПС к мицеллярной фазе (массово-объемную концентрацию биополимера в ней $C_{отн}$) оказывают существенное влияние как относительный вклад гидрофильной части (ОПС) в размер молекул ЛПС, так и ее химическое строение. В связи с этим отметим особенности структурной организации ЛПС штамма *A. irakense* KBC1, использованного нами в качестве «репера», и *A. lipoferum* Sp59b, показавшего наибольшие отличия в размере и концентрации НМЧ от остальных штаммов.

Повторяющееся звено ОПС бактерий *A. irakense* KBC1 (см. схему на рис. 8) представлено разветвленным гексасахаридом [28], построенным из трех остатков рамнозы (треугольники), двух остатков галактозы (серые круги) и остатка маннозы (темный круг), причем основная цепь полисахарида состоит из дисахаридных галакто-рамнанных звеньев (рис. 8а). В то же время повторяющееся звено О-полисахарида, выделенного из ЛПС бактерий *A. lipoferum* Sp59b, культивируемых на синтетической среде с фруктозой, состоит из трисахаридов рамнозы (треугольники) в основной цепи и одного остатка глюкозы в боковой цепи (белый круг) (рис. 8б). Очевидно, что столь существенные отличия в строении гидрофильной части не могли не сказаться на геометрии молекул ЛПС и их физико-химических параметрах, определяющих размер и концентрацию НМЧ для рассматриваемых штаммов.

Кроме того, учитывая известную консервативность гидрофобной (жирнокислотной) части ЛПС [1], двух-трехкратное увеличение размера молекул для трех штаммов *A. irakense* KBC1, *A. halopraeferens* Au4 и *A. brasiliense* Cd по сравнению со штаммом *A. lipoferum* Sp59b (табл. 1, рис. 5а) можно связать с адекватным увеличением размера (и доли) их гидрофильной (углеводной) части. Этим, возможно, и объясняется значительно более низкая концентрация мицеллярной фазы для указанных трех штаммов по сравнению с *A. lipoferum* Sp59b (рис. 5б, рис. 6). Однако внутри группы *A. irakense* KBC1, *A. halopraeferens* Au4 и *A. brasiliense* Cd отмечается прямая корреляция между размером d_m и концентрацией $C_{отн}$ НМЧ (рис. 5, рис. 6а), что свидетельствует, вероятно, о преимущественном влиянии на нее химической структуры ЛПС.

В связи с этими наблюдениями представляет интерес более детальное сравнение размеров и

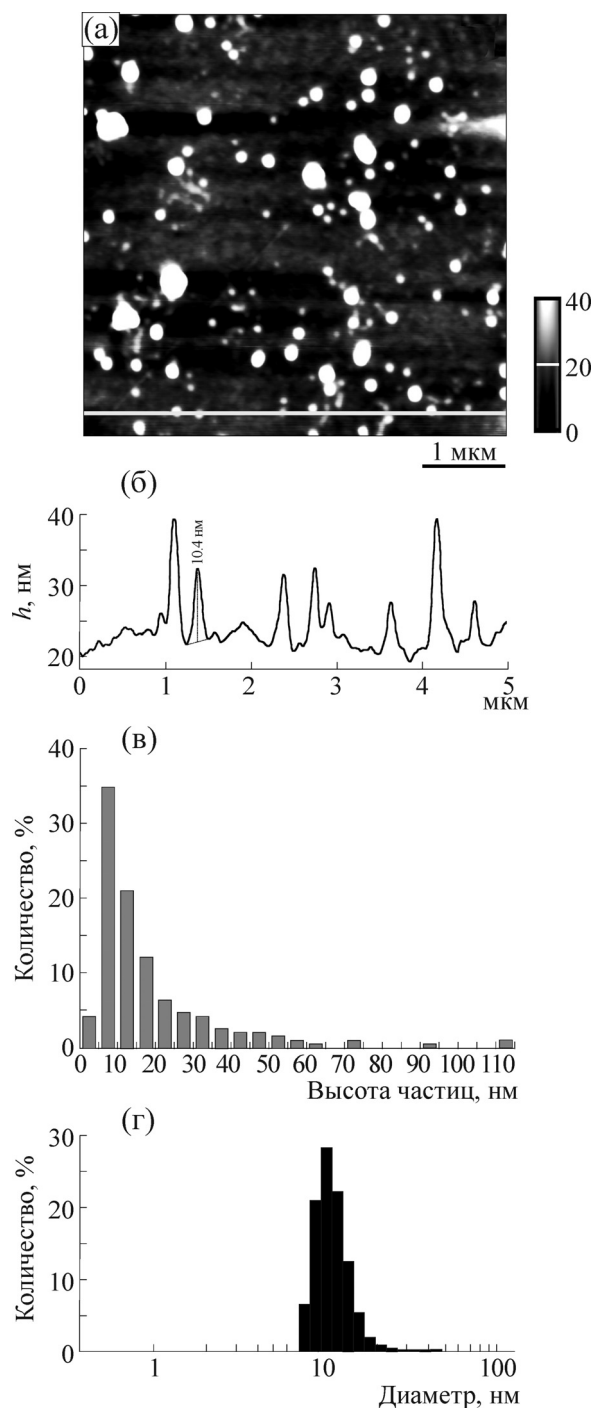


Рис. 7. Атомно-силовая микроскопия препарата ЛПС *A. lipoferum* Sp59b (а); пример расчета размера частиц (б) для участка, отмеченного горизонтальной линией на фрагменте (а); гистограмма распределения по размеру обнаруженных частиц (в); функция распределения по размерам частиц, определенная методом ДРС при 43°C (г).

концентрации НМЧ, определенных в данной работе методами ДРС и АСМ, с результатами физико-химического анализа ЛПС азоспирилл

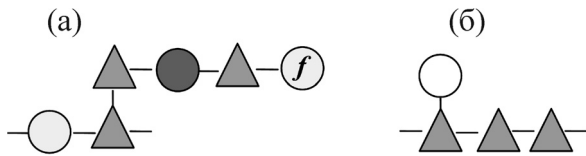


Рис. 8. Схема повторяющихся звеньев ОПС бактерий *A. irakense* KBC1 (а) и *A. lipoferum* Sp59b (б). Пояснения в тексте.

независимыми методами, что является предметом наших дальнейших исследований.

В заключение заметим, что структура, размер и количество НМЧ в водных системах бактериальных токсинов играют большую роль при взаимодействии с клетками партнеров и чрезвычайно важны для реализации разнообразных проявлений их биологической активности [9,29].

ВЫВОДЫ

1. Полученные количественные соотношения обеспечивают достоверную сравнительную оценку массово-объемной концентрации биополимерного вещества во взвесах и числовой концентрации НМЧ с учетом их размера и степени полидисперсности систем бактериальных ЛПС разных штаммов.

2. Достаточно сглаженный общий вид температурной зависимости интенсивности рассеяния света и простая логарифмическая форма кривых корреляционных функций позволяют выявить интервалы температур, при которых реализуется развитая структура дисперсной системы, корректно характеризующаяся методом ДРС в терминах размеров частиц.

3. Независимая морфологическая оценка препаратов ЛПС методом атомно-силовой микроскопии показала хорошее согласие с результатами, полученными методом ДРС.

4. Результаты определения среднего размера и концентрации НМЧ удовлетворительно согласуются с предположением о формировании структур мицеллярного типа в установленных температурных интервалах и показывают существенные различия, коррелирующие с представлениями о химической структуре ОПС использованных штаммов бактерий рода *Azospirillum*.

Авторы благодарят Н.Г. Хлебцова за содействие в выполнении экспериментов и обсуждение их результатов.

Данная работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-13-01167).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Alexander and E. T. Rietschel, *J. Endotoxin Res.* **7** (3), 167 (2001).
2. C. R. Raetz and C. Whitfield, *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635 (2002).
3. Y. Bashan and G. Holguin, *Can. J. Microbiol.* **43** (2), 103 (1997).
4. N. V. Evseeva, L. Y. Matora, G. L. Burygin, et al., *Plant and Soil* **346** (1–2), 181 (2011).
5. *Bacterial Lipopolysaccharides. Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells*, Ed. by Yu. A. Knirel and M. A. Valvano (Springer, Wien – New York, 2011).
6. A. Weintraub, *Carbohydr. Res.* **338** (23), 2539 (2003).
7. U. Seydel, L. Hawkins, A. B. Schromm, et al., *Eur. J. Immunol.* **33**, 1586 (2003).
8. M. Mueller, B. Lindner, S. Kusumoto, et al., *J. Biol. Chem.* **279** (25), 26307 (2004).
9. K. Brandenburg, H. Mayer, M. H. J. Koch, et al., *Eur. J. Biochem.* **218** (2), 555 (1993).
10. G. D'Errico, A. Silipo, G. Mangiapia, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12** (41), 13574 (2010).
11. N. C. Santos, A. C. Silva, M. A. R. B. Castanho, et al., *ChemBioChem.* **4** (1), 96 (2003).
12. B. D. Henry, D. R. Neill, K. A. Becker, et al., *Nature Biotechnol.* **33**, 81 (2015).
13. B. J. Berne and R. Pecora, *Dynamic light scattering with application to chemistry, biology, and physics* (Dover Publ., Mineola NY, 2002).
14. E. Hardy, T. Kamphuis, A. Japaridze, et al., *Anal. Biochem.* **430** (2), 203 (2012).
15. S. A. Konnova, O. E. Makarov, I. M. Skvortsov, et al., *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 93 (1994).
16. О. Вестфаль и К. Янн, в *Методы химии углеводов*, под ред. Н. К. Кочеткова (Мир, М., 1967), сс. 325–332.
17. М. С. Дюжева и В. В. Клубин, *Коллоид. журн.* **65** (5), 619 (2003).
18. Б. Н. Хлебцов и Н. Г. Хлебцов, *Коллоид. журн.* **73** (1), 105 (2011).
19. Г. Ван де Хюлст, *Рассеяние света малыми частицами* (Изд-во иностр. лит., М., 1961).
20. К. Борен и Д. Хафмен, *Поглощение и рассеяние света малыми частицами* (Мир, М., 1986).
21. В. N. Khlebtsov, G. L. Burygin, L. Yu. Matora, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1670** (3), 199 (2004).
22. Г. Клайн, *Аналитическая химия полимеров* (Мир, М., 1966), т. 3.
23. S. Yu. Shchyogolev, *J. Biomed. Opt.* **4** (4), 490 (1999).
24. С. Ю. Щеголев, Дис. ... д-ра хим. наук (Сарат. гос. ун-т им. Н. Г. Чернышевского, Саратов, 1999).
25. К. С. Шифрин, *Труды ГГО* **109**, 168 (1961).
26. А. А. Веденов, *Физика растворов* (Наука, М., 1984).
27. C. Vautier-Giongo and B. L. Bales, *J. Phys. Chem. B* **107**, 5398 (2003).

28. Yu. P. Fedonenko, O. N. Konnova, G. V. Zatonsky, et al. *Carbohydr. Res.* **339**, 1813 (2004).
 29. E. Pupo, B. Lindner, H. Brade, et al. *FEBS J.* **280** (4), 1095 (2013).

Use and Development of the Dynamic Light Scattering Method to Investigate Supramolecular Structures in Aqueous Solutions of Bacterial Lipopolysaccharides

G.L. Burygin, E.N. Sigida, Yu.P. Fedonenko, B.N. Khlebtsov, and S.Yu. Shchyogolev

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, prosp. Entuziastov 13, Saratov, 410049 Russia

The temperature dependence of scattering intensity, average size, and size distribution for supramolecular particles in aqueous solutions of lipopolysaccharides from *Azospirillum* bacteria was investigated by dynamic light scattering. Relations were obtained that made it possible to comparatively estimate the mass–volume concentration of the biopolymeric substance in suspensions and the number concentration of supramolecular particles with their size and polydispersity degree taken into account. In the range from 0°C and 60°C, two types of the temperature dependence of scattering intensity were found: (a) with an irregular spasmodic change in scattering intensity and with considerable heterogeneity of the systems with respect to particle size and (b) with a smoother character of this dependence and with considerably decreased heterogeneity of the suspensions. In the ranges of the latter type, whose location depended on what strain was used to isolate lipopolysaccharides, it proved to be possible to correctly determine the parameters of the supramolecular particles (of the supposedly formed micellar phase) by dynamic light scattering. The revealed statistically significant differences in the size and concentration of the micellar particles are explained by their dependence on the peculiarities of the chemical structure of lipopolysaccharides. For an independent morphological estimation of the preparations, atomic force microscopy was used, yielding good agreement with the dynamic light scattering results.

Key words: bacterial lipopolysaccharides, supramolecular structures, micelle formation, temperature dependence, dynamic light scattering, atomic force microscopy