



UNIWERSYTET MARII CURIE - SKŁODOWSKIEJ W LUBLINIE
WYDZIAŁ BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII

Małgorzata Pac-Sosińska

**Charakterystyka antygenów O, glukanów
i egzopolisacharydów bakterii z rodzaju *Ochrobactrum***
(Characterization of O antigens, glucans
and exopolysaccharides from *Ochrobactrum*)

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Mikrobiologii i Genetyki
Instytutu Mikrobiologii i Biotechnologii
pod kierunkiem
prof. dr hab. Adama Chomy

LUBLIN 2019

Składam serdeczne podziękowania
Promotorowi
prof. dr hab. Adamowi Chomie
oraz
dr hab. Iwonie Komanieckiej
za wsparcie, opiekę merytoryczną i wszelką pomoc
w przygotowaniu niniejszej pracy.

Rodzinie za wsparcie i wiarę.

Streszczenie

Bakterie nazywane wspólnym mianem ryzobia są grupą bardzo zróżnicowaną filogenetycznie i morfologicznie. Posiadają one unikatową zdolność do nawiązywania symbiozy z licznymi gatunkami roślin z rodziny motylkowatych (*Fabaceae*). Mikroorganizmy te pełnią bardzo istotną rolę w ekosystemach, tworząc jeden z najbardziej wydajnych systemów przeprowadzających biologiczną redukcję azotu atmosferycznego.

Ważną rolę w zaistnieniu efektywnej symbiozy diazotroficznej odgrywają znajdujące się na powierzchni komórek ryzobiów polisacharydy powierzchniowe tj.: cykliczne glukany (OPG), egzopolisacharydy (EPS), lipopolisacharydy (LPS) oraz kapsularne polisacharydy (CPS). Struktury te są istotne w początkowych etapach rozwoju symbiozy, zapewniają prawidłową adhezję bakterii do włókien korzeniowych, a także umożliwiają bakteriom i bakteroidom adaptację do zmienionych warunków osmotycznych panujących we wnętrzu komórek brodawki. Lipopolisacharydy będące integralnym składnikiem osłon bakterii Gram-ujemnych, mają szczególne znaczenie w tworzeniu układów symbiotycznych. Pełna struktura LPS zapewnia integralność błony zewnętrznej i stabilizuje jej strukturę. LPS poprzez bliski kontakt z błoną komórkową końca nici infekcyjnej warunkuje jej wzrost, wpływa na skuteczność endocytozy oraz decyduje o właściwej organizacji i dojrzewaniu symbiosomów. Dotychczas w znacznym stopniu przebadane zostały struktury powierzchniowe bakterii należące do rodzajów: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) oraz *Mesorhizobium*, natomiast słabiej poznano składniki membran zewnętrznych u *Bradyrhizobium*, a lipopolisacharydy bakterii symbiotycznych z grupy *Ochrobactrum* nie były badane.

Rodzaj *Ochrobactrum* zaklasyfikowany jest do rodziny *Brucellaceae*, do której zaliczane są także gatunki będące patogenami ludzi i zwierząt. Niektóre gatunki *Ochrobactrum* odgrywają ważną rolę w obiegu azotu. Należy tu wymienić: *O. cytisi* i *O. lupini* będące odpowiednio symbiontami *Cytisus scoparius* i *Lupinus honoratus*. Również niektóre szczepy *Ochrobactrum* posiadają zdolność do metabolizowania szkodliwych substancji chemicznych, takich jak atrazyna, fenol, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (PAH), a także do biosorpcji jonów metali ciężkich, takich jak Cu, Zn i Cd. Wiele z tych substancji stanowi zagrożenie dla środowiska i ludzi, dlatego też badania nad tymi bakteriami są istotne ze względów ekologicznych.

W niniejszej Rozprawie scharakteryzowano kolejno: łańcuchy O-swoiste LPSów i glukany peryplazmatyczne oraz opisano egzopolisacharydy (głównie pod względem ich zdolności sorpcyjnych) syntetyzowane przez *Ochrobactrum cytisi* i *O. lupini*.

Badania prowadzone były w oparciu o klasyczne metody chemiczne, chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas oraz spektroskopię NMR.

W wyniku przeprowadzonych analiz wykazano, że polisacharyd O-swoisty syntetyzowany przez *O. cytisi* ESC1^T zbudowany jest z podjednostek dwucukrowych, w skład których wchodzi reszty α -D-fukozy i β -D-galaktozaminy połączone wiązaniami glikozydowymi (1 $\rightarrow$ 3). Analiza frakcji wysokocząsteczkowej degradowanego polisacharydu pozwoliła ustalić, że *O. lupini* LUP21^T produkuje co najmniej dwa antygeny O. Rdzenie obu polisacharydów O-swoistych są homopolimerami N-acetylo-D-galaktozaminowymi bogato dekorowanymi resztami D-*altro*-heptulozy. Sposób przyłączenia heptuloz, a więc i ostateczna struktura polisacharydu O-swoistego *Ochrobactrum lupini* LUP21^T nie została ustalona.

Analiza peryplazmatycznych glukanów *O. cytisi* i *O. lupini* wykazała, że oba szczepy syntetyzują cykliczne β -(1 $\rightarrow$ 2)-glukany o identycznym stopniu polimeryzacji wynoszącym od 17 do 25 reszt glukozy.

Wstępne analizy chemiczne i fizykochemiczne egzopolisacharydów *Ochrobactrum cytisi* i *O. lupini* wykazały, że są to polimery mannozy, glukozy oraz galaktozy. Cukry te występują w obu EPS-ach w zbliżonych proporcjach (ok. 6:3:2).

Wykazało, że szczep *O. lupini* LUP21^T lepiej toleruje środowisko zanieczyszczone jonami ołowiu niż jonami kadmu. Badano zdolności sorpcji jonów metali ciężkich (ołowiu oraz kadmu) przez egzopolisacharyd LUP21^T. Stwierdzono, że pH środowiska nie ma większego wpływu na proces sorpcji jonów metali ciężkich. Za pomocą spektroskopii w podczerwieni wykazano, że w proces sorpcji jonów metali zaangażowane są głównie grupy zawierające atomy tlenu tj. grupy karboksylowe, karbonylowe i hydroksylowe. Pierwsze dwie to zwykle elementy podstawników niecukrowych, zaś ostatnia to wolne grupy hydroksylowe cukrów.

Abstract

The bacteria collectively known as rhizobia are a very diverse group, both phylogenetically and morphologically. They share the unique ability to establish symbiosis with many plant species from the legume family (*Fabaceae*). These microorganisms play a very important role in ecosystems, creating one of the most efficient systems for the biological reduction of atmospheric nitrogen.

Cyclic glucans (OPG), egzopolisaccharides (EPS), lipopolysaccharide (LPS) and capsular polysaccharides (CPS), the surface components of rhizobial cell walls, play an important role in the creating of an effective symbiosis. These polymers are important in the early stages of symbiosis development, providing the proper adhesion of bacteria to root hairs and then allow bacteria and bakteroids adaptation to changing osmotic conditions prevailing inside cells of root nodules. Lipopolysaccharides, which are an integral component of Gram-negative bacteria envelopes, are of particular importance in the creation of symbiotic systems. Aproprate LPS structure ensures the integrity of the outer membrane and stabilizes its structure. Through close contact with the plant cell membrane of the infective thread end, it determines its growth, affects the effectiveness of endocytosis and determine the appropriate organization and symbiosomes maturation. There are numerous publications regarding the surface component structures of bacteria belonging to *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) and *Mesorhizobium* genus and slightly fewer reports on *Bradyrhizobium*, but lipopolysaccharides from *Ochrobactrum* has never been investigated.

The genus *Ochrobactrum* is classified within the *Brucellaceae* family, which includes also species that are human and animal pathogens. Representatives of this group of bacteria also play an important role in the atmospheric nitrogen fixation. This group includes recently isolated species of *O. cytisi* and *O. lupini*, which are symbionts of *Cytisus scoparius* and *Lupinus honoratus*, respectively. Some strains belonging to *Ochrobactrum* also have the ability to metabolize harmful chemicals, such as atrazine, nicotine, phenol and polycyclic aromatic hydrocarbons, and to biosorb heavy metal ions (Cu, Zn and Cd). Many of these substances are toxic to the environment and to humans and therefore studies on these bacteria are important from the ecological point of view.

The aim of the dissertation was to characterize successively: O-specific LPS chains and glucans as well as describe exopolysaccharides (mainly in terms of their sorption capacity in relation to heavy metal ions) synthesized by bacteria symbiotically

fixing atmospheric nitrogen belonging to the species *Ochrobactrum cytisi* and *Ochrobactrum lupini*.

The analyses were carried out on the basis of classical chemical methods, gas chromatography coupled with mass spectrometry and NMR spectroscopy.

As a result of the conducted research it was shown that the O-specific polysaccharide synthesized by *O. cytisi* ESC1^T is composed of subunits consisting of two sugars: α -D-fucose and β -D-galactosamine residues linked by (1 $\rightarrow$ 3) bonds. The final structure of the O-specific polysaccharide *Ochrobactrum lupini* LUP21^T has not been determined. Analysis of the high molecular weight fraction of degraded polysaccharide allowed to establish that *O. lupini* LUP21^T produces at least two types of O antigens. The core of the both O-specific polysaccharides are an N-acetyl-D-galactosamin homopolymers decorated with D-*altro*-heptulose.

Analysis of the periplasmic glucans of *O. cytisi* and *O. lupini* showed that both strains synthesize cyclic β -(1 $\rightarrow$ 2)-glucans with an identical degree of polymerization of 17 to 25 glucose residues.

Attempts to describe the chemical structures of *Ochrobactrum cytisi* and *O. lupini* exopolysaccharides showed that both polymers contain mainly mannose, glucose and galactose appearing in similar proportions (6:3:2). It was showed that *O. lupini* LUP21^T better tolerates environment polluted with lead than cadmium ions. Testing the sorption capacity of heavy metal ions (lead and cadmium) by EPS, it was found that the pH of the environment does not have a major impact on the sorption process. By means of infrared spectroscopy, it was shown that metal ions sorption process involves groups containing oxygen atoms, i.e. carboxyl, carbonyl and hydroxyl groups. The first two are usually elements of EPS non-sugar substituents, the last are free hydroxyl groups of sugars.

SPIS TREŚCI

I	WSTĘP	11
I.1	Wprowadzenie	11
I.2	SYMBIOZA ROŚLIN MOTYLKOWATYCH Z RHIZOBIACEAE	12
I.2.1	Wiązanie azotu cząsteczkowego	12
I.2.2	Roślinni partnerzy symbiozy	14
I.2.3	Charakterystyka bakterii brodawkowych	15
I.2.3.1	Charakterystyka rodzaju <i>Ochrobactrum</i>	17
I.2.4	Mechanizm wiązania azotu	18
I.2.5	Rodzaje brodawek korzeniowych	20
I.2.6	Czynniki wpływające na przebieg symbiozy	22
I.2.6.1	Czynniki pochodzenia roślinnego	22
I.2.6.1.1	Flawonoidy	22
I.2.6.1.2	Związki nieflawonoidowe	23
I.2.6.2	Czynniki pochodzenia bakteryjnego	24
I.2.6.2.1	Geny <i>nod-nif</i>	24
I.2.6.2.2	Czynniki Nod	26
I.3	BAKTERYJNE POLISACHARYDY POWIERZCHNIOWE	27
I.3.1	LIPOPOLISACHARYDY (LPS)	27
I.3.1.1	Lipid A	30
I.3.1.2	Region rdzeniowy	39
I.3.1.3	Łańcuchy O-swoiste	42
I.3.1.4	Biosynteza lipopolisacharydu	46
I.3.1.4.1	Biosynteza lipidu A u ryzobiów	46
I.3.1.4.2	Biosynteza części rdzeniowej	48
I.3.1.4.3	Biosynteza łańcucha O-swistego	51
I.3.1.5	Udział lipopolisacharydu w symbiozie	53
I.3.2	PERYPLAZMATYCZNE β- GLUKANY	54
I.3.2.1	Klasy glukanów	56
I.3.2.1.1	Liniowe β -(1,2)-glukany	56
I.3.2.1.2	Cykliczne β -(1,2)-glukany	58
I.3.2.1.3	Cykliczne β -(1,2)-glukany z jednym wiązaniem typu α -(1,6) w pierścieniu	59
I.3.2.1.4	Cykliczne β -(1,3);(1,6)-glukany	60
I.3.2.2	Synteza OPG	61
I.3.2.2.1	Regulacja biosyntezy glukanów	63

I.3.2.2.2	Rola peryplazmatycznych glukanów	65
I.3.3	POLISACHARYDY KAPSULARNE (KPS)	66
I.3.4	EGZOPOLISACHARYDY	69
I.3.4.1	Egzopolisacharydy ryzobiowe.....	69
I.3.4.2	Biosynteza egzopolisacharydu	72
I.3.4.2.1	Biosynteza EPS <i>Sinorhizobium meliloti</i>	72
I.3.4.2.2	Biosynteza EPS <i>Rhizobium leguminosarum</i>	74
I.3.4.2.3	Regulacja biosyntezy egzopolisacharydu	76
I.3.4.2.3.1	Regulacja biosyntezy u <i>S. meliloti</i>	76
I.3.4.2.4	Regulacja biosyntezy bursztynyloglikanu (EPS I)	77
I.3.4.2.5	Regulacja biosyntezy galaktoglikanu (EPS II)	79
I.3.4.2.6	Regulacja biosyntezy u <i>R. leguminosarum</i>	80
I.3.4.3	Rola EPS w symbiozie	81
I.3.4.4	Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie	83
I.3.4.5	Właściwości sorpcyjne egzopolisacharydu	85
II	CEL PRACY	87
III	MATERIAŁY I METODY	88
III.1	MATERIAŁY	88
III.1.1	Szczepy bakteryjne	88
III.1.2	Podłoża hodowlane.....	88
III.1.3	Bufory i odczynniki	89
III.2	METODY	91
III.2.1	Warunki hodowli podstawowej	91
III.2.2	Izolacja lipopolisacharydu	91
III.2.3	Izolacja polisacharydu O-swoistego i lipidu A	92
III.2.4	Izolacja i oczyszczanie egzopolisacharydów	92
III.2.5	Izolacja i oczyszczanie peryplazmatycznych glukanów	93
III.2.6	Określenie składu cukrowego oraz wiązań w cząsteczkach glukanów	94
III.2.7	Analiza jakościowa i ilościowa węglowodanów	94
III.2.7.1	Oznaczanie cukrów obojętnych	94
III.2.7.2	Określanie absolutnej konfiguracji cukrów	94
III.2.8	Analiza jakościowa i ilościowa kwasów tłuszczowych	95
III.2.9	Inne metody chemiczne używane w analizie	95
III.2.9.1	Analiza metylacyjna wg Hakomori	95
III.2.9.2	Degradacja zmetylowanych polisacharydów.....	95
III.2.9.3	Analiza cukrów i kwasów tłuszczowych w lipidzie A	96
III.2.10	Metody instrumentalne	96

III.2.10.1	Elektroforeza LPS	96
III.2.10.2	Chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym	96
III.2.10.3	Chromatografia kolumnowa.....	97
III.2.10.4	Chromatografia gazowa i spektrometria mas (GC-MS)	97
III.2.10.5	Spektrometria MALDI-TOF	98
III.2.10.6	Spektroskopia NMR.....	98
III.3	Badanie właściwości sorpcyjnych egzopolisacharydu <i>O. lupini</i>	99
III.3.1	Badanie zahamowania wzrostu <i>O. lupini</i> na metalach ciężkich.....	99
III.3.2	Właściwości sorpcyjne EPS <i>O. lupini</i> wobec jonów Cd^{2+} i Pb^{2+}	99
III.3.3	Wpływ pH środowiska na sorpcję jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd <i>O. lupini</i>	100
III.3.4	Kinetyka wiązania jonów kadmu i ołowiu przez EPS <i>O. lupini</i>	100
IV	WYNIKI	101
IV.1	LIPOPOLISACHARYDY	101
IV.1.1	Otrzymanie preparatów lipopolisacharydowych	101
IV.1.2	Analiza elektroforetyczna LPS <i>O. cytisi</i> i <i>O. lupini</i>	102
IV.1.3	Analiza chemiczna lipopolisacharydów <i>O. cytisi</i> i <i>O. lupini</i>	103
IV.1.3.1	Skład węglowodanowy preparatów lipopolisacharydowych <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T i <i>O. lupini</i> LUP21 ^T	104
IV.1.3.2	Analiza kwasów tłuszczowych w lipopolisacharydach <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T i <i>O. lupini</i> LUP21 ^T	107
IV.1.4.1	Analiza strukturalna polisacharydu O-swoistego <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T	110
IV.1.4.2	Analiza strukturalna polisacharydu O-swoistego <i>O. lupini</i> LUP21 ^T	120
IV.2	ANALIZA PERYPLAZMATYCZNYCH GLUKANÓW SZCZEPÓW <i>O. CYTISI</i> I <i>O. LUPINI</i>	129
IV.2.1	Otrzymanie i oczyszczenie preparatów glukanowych	129
IV.2.2	Określenie składu cukrowego oraz wiązań w cząsteczkach glukanów	131
IV.2.3	Analiza TLC preparatów glukanowych.....	133
IV.2.4	Analiza MALDI-TOF preparatów glukanowych	134
IV.2.5	Analizy NMR peryplazmatycznych glukanów	137
IV.3	CHARAKTERYSTYKA EGZOPOLISACHARYDÓW <i>OCHROBACTRUM CYTISI</i> ESC1^T I <i>O. LUPINI</i> LUP21^T	141
IV.3.1	Otrzymanie i oczyszczenie preparatów egzopolisacharydowych	141
IV.3.2	Określenie składu cukrowego oraz wiązań w cząsteczkach egzopolisacharydów	143
IV.3.3	Badanie właściwości sorpcyjnych egzopolisacharydu <i>O. lupini</i> LUP21 ^T	149
IV.3.4	Wzrost <i>O. lupini</i> LUP21 ^T na podłożach z dodatkiem soli metali ciężkich... ..	150
IV.3.4.1	Wpływ stężenia soli kadmu i ołowiu na zdolności sorpcyjne EPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T	151

IV.3.4.2 Wpływ pH środowiska na sorpcje jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd <i>O. lupini</i> LUP21 ^T	152
IV.3.4.3 Kinetyka wiązania jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd <i>O. lupini</i> LUP21 ^T	153
IV.3.4.4 Analiza FT-IR preparatów EPS <i>O. lupini</i>	154
V DYSKUSJA	156
V.1 Lipopolisacharydy szczepów <i>Ochrobactrum cytisi</i> i <i>Ochrobactrum lupini</i>	156
V.2 Peryplazmatyczne glukany <i>Ochrobactrum cytisi</i> i <i>Ochrobactrum lupini</i>	158
V.3 Egzopolisacharydy szczepów <i>Ochrobactrum cytisi</i> i <i>Ochrobactrum lupini</i>	159
VI WNIOSKI	161
VII LITERATURA	163
VIII WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	184
IX SPIS RYCIN I TABEL	186

I WSTĘP

I.1 Wprowadzenie

Biologiczne wiązanie azotu, czyli redukcja azotu cząsteczkowego do jonów amonowych to proces niezwykle istotny w cyklu obiegu tego pierwiastka w przyrodzie. Azot to pierwiastek niezbędny do życia roślin, gdyż wchodzi w skład białek, kwasów nukleinowych czy też chlorofilu. Tylko niewielka jego ilość występuje w dostępnej dla organizmów żywych formie, dlatego też jest powszechnie uważany za jeden z najbardziej limitujących składników odżywczych. Gleba stanowi jeden z głównych jego rezerwuarów ponieważ w jej skład wchodzi zarówno organiczne związki azotu poddawane mineralizacji jak i związki nieorganiczne tj. azotany, azotyny i jony amonowe. Wiele gatunków roślin promuje interakcje z mikroorganizmami ze względu na korzyści płynące z koegzystencji. Prokariota są jedynymi organizmami zdolnymi do wiązania azotu cząsteczkowego z atmosfery. Mikroorganizmy te pełnią istotną rolę w wielu zróżnicowanych ekosystemach, ponieważ układy symbiotyczne z udziałem ryzobiów należą do najwydajniejszych systemów prowadzących biologiczną redukcję azotu atmosferycznego. Mikroorganizmy zdolne do redukcji wolnego azotu określane są jako diazotrofy i przynależą one do trzech typów: *Proteobacteria* (Bakterie właściwe), *Actinobacteria* (Promieniowce) oraz *Cyanobacteria* (Sinice) [Wielbo i Skorupska 2003].

Bakterie symbiotyczne to w większości glebowe bakterie Gram-ujemne, określane wspólnym mianem, jako ryzobia. Do tej grupy należą głównie α -Proteobakterie zaliczane do rodzajów takie jak np. *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Phyllobacterium*, *Azorhizobium*, czy też *Ochrobactrum*. Wchodzą one w ścisłe integracje z roślinami motylkowatymi z rodziny *Fabaceae* (*Leguminosae*, *Papilionaceae*) redukując wolny azot. Układy symbiotyczne charakteryzują się wysoką specyficznością uwarunkowaną wzajemnym rozpoznaniem symbiontów. Proces ten jest ściśle kontrolowany przez obu partnerów symbiozy i poprzedzany jest wymianą sygnałów molekularnych.

Do rodzaju *Ochrobactrum* zaliczane są gatunki charakteryzujące się zdolnością do symbiozy, patogenezы czy też akumulacji i biodegradacji związków toksycznych. Dwa gatunki – *Ochrobactrum cytisi* będący mikrosymbiontem żarnowca miotłastego i *Ochrobactrum lupini* kolonizujący brodawki *Lupinus honoratus* należą do

symbiontów wykazujących jednocześnie zdolności do bioremediacji. Dodatkowo ze względu na ich bliskie pokrewieństwo z patogenem – *Ochrobactrum anthropi* stanowią ciekawy model umożliwiający badanie korelacji pomiędzy patogenezą i symbiozą.

Ważną rolę w zaistnieniu efektywnej symbiozy diazotroficznej odgrywają znajdujące się na powierzchni komórek ryzobiów polisacharydy powierzchniowe tj.: cykliczne glukany, egzopolisacharydy (EPS), lipopolisacharydy (LPS) oraz kapsularne polisacharydy. Struktury te są istotne w początkowych etapach rozwoju symbiozy, zapewniają prawidłową adhezję bakterii do włóśników korzeniowych a następnie umożliwiają bakteriom i bakteroidom adaptację do zmienionych warunków osmotycznych panujących we wnętrzu brodawki. Lipopolisacharydy będące integralnym składnikiem osłon bakterii Gram-ujemnych, mają szczególne znaczenie w tworzeniu układów symbiotycznych. Pełna struktura LPS zapewnia integralność błony zewnętrznej i stabilizuje jej strukturę. Poprzez bliski kontakt z błoną komórkową końca nici infekcyjnej warunkuje jej wzrost, wpływa na skuteczność endocytozy oraz decyduje o właściwej organizacji i dojrzewaniu symbiosomów. Ze względu na istotną rolę, jaką spełnia lipopolisacharyd na różnych etapach symbiozy jego struktura i funkcje są intensywnie badane.

I.2 SYMBIOZA ROŚLIN MOTYLKOWATYCH Z RHIZOBIACEAE

I.2.1 Wiązanie azotu cząsteczkowego

Azot jest jednym z najpowszechniej występujących pierwiastków kuli ziemskiej. Jest podstawowym składnikiem wielu biologicznych związków takich jak białka, kwasy nukleinowe i witaminy. Azot jest niezbędny do wzrostu i rozwoju wszystkich organizmów. Największe jego zasoby znajdują się w litosferze w skałach magmowych, osadowych i metamorficznych. Drugim jego rezerwuarem pod względem wielkości jest atmosfera. Chociaż w glebie znajdują się stosunkowo niewielkie ilości azotu, to decydują one o wzroście i rozwoju roślin, a pośrednio o życiu na Ziemi [Downie i Young, 2001].

Bioróżnorodność, krążenie pierwiastków oraz przepływ energii są podstawowymi częściami składowymi umożliwiającymi funkcjonowanie wszystkich systemów w przyrodzie. Jednym ze sposobów zapewniających uzupełnianie zasobów podstawowych pierwiastków w glebie, takich jak azot, jest stosowanie nawozów chemicznych. Jest to jednak zabieg bardzo kosztowny, energochłonny i jednocześnie

powodujący zanieczyszczenie środowiska. Przemysłowe wiązanie azotu z powietrza wymaga bardzo wysokich temperatur i ciśnień oraz użycia katalizatorów. Prokariota są jedynymi organizmami zdolnymi do wiązania azotu cząsteczkowego z atmosfery. Jako organizmy żyjące samodzielnie bądź w symbiozie z roślinnym gospodarzem są w stanie przeprowadzić reakcje wbudowania azotu do związków organicznych, które następnie w cyklu przemian przekształcane są w białka (**Tabela 1**).

Związki azotu mogą być przyswajane przez rośliny tylko w niektórych postaciach. Najlepiej przyswajalną formą jest mocznik i jony azotanowe. Rośliny są także w stanie pobierać niektóre aminokwasy z otoczenia (np. alaninę, kwas asparaginowy) zachodzi to jednak w śladowych ilościach [Gabryś i wsp., 2002]. Przemiany i udostępnianie azotu mogą następować na trzech poziomach; amonifikacji, nityfikacji i denityfikacji [Martyniuk, 2009].

Podczas procesu amonifikacji następuje rozkład aminokwasów pod wpływem działalności metabolicznej mikroorganizmów glebowych. Produktem tej przemiany jest amoniak (NH_3) [Klama 2004].

Tabela 1. Przemiany azotu w biosferze.

Reakcja	Mikroorganizm	Środowisko	Proces
Wiązanie azotu cząsteczkowego	Bakterie wiążące azot np. <i>Rhizobium</i>	Tlenowe /beztlenowe	Przekształcenie azotu cząsteczkowego w inne dostępne formy.
Amonifikacja	Bakterie amonifikujące	Tlenowe /beztlenowe	Uwalnianie jonów amonowych z resztek innych organizmów.
Nityfikacja	Bakterie nityfikacyjne np. <i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrococcus</i> , <i>Nitrobacter</i>	Tlenowe	Proces dwuetapowy. Jony amonowe są utleniane do azotynów (NO_2^-) a następnie do azotanów (NO_3^-) – form przyswajalnych przez rośliny.
Denityfikacja (oddychanie azotanowe)	Bakterie denityfikacyjne np. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>P. denitrificans</i>	Beztlenowe	Redukcja azotanów do azotu cząsteczkowego, powrót azotu do atmosfery.

Proces udostępniania azotu w formy biodostępne może być przeprowadzany jedynie przez niektóre bakterie określane mianem diazotrofów. Podczas biologicznego wiązania azotu (BNF – ang. *biological nitrogen fixation*) chemicznie obojętny azot

(N₂) obecny w atmosferze jest enzymatycznie przekształcany w metabolicznie użyteczną postać amoniaku (NH₃) poprzez kompleks nitrogenazy. Pierwszym, silnie endoergicznym etapem tego procesu jest rozbitcie trwałego wiązania pomiędzy atomami azotu. Do tego procesu konieczna jest obecność związków redukcyjnych, źródła energii i kompleksu enzymatycznego nitrogenazy. Energia potrzebna do tego procesu pochodzi z oddychania tlenowego. Donorem wodoru, niezbędnym do redukcji cząsteczki azotu może być pirogronian, powstały podczas procesu fotosyntezy lub rozkładu węglowodanów oraz woda, która ulega fotolizie [Cohn i wsp., 1998]. Szacunkowo BNF dostarcza rocznie do gleby od 100 – 170 milionów ton tego pierwiastka [Wielbo i Skorupska, 2003]. Najbardziej efektywnie proces wiązania azotu przebiega w układzie symbiotycznym, gdzie jednym z partnerów są bakterie (ryzobia) a drugim rośliny.

1.2.2 Roślinni partnerzy symbiozy

Zdolność tworzenia symbiozy z ryzobiami to cecha charakterystyczna dla roślin motylkowatych (*Leguminosae*). Jest to grupa bardzo zróżnicowana morfologicznie, występująca na całej kuli ziemskiej w różnych warunkach klimatycznych obejmująca łącznie 700 rodzajów i 1700 gatunków [Paul i Clark, 2000].

Leguminosae zostały obecnie podzielone na trzy podrodziny:

- *Caesalpinaceae* (brezylkowate)
- *Mimosaceae* (mimozowate)
- *Papilionaceae* (motylkowate właściwe)

We wszystkich tych podrodzinach występują gatunki zdolne do wchodzenia w symbiozę z ryzobiami. Stanowią one większość podrodzin mimozowatych i bobowatych [van Rhijn i Vanderleyden, 1995].

Ze względu na zastosowanie i znaczenie tych roślin w rolnictwie są one najlepiej poznanymi gospodarzami bakterii brodawkowych. Do motylkowatych należy wiele ważnych rolniczo roślin tj. fasola, groch, ozdobne drzewa – (w regionach tropikalnych; *Bauhinia*, *Flamboyant*, *Cassia*), rośliny pastewne (koniczyna, lucerna i wyka).

W trakcie trwania symbiozy roślina dostarcza bakteriom związki węgla oraz zapewnia im optymalne warunki rozwoju tj. brodawki będące specyficzną niszą ekologiczną.

I.2.3 Charakterystyka bakterii brodawkowych

Ryzobia to grupa bakterii bardzo zróżnicowana filogenetycznie. Wyodrębnione w tej grupie mikroorganizmy charakteryzują się zdolnością do wiązania atmosferycznego azotu i współtworzenia układów symbiotycznych z roślinami motylkowatymi. Efektywność i indukcja brodawkowania jest uwarunkowana posiadaniem przez bakterie symbiotyczne genów *nod* i *nif*. Bakterie symbiotyczne są mikroorganizmami tlenowymi, choć mogą rozwijać się przy ograniczonym dostępie tlenu. Są to na ogół drobne, ruchliwe pałeczki o rozmiarach $0,5-0,9 \times 1,2-3,0 \mu\text{m}$. Nie wymagają one do przetrwania kontaktu z rośliną i często spotyka się je jako formy wolnożyjące (saprofity) w glebie. W takiej jednak formie w większości przypadków nie przeprowadzają wiązania azotu atmosferycznego. Dlatego też wolnożyjące ryzobia muszą czerpać ten pierwiastek w postaci jonów azotowych z otoczenia, tak samo jak inne bakterie [Masson-Boivin i wsp., 2009].

Do ryzobiów zaliczamy obecnie 98 gatunków zebranych w 13 rodzajach należących głównie do α -Proteobakterii. Są to: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, *Devosia* i *Shinella* [Weir, 2012].

Z punktu widzenia symbiozy z roślinami motylkowatymi ryzobia można podzielić na dwie grupy:

1. Gatunki o szerokim zakresie gospodarza – tj. rodzaje *Bradyrhizobium* i część gatunków *Rhizobium*.
2. Ryzobia o dużej specyficzności względem gospodarza – gatunki zaliczane do rodzajów *Sinorhizobium* czy *Mezorhizobium* – zdolne do tworzenia układu symbiotycznego najczęściej tylko z jednym lub kilkoma gatunkami roślin motylkowatych [Lee i Hirsch, 2006].

Bardzo często jako kryterium podziałowe ryzobiów stosuje się czas ich generacji. Na tej podstawie wyróżniamy gatunki wolno- i szybko-rosnące. Do ryzobiów wolno-rosnących zaliczane są gatunki z rodzaju *Bradyrhizobium*. Ich czas generacji

wynosi ponad 6 godzin. Są to Gram – ujemne ruchliwe, tlenowe pałeczki, posiadające zdolność produkcji dużej ilości zewnątrzkomórkowego śluzu. Azot atmosferyczny asymilują jedynie w warunkach mikroaerofilnych podczas symbiozy z roślinami. Najlepiej poznanym gatunkiem należącym do tego rodzaju jest *Bradyrhizobium diazoefficiens* wcześniej znany jako *Bradyrhizobium japonicum* (*Rhizobium japonicum*) [Sugawara i wsp., 2017]. Jest on symbiontem soi (*Glycine max*), fasolnika chińskiego (*Vigna unguiculata*) oraz fasoli złotej (*Vigna radiata*). Genom *Bradyrhizobium diazoefficiens* wyróżnia się brakiem pozachromosomalnego DNA. Geny nodulacji odpowiedzialne za kontrolę procesu wiązania azotu atmosferycznego zlokalizowane zostały w regionie zwanym „wyspą symbiotyczności” (WS). Wyspy symbiotyczności są jednym z typów wysp genomowych, pozostałością po poziomym transferze genów. Są one analogiczne do wysp patogeniczności występujących u licznych bakterii Gram-ujemnych [Young i wsp., 2006].

Do ryzobiów szybko rosnących należą m.in. gatunki z rodzaju *Rhizobium*, *Sinorhizobium* czy też *Ochrobactrum* charakteryzujące się czasem generacji krótszym niż 6 godzin. Bakterie należące do rodzaju *Rhizobium* rosnąc na pożywkach laboratoryjnych powodują ich stopniowe zakwaszenie, podczas gdy bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium* alkalizują podłoże [Szember i wsp., 2001]. Rodzaj *Rhizobium* zawiera obecnie około 30 gatunków o bardzo zróżnicowanych zakresach gospodarza roślinnego. Bakterie te charakteryzują się występowaniem perytrychalnego urzęsienia i niską odpornością na antybiotyki. Wśród najlepiej poznanych gatunków należących do rodzaju wymienić można: *R. leguminosarum* i *Rhizobium etli*.

R. leguminosarum jest gatunkiem, w którym wyodrębniono trzy biowary - *viciae*, *trifolii* i *phaseoli*, różniące się zakresem gospodarza. Biowar *viciae* indukuje powstawanie brodawek na wyce (*Vicia*), grochu (*Pisum*) oraz soczewicy (*Lens*). Roślinnym gospodarzem biowaru *trifolii* jest koniczyna (*Trifolium*) a biowaru *phaseoli* - fasola (*Phaseolus*). Geny specyficzności gospodarza oraz geny związane z wiązaniem azotu u tych bakterii zlokalizowane są na dużych plazmidach symbiotycznych (pSym). Jedną z cech odróżniających *Rhizobium* od pozostałych diazotrofów jest właśnie obecność dużej ilości plazmidów. Przykładowo na genom *R. leguminosarum* bv. *viciae* 3841 składa się chromosom i sześć plazmidów [Young i wsp., 2006].

Większość gatunków należących do ryzobiów wiąże azot atmosferyczny jedynie w trakcie trwania symbiozy z roślinami motylkowatymi, natomiast poza rośliną nie są

w stanie przeprowadzać tego procesu. Wyjątkiem są bakterie należące do rodzaju *Azorhizobium*. Są to ruchliwe, urzęsione pałeczkami o dość krótkim czasie generacji wynoszącym od 3 do 5 godzin, które wiążą azot żyjąc w glebie [Małek i Sajnaga, 1999].

Sinorhizobium meliloti to bakteria symbiotyczna kilku ważnych roślin paszowych; lucerny (*Medicago*), nostryka (*Melilotus*) oraz kozieradki (*Trigonella*). Na genom *S. meliloti* składają się trzy odrębne, koliste replikony – chromosom i dwa plazmidy [Barnett i wsp., 2005].

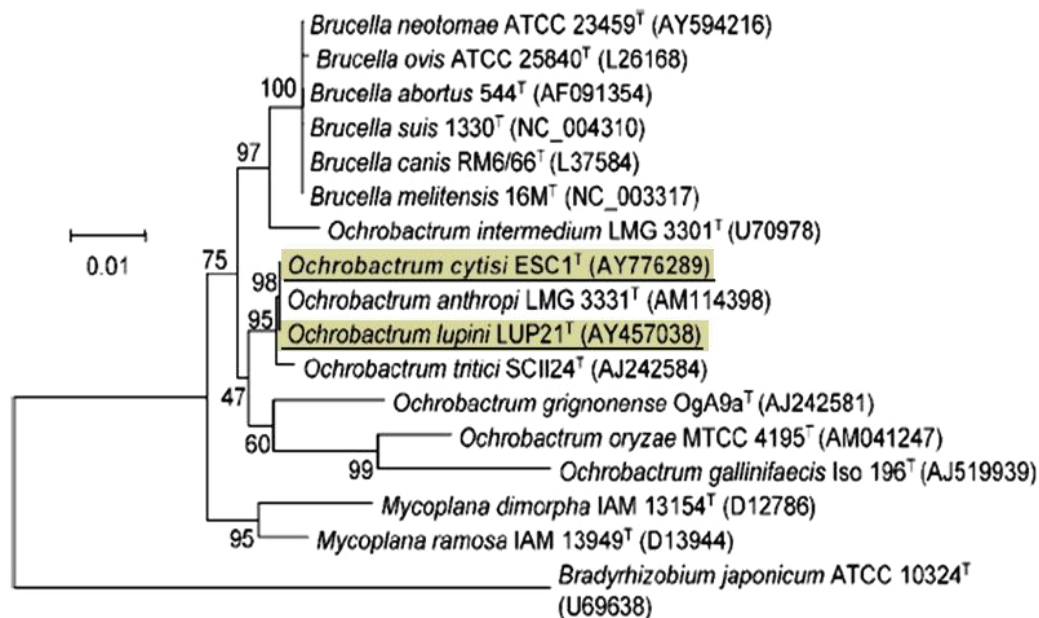
I.2.3.1 Charakterystyka rodzaju *Ochrobactrum*

Do rodzaju *Ochrobactrum* zaklasyfikowano obecnie 18 gatunków, do których zaliczamy m.in. ludzkie patogeny (np. *O. anthropi*) oraz bakterie symbiotyczne roślin motylkowatych (*Ochrobactrum lupini* i *O. cytisi*) (**Ryc. 1**).

Ochrobactrum cytisi ESC1^T jest szczepem wyizolowanym z brodawek korzeniowych żarnowca miotlastego (*Cytisus scoparius*). Jest on również mikrosymbiontem lucerny (*Medicago polymorpha*) i należy do grupy szybko rosnących α -ryzobiów. Szczep ten jest istotny i wyjątkowy nie tylko ze względu na zdolność wchodzenia w układy symbiotyczne, ale również ze względu na jego wykorzystanie do biosorpcji metali ciężkich takich jak Cu, Zn i Cd [Zurdo-Pineiro i wsp., 2007].

Ochrobactrum lupini LUP21^T to szybko rosnący symbiont *Lupinus honoratus* posiadający również zdolność zakażenia innych roślin motylkowatych z rodzaju *Lupinus*. W komórkach *O. lupini* wykazano obecność trzech plazmidów, na których zlokalizowano geny *nodD* i *nifH* nabyte poprzez horyzontalny transfer genów [Trujillo i wsp., 2005]. Pewne szczepy *O. lupini* wykazują zdolność do biodegradacji insektycydów takich jak np. β -cypermetryny (β -CP), środka owadobójczego stosowanego m.in. w rolnictwie, którego działanie może mieć toksyczny wpływ na układ nerwowy i rozrodczy człowieka [Chen i wsp., 2011].

Szczepy *Ochrobactrum* mogą być, więc wykorzystywane w celach ochrony środowiska, bioremediacji zakażonych gleb i wód powierzchniowych a układy symbiotyczne z udziałem bakterii ryzobiowych, jako najwydatniejsze systemy biologicznej redukcji azotu, mogą w przyszłości znaleźć potencjalne wykorzystanie w tworzeniu szczepionek mikrobiologicznych [Poddębniak i Jafra, 2009].



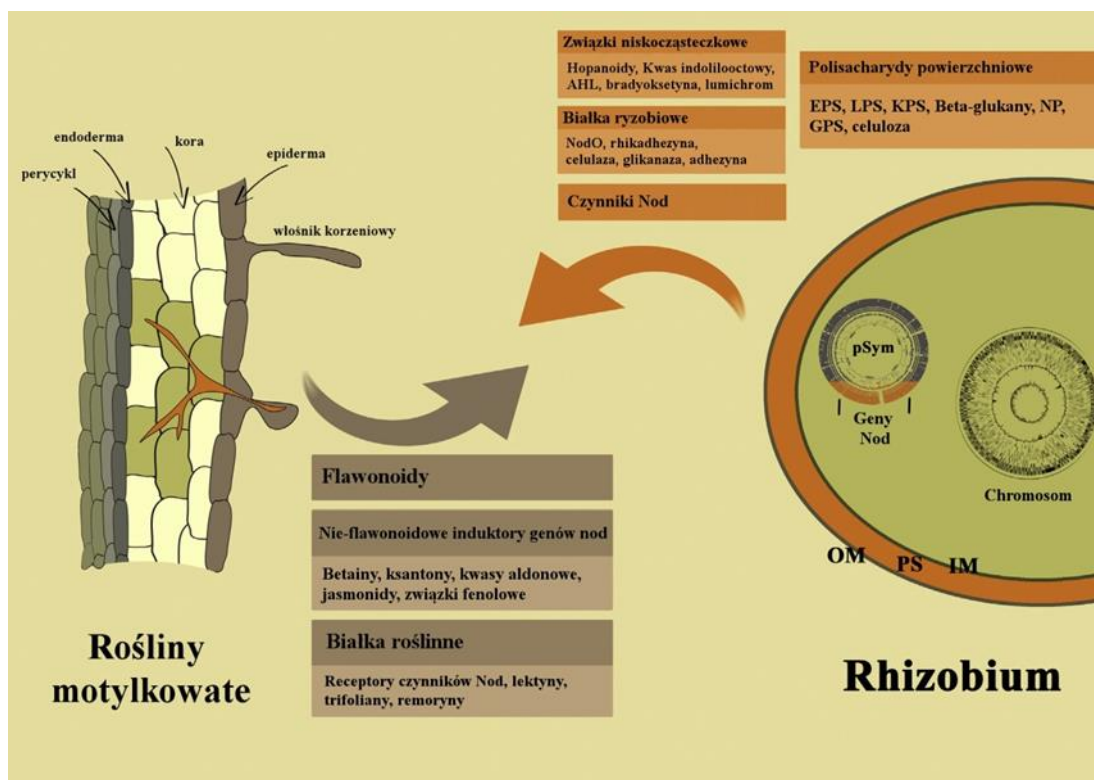
Ryc. 1. Drzewo filogenetyczne obejmujące rodzaj *Ochrobactrum* [Na podstawie Zurdo-Pineiro i wsp., 2007].

Badane szczepy *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T są blisko spokrewnionymi z takimi patogenami jak np. *Brucella abortus* czy *Brucella melitensis* [Bathe i wsp., 2005]. Dlatego też niezwykle ważne jest poznanie budowy struktur powierzchniowych i tych bakterii. Umożliwi to zrozumienie znaczenia elementów strukturalnych membrany w mechanizmach identyfikacji we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Porównanie struktur powierzchniowych różnych symbiontów pozwoli na identyfikację czynników strukturalnych wytyczających granicę, jaka dzieli zjawiska symbiozy i patogenezy.

I.2.4 Mechanizm wiązania azotu

Symbioza to proces złożony, do zaistnienia, którego niezbędna jest wymiana wielu sygnałów pomiędzy roślinnym gospodarzem i jego mikrosymbiontem bakteryjnym. Mechanizm ten jest inicjowany przez flawonoidy wydzielane przez włosniki korzeniowe roślin w odpowiedzi, na które aktywowana jest ekspresja bakteryjnych genów *nod* odpowiadających za produkcję chitolipooligosacharydów - czynników Nod. Pomimo, iż korzyści z procesu są obustronne to kontrolę nad przebiegiem symbiozy w głównej mierze pełni roślina. Decyduje ona o tym czy dopuścić do infekcji włosników korzeniowych przez dany szczep bakteryjny

i promuje pierwsze etapy formowania brodawek korzeniowych. Efektywna symbioza jest więc procesem bardzo złożonym, do którego zaistnienia niezbędne są czynniki roślinne, a także bakteryjne (**Ryc. 2**). Wśród czynników roślinnych najważniejszym aktywatorem ekspresji genów *nod* są flawonoidy. Podobną funkcję pełnią również induktory nieflawonoidowe tj. betainy, ksantony, kwasy aldonowe czy związki fenolowe. Powodują one aktywację bakteryjnych genów nodulacji zlokalizowanych na chromosomach bądź plazmidach symbiotycznych. W wyniku ekspresji tych genów dochodzi do produkcji specyficznych czynników Nod, aktywujących dalsze etapy kaskady dialogu molekularnego pomiędzy bakterią a rośliną [Deakin i Broughton, 2009]. W procesie biorą również udział związki niskocząsteczkowe tj. hopanoidy oraz specyficzne białka ryzobiowe. Czynnikiem bakteryjnym o znacznym wpływie na przebieg symbiozy jest obecność specyficznych struktur powierzchniowych. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują lipopolisacharyd, egzopolisacharyd a także β -glukany, których rola w procesie symbiozy zostanie szczegółowo omówiona w kolejnych rozdziałach.



Ryc. 2. Schemat interakcji symbiotycznych pomiędzy roślinami motylkowatymi a *Rhizobium* [Na podstawie: Janczarek i wsp., 2014].

Proces infekcji u większości roślin motylkowatych zapoczątkowywany jest na włosnikach korzeniowych. Po adhezji do włosników ryzobia zapoczątkowują ich deformacje i skręcanie. Skręcający się włosnik otacza bakterie – wiążąc je w strukturze przypominającej „laskę pasterza”. Tworzą się małe mikrokolonie. Bakterie powodują lokalną degradację ściany komórkowej, po której następuje tworzenie podobnej do tuby struktury zwanej nicią infekcyjną. Nicią infekcyjną dąży do zalążka brodawki, gdzie do wnętrza komórek roślinnych uwalniane są bakterie. Bakterie przeistaczają się w formy symbiotyczne zwane bakteroidami. Dopiero bakteroidy zdolne są do redukcji azotu atmosferycznego do amoniaku przy wykorzystaniu enzymatycznego kompleksu nitrogenazy. Brodawka stanowi specyficzną niszę o niskim stężeniu tlenu cząsteczkowego, w której panują sprzyjające warunki do procesu biologicznego wiązania azotu. W ten sposób nitrogenaza jest chroniona przed dezaktywacją. Wyprodukowany przez bakterie amoniak w następnych etapach jest transportowany z brodawek do pozostałych tkanek roślinnego gospodarza. W zamian za to roślina dostarcza kwasów dikarboksylowych będących źródłem węgla dla komórek bakteryjnych.

I.2.5 Rodzaje brodawek korzeniowych

Brodawki korzeniowe roślin motylkowatych są specyficznymi organami, w których przy udziale bakterii symbiotycznych zachodzi asymilacja azotu atmosferycznego. Charakteryzują się one złożoną strukturą anatomiczną i cytologiczną i stanowią specyficzną niszę środowiskową dla symbiosomów. Występują one częściej na korzeniach, a więc w środowisku o obniżonej ilości tlenu atmosferycznego, są także (w przypadku roślin tropikalnych) spotykane na łądygach.

Ich tworzenie jest indukowane poprzez podziały komórkowe w korze pierwotnej korzenia aktywowane poprzez działanie lipooligochitozanu (czynnika Nod). Komórki te zostają zainfekowane na drodze endosymbiozy przez bakterie dostające się do cytoplazmy poprzez nici infekcyjną. W następstwie wniknięcia do cytoplazmy komórki roślinnej potencjalnie patogennych komórek bakteryjnych dochodzi do wytworzenia błony peribakteroidalnej. Pęcherzyk ten ma za zadanie odseparować ryzobia od cytoplazmy komórki gospodarza. Kolejno następuje intensywne różnicowanie komórek gospodarza i mikrosymbionta w wyniku, którego zachodzi reorganizacja struktury, funkcji i metabolizmu obu organizmów. Efektywna

brodawka zawiera dojrzałe bakteroidy zdolne do redukcji azotu atmosferycznego. Bakteroidy ze względu na obecność nitrogenazy wymuszają na roślinie stworzenie w brodawce środowiska mikroareofilnego. Jest to podyktowane bardzo dużą wrażliwością nitrogenazy na tlen. Jednocześnie proces asymilacji wymaga dostarczania znacznych ilości energii. Te sprzeczne cele pogodzone zostały dzięki wytworzeniu bariery dyfuzyjnej dla tlenu oraz obecności wiążącej tlen leghemoglobinie [Gibson i wsp., 2008].

Ze względu na kształt, aktywność merystemu oraz rodzaj eksportowanych asymilatów wyróżniono trzy główne typy brodawek. W podziale tym wyróżniono tzw. brodawki niezdeteminowane, zdeterminowane i brodawki kołnierzykowate.

Niezdeteminowana brodawka korzeniowa zawiera szereg stref rozwojowych. Na ciągle rosnącym wierzchołku brodawki zlokalizowana jest strefa merystematyczna gdzie zachodzą ciągle, liczne podziały komórek (strefa I). Pod nią znajduje się obszar inwazji komórek bakteryjnych i obszar wiązania azotu przeprowadzany przez bakteroidy (strefa II i strefa III). W brodawkach starzejących się wyróżniamy jeszcze strefę IV, w której następuje degradacja komórek, a w szczególności bakteroidów.

Brodawki niezdeteminowane występują głównie u roślin strefy umiarkowanej. Są to między innymi koniczyna, wyka, groch, lucerna. Charakteryzują się wydłużonym, cylindrycznym kształtem a ich merystem wierzchołkowy jest zdolny do podziałów przez cały okres wegetatywny. Ryzobia po wnikięciu do rośliny i adaptacji w brodawce podlegają nieodwracalnym przemianom morfologicznym i metabolicznym, w wyniku których przekształcają się w dojrzałe bakteroidy. W konsekwencji bakteroid nie jest w stanie przeżyć poza środowiskiem brodawki. Związany azot eksportowany jest w postaci amidów [Borucki, 1998].

Brodawki zdeterminowane formowane są na roślinach strefy tropikalnej (fasola, soja). Ich merystem ma zdolności do podziałów tylko podczas etapu kolonizacji brodawki, później zdolność ta zanika. Z tego też powodu brodawki zdeterminowane mają kulisty kształt i brak jest strefowości tkanki bakteroidalnej. Po uwolnieniu z brodawki komórki bakteryjne mają możliwość ponownego przekształcenia się w bakterie wolnożyjące. Związany azot eksportowany jest w postaci ureidów [Mergaert i wsp., 2006].

Brodawki kołnierzykowate spotykane są u roślin rodzaju *Lupinus*. W ich przypadku tkanka bakteroidalna również wykazuje strefowość a merystem może funkcjonować przez cały sezon wegetacyjny, obrastając korzeń rośliny. Tkanka

bakteroidalna zróżnicowana jest na obszar wczesnej symbiozy, dojrzałej symbiozy oraz starzenia się. Związany azot, podobnie jak w przypadku brodawek niezdeteminowanych, eksportowany jest w postaci amidów.

I.2.6 Czynniki wpływające na przebieg symbiozy

I.2.6.1 Czynniki pochodzenia roślinnego

I.2.6.1.1 Flawonoidy

Symbioza pomiędzy ryzobiami a roślinami motylkowatymi opiera się na wzajemnym rozpoznaniu cząsteczek sygnałowych, produkowanych przez obu partnerów. Rośliny motylkowate wydzielają liczne metabolity wtórne do ryzosfery. Wśród nich największe znaczenie w oddziaływaniach pomiędzy mikro – i makrosymbiontem mają flawonoidy [Hirsch 1992]. Aktualnie zidentyfikowanych zostało ponad 10 000 różnych flawonoidów [Ferrer i wsp., 2008].

Flawonoidy stanowią pierwszy sygnał dialogu molekularnego pomiędzy partnerami symbiozy. Uwalniane przez korzenie roślin odgrywają rolę chemoatraktantów dla ryzobiów bytujących w glebie oraz rolę induktorów bakteryjnych genów *nod*. Ponadto hamują wzrost konkurencyjnych bakterii [Tai i wsp., 1991]. Flawonoidy to policykliczne związki aromatyczne, zidentyfikowane jako pochodne 2-fenylo-1,4-benzopirenu. Głównym prekursorem wszystkich związków flawonoidowych jest chalkon otrzymywany w szlaku syntezy fenylopropanoidowego przy udziale enzymu syntazy chalkonu poprzez kondensację 4-kumarolo-CoA. Specyficzne modyfikacje tej podstawowej struktury stanowią podstawę podziału tych związków na klasy. Modyfikacje szkieletu mogą obejmować: glikozylacje, metylacje, hydroksylacje czy też podstawianie reszt acylowych. Obecność podstawników, ich rodzaj i ilość wpływa na właściwości danego związku. Wśród tysięcy flawonoidów wymienić można: antocyjany, chalkony, katechiny, flawony, flawonole, flawanony, flawanonole i izoflawony [Barnett i Fisher, 2006, Janczarek i wsp., 2014]. Flawonoidy poza symbiozą odgrywają rolę w wielu istotnych dla roślin procesach tj.: ochrona przed promieniowaniem UV, determinacja płci, morfogeneza, przepływ energii, fotosynteza, oddychanie, regulacja ekspresji genów i regulacja syntezy hormonów. Na zróżnicowanie i ilość flawonoidów ma wpływ wiek i stan fizjologiczny rośliny a także warunki środowiska tj. intensywność światła, temperatura i stężenie związków azotu. Największą ilość flawonoidów zaobserwować można w obszarze komórek czapeczki korzenia głównego i przy korzeniach bocznych.

Flawonoidy są wydzielane do ryzosfery w sposób ciągły, ale ich ilość i zróżnicowanie wzrasta w trakcie kontaktu z kompatybilnym mikrosymbiontem. W początkowym etapie następuje wiązanie flawonoidów z bakteryjnym białkiem NodD należącym do rodziny regulatorów transkrypcyjnych LysR. Tak zaktywowane białko NodD przylacza się do promotorów *nod*-box, indukując transkrypcję genów *nod* (ang. *nodulation*) odpowiedzialnych za syntezę czynników Nod. Konkretny flawonoid dla jednego gatunku bakterii może być induktorem symbiozy, a dla innego inhibitorem. Przykładem jest genisteina i daidzeina aktywujące geny *nod* u *B. diazoefficiens* i u *S. sp.* NGR234 a będące represorami tych samych genów u *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i *R. leguminosarum* bv. *viciae* [Firmin i wsp., 1986; Begum i wsp., 2001]. Luteolina i 7,4'-dihydroksyflawon indukują geny *nod* *S. meliloti* podczas gdy genisteina hamuje ich ekspresję [Kosslak i wsp., 1987; Hartwig i wsp., 1990; Peck i wsp., 2006]. Specyficzne flawonoidy mogą również wpływać na ekspresję niektórych genów kodujących białka zaangażowane w I i III system sekrecji oraz białka uczestniczące w syntezie polisacharydów ryzobiowych. [Krehenbrink i Downie, 2008; Downie, 2010; Janczarek i Skorupska, 2004, 2011; Deakin i Broughton, 2009]. W przypadku większości flawonoidów już nanomolarne i mikromolarne stężenia są wystarczające do indukcji genów *nod*. Stwierdzono również, że mieszanina różnych flawonoidów działa skuteczniej na indukcję ekspresji genów *nod* [Begum i wsp., 2001]. Niektóre flawonoidy są ponadto w stanie stymulować wzrost komórek bakteryjnych. U *S. meliloti* dzieje się tak pod wpływem luteoliny, 4,4'-dihydroksy-2-metoksychalkonu, 7,4'-dihydroksyflawonu i 7,4'-dihydroksyflawanonu [Caetano-Anolles i wsp., 1988; Dharmatilake i Bauer, 1992; Cooper, 2004]. Analogicznie apigenina, naryngenina i kampferol są chemoatraktantami dla *R. leguminosarum* bv. *viciae*. Podobną funkcję pełnią apigenina, luteolina acetosyringon i umbeliferon u *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. [Armitage i wsp., 1988, Aguilar i wsp., 1988].

1.2.6.1.2 Związki nieflawonoidowe

Poza flawonoidami również szereg innych roślinnych metabolitów może indukować ekspresję genów *nod* i wyzwać interakcje symbiotyczne. Związki te są jednak mniej specyficzne niż flawonoidy i do wywołania efektu niezbędne są ich wysokie stężenia rzędu od kilku mikromoli do milimoli [Cooper, 2004, 2007]. Wśród

tych metabolitów wyróżnić możemy betainy takie jak stachydryna i trigonelina wydzielane przez *Medicago* spp., które wspólnie z aktywatorem transkrypcyjnym NodD2 aktywują ekspresję niektórych genów *nod* u *S. meliloti* [Phillips i wsp., 1992]. Analogiczne działanie wykazują kwasy aldonowe tj. kwas erytronowy i tetronowy indukujące ekspresję genów u *R. lupini* i *M. loti* [Gagnon i Ibrahim, 1998]. Takie samo działanie wykazuje kwas jasmonowy oraz jego pochodne na bakterie należące do gatunku *R. leguminosarum* i *B. diazoefficiens*. Jasmonaty w stężeniu przekraczającym 50 μ M mają wpływ na przebieg infekcji włośnikowej poprzez modyfikację sygnału wapniowego [Sun i wsp., 2006].

Proste związki fenolowe tj. wanilina i izowanilina pochodzące z roślin nienależących do motylkowatych (np. pszenica) również wykazują aktywność w indukcji genów *nod* u *S. sp* NGR234 [Le Strange i wsp., 1990]. Takie samo działanie wykazują ksantony w kontakcie z *Bradyrhizobium diazoefficiens* [Yuen i wsp., 1995]. Tak duża różnorodność związków zdolnych do indukcji genów *nod* wydaje się korzystna dla bakterii symbiotycznych ze względu na znaczne zróżnicowanie środowiska. Umożliwia także zoptymalizowanie ekspresji tych genów w zależności od potrzeb.

I.2.6.2 Czynniki pochodzenia bakteryjnego

I.2.6.2.1 Geny *nod*–*nif*

Wśród genów regulujących przebieg symbiozy możemy wyróżnić grupę odpowiedzialną za syntezę czynników Nod, czyli geny *nod*, *nol* i *noe* oraz grupę odpowiedzialną za dalsze etapy procesu symbiozy, czyli geny *nif* i *fix*. Zlokalizowane są one zazwyczaj na jednym z megaplazmidów nazywanym przez to plazmidem symbiotycznym (pSym). W ten sposób ułożone są geny m.in. u *R. leguminosarum*, *S. meliloti* czy *R. etli*. U części ryzobiów geny nodulacji występują tylko na chromosomie w regionie nazywanym wyspą symbiotyczności. Wyspy symbiotyczne są jednym z typów wysp genomowych, pozostałością po poziomym transferze genów. Są one analogiczne do wysp patogeniczności występujących u bakterii Gram-ujemnych. Zlokalizowano je np. w genomach *Mesorhizobium loti* i *Bradyrhizobium diazoefficiens* (*B. japonicum*). U szczepów *M. loti* ich wielkość waha się w granicach 501-610 kb. Charakteryzują się one niższą zawartością par GC w stosunku do reszty sekwencji [Sullivan i wsp., 2002; Kaneko i wsp., 2002; Palacios i Newton, 2005].

Geny nodulacji w zależności od funkcji można podzielić na 3 grupy:

1. *Common nod genes (nodABC)* – obecne praktycznie u wszystkich ryzobiów za wyjątkiem fotosyntetyzujących bradyrizobiów i niektórych gatunków *Burkholderia*. Geny *nodABC* - odpowiadają za syntezę podstawowej podjednostki czynnika Nod.
2. Grupa specyficznych genów gospodarza zaangażowanych w modyfikację rdzenia. Należą tu np. geny *nodEF*, *nodG*, *nodH*, *nodPQ*.
3. Geny regulatorowe odpowiadające za kontrolę ekspresji pozostałych genów (np. *nodD*, *nolR*, *nodUV*).

U *Bradyrhizobium* ORS278 i BTAi1, u których nie zidentyfikowano genów *nodABC* za kontrolę przebiegu symbiozy odpowiedzialny jest nowy, nieznany dotychczas mechanizm oparty na działaniu pochodnej puryny [Horvath i wsp., 1986; Göttfert i wsp., 1990; Lerouge i wsp., 1990; Sanjuan i wsp., 1994; Moulin i wsp., 2001; Schlaman i wsp., 2006; Giraud i wsp., 2007].

Produkt genu *nodD* jest regulatorem transkrypcyjnym, który po rozpoznaniu specyficznego flawonoidu umożliwia rozpoczęcie transkrypcji genów *nod*. Białko NodD jest wydzielane w sposób ciągły. U *R. leguminosarum* wykryto obecność tylko jednej kopii tego genu, tak, więc mutacja w jego obrębie skutkuje utratą zdolności do brodawkowania. Natomiast u *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *S. meliloti* i *R. tropici* zidentyfikowano 2-5 kopii genu *nodD* [Spaink, 2000; Brencic i Winans, 2005]. Białko NodD należy do rodziny regulatorów transkrypcji LysR. Geny kodujące tego typu regulatory rozpoznają motyw 50 charakterystycznych, konserwatywnych nukleotydów zlokalizowanych w regionach promotorowych.

W oparciu o sekwencje genów nodulacji konstruuje się dendrogramy obrazujące filogenezę ryzobiów. Pomimo rozbieżności, jaka występuje przy konstruowaniu drzew filogenetycznych w oparciu o sekwencje 16S i 23S rRNA istotnym czynnikiem przemawiającym za klasyfikacją opartą na genach symbiotycznych jest fakt, iż posiadają one bezpośrednie fenotypowe przełożenie. Analiza tych sekwencji jest wysoce zgodna z grupowaniem roślinnych gospodarzy. Stwarza to możliwość badania toku ewolucji układów symbiotycznych. [Suominen i wsp., 2003].

I.2.6.2.2 Czynniki Nod

Białka Nod są produktami genów *nod* i funkcjonują jako czynniki inicjujące mechanizm brodawkowania. Stanowią one bardzo zróżnicowaną grupę związków, specyficzną dla poszczególnych gatunków ryzobiów (**Tabela 2**). Pierwszym wyizolowanym i scharakteryzowanym czynnikiem był Nod factor u *R. meliloti*. Podstawową jednostką strukturalną związku jest szkielet cukrowy zbudowany z 2-6 reszt *N*-acetylo-D-glukozaminy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi oraz jednej reszty kwasu tłuszczowego o zróżnicowanej długości i stopniu nasycenia.

Za syntezę szkieletu *N*-acetylo-D -glukozaminy odpowiedzialny jest produkt genu *nodC*. Stopień polimeryzacji rdzenia, typ kwasów tłuszczowych, a także obecności innych podstawników tj. np. fukozy, acetylu, arabinozy, mannozy jest uzależniona od działania enzymów będących produktami genów *hsn*. Zarówno skład jak i stężenie czynników produkowanych przez dany szczep może być modyfikowane w zależności od warunków środowiska. Przykładowo *R. tropici* CIAT899 produkuje 52 różne NF w środowisku kwasowym a tylko 29 w pH neutralnym [Morón i wsp., 2005; Kannenberg i Carlson, 2005].

W odpowiedzi na czynnik Nod u roślin zachodzi szereg zmian umożliwiających bakteriom zakażanie i kolonizację włosników korzeniowych, a następnie prowadzących do rozwoju brodawki korzeniowej. Pierwszym etapem jest depolaryzacja błony komórkowej i wpływ jonów wapnia [Catoira i wsp., 2000]. Czynnik Nod wywołuje pulsacyjny przepływ jonów wapnia z przestrzeni międzykomórkowych do cytoplazmy w ciągu pierwszych minut jego działania, co powoduje depolaryzację błony komórkowej [Cárdenas i Holdaway-Clarke, 2000]. Zmiany stężenia wapnia wokół jądra zaczynają się około 10 minut po odebraniu bodźca czynnika Nod [Walker i wsp., 2000].

Tabela 2. Czynniki i geny *nod* ryzobiów [Na podstawie Rhijn i wsp., 1995].

Rodzaj	Gatunek	Gospodarz roślinny	Geny <i>nod</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	Brodawki łodygowe (<i>Sesbania</i>)	<i>nodABCDIJS</i> , <i>nolK</i>
	<i>spp.</i>	niemotylkowate (<i>Parasponia</i>)	<i>nodABCD</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>diazoefficiens</i> (<i>japonicum</i>)	Soja (<i>Glycine</i>)	<i>nodABCIJDSZ</i> , <i>nol A</i>
	<i>spp.</i>	tropikalne motylkowe (<i>Arachis</i> , <i>Lucerna</i>)	<i>nodABCDJLM</i>

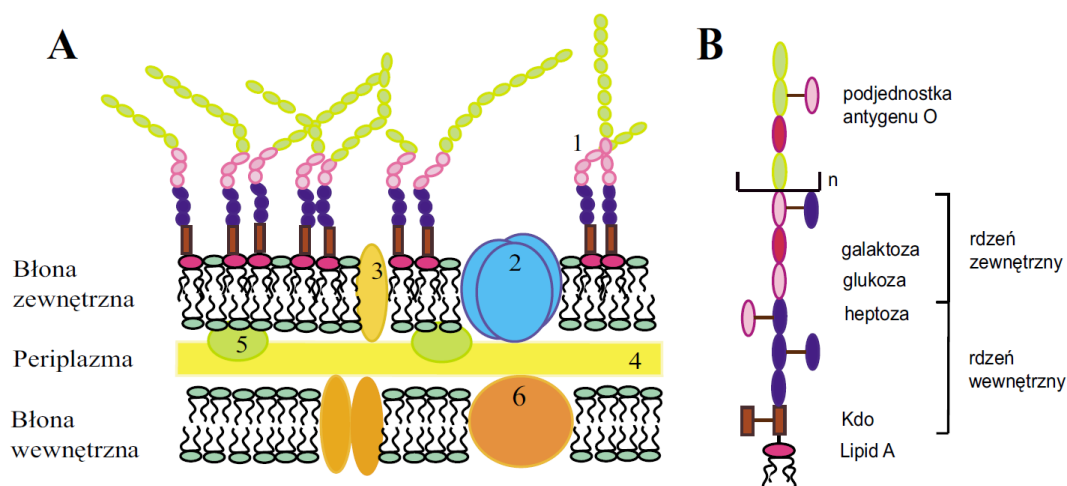
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	komonica (<i>Lotus</i>), łubin (<i>Lupinus</i>), <i>Leucaena</i> , mimosa (<i>Mimosa</i>), <i>Macroptilium</i>	<i>nodABCD</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti</i>	lucerna (<i>Medicago</i>), nostryk (<i>Melilotus</i>) i kozieradka (<i>Trigonella</i>)	<i>nodABCDFHJQ</i> , <i>nodR</i>
	<i>medicae</i>	lucerna (<i>Medicago</i> spp.)	<i>nodABCD</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>etli</i>	fasola (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>nodABCDIJS</i>
	<i>leguminosarum</i> <i>bv. phaseoli</i>	fasola (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>nodABCDFJLM</i>
	<i>leguminosarum</i> <i>bv. trifolii</i>	koniczyna (<i>Trifolium</i>)	<i>nodABCDIJ</i>
	<i>leguminosarum</i> <i>bv. viciae</i>	groch (<i>Pisum</i>), wyka (<i>Vicia</i>), groszek (<i>Lathyrus</i>) i soczewica (<i>Lens</i>)	<i>nodABCDIJ</i>
	<i>sp. NGR234</i>	wiele	<i>nodABCD</i>
	<i>tropici</i>	fasola (<i>Phaseolus vulgaris</i>), <i>Leucaena</i>	<i>nodABCD</i>

I.3 BAKTERYJNE POLISACHARYDY POWIERZCHNIOWE

I.3.1 LIPOPOLISACHARYDY (LPS)

Ściana komórkowa to jedna z najbardziej złożonych chemicznie struktur komórek bakteryjnych. Nadaje komórce kształt i sztywność umożliwiając jednocześnie selektywną przepuszczalność dla soli mineralnych i innych drobnocząsteczkowych substancji. Występuje ona zarówno u bakterii Gram-ujemnych jak i Gram-dodatnich. Wykazuje jednak bardzo duże zróżnicowanie strukturalne. Bakterie Gram-dodatnie charakteryzuje obecność bardzo grubej warstwy mureiny połączonej z kwasami tejchojowymi i tejchuronowymi. W przypadku bakterii Gram-ujemnych warstwa peptydoglikanu jest znacznie cieńsza i okryta dwuwarstwową błoną zewnętrzną (**Ryc. 3**).

Błona zewnętrzna (OM - *outer membrane*) stanowi warstwę plastyczną o niejednorodnym składzie. W wewnętrznej warstwie występują fosfolipidy, natomiast warstwę zewnętrzną tworzy lipopolisacharyd. Ponadto obecne są liczne białka pełniące rolę m.in. w stabilizacji struktury czy też transporcie substancji ze środowiska zewnętrznego do wnętrza komórki i odwrotnie.



Ryc. 3. **A** - Schemat budowy ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych; 1 – lipopolisacharyd (LPS), 2 – poryna, 3 – nieporynowe białko błony zewnętrznej, 4 – peptydoglikan, 5 – lipoproteina, 6 – białko błony cytoplazmatycznej; **B** – schemat budowy cząsteczki lipopolisacharydu [Kaszowska, 2004].

Lipopolisacharyd (LPS) nazywany również ze względu na immunogenne właściwości endotoksyną, czy też antygenem somatycznym stanowi najważniejszy składnik błony zewnętrznej bakterii Gram-ujemnych. Odgrywa on istotną rolę w indukcji procesu symbiozy pomiędzy bakteriami i roślinami motylkowatymi. LPS nadaje zewnętrznej membrane odpowiednią architekturę, dzięki czemu symbiosomy mają prawidłową budowę i są w pełni funkcjonalne. Dodatkowo struktury powierzchniowe zapobiegają powstawaniu reakcji nadwrażliwości u roślinnego gospodarza. Pod względem strukturalnym charakteryzuje się wspólnym planem budowy, na który składają się trzy regiony różniące się pod względem funkcji i struktury chemicznej tj. lipid A kotwiczący lipopolisacharyd w membranie zewnętrznej, oligosacharyd rdzeniowy (*core*), łączący lipid A z trzecią domeną LPS, którą jest polisacharyd O-swoisty (antygen O). Pomimo wspólnego schematu budowy lipopolisacharydów bakteryjnych w obrębie poszczególnych domen występuje jednak znaczne zróżnicowanie struktur [Różalski, 1995b].

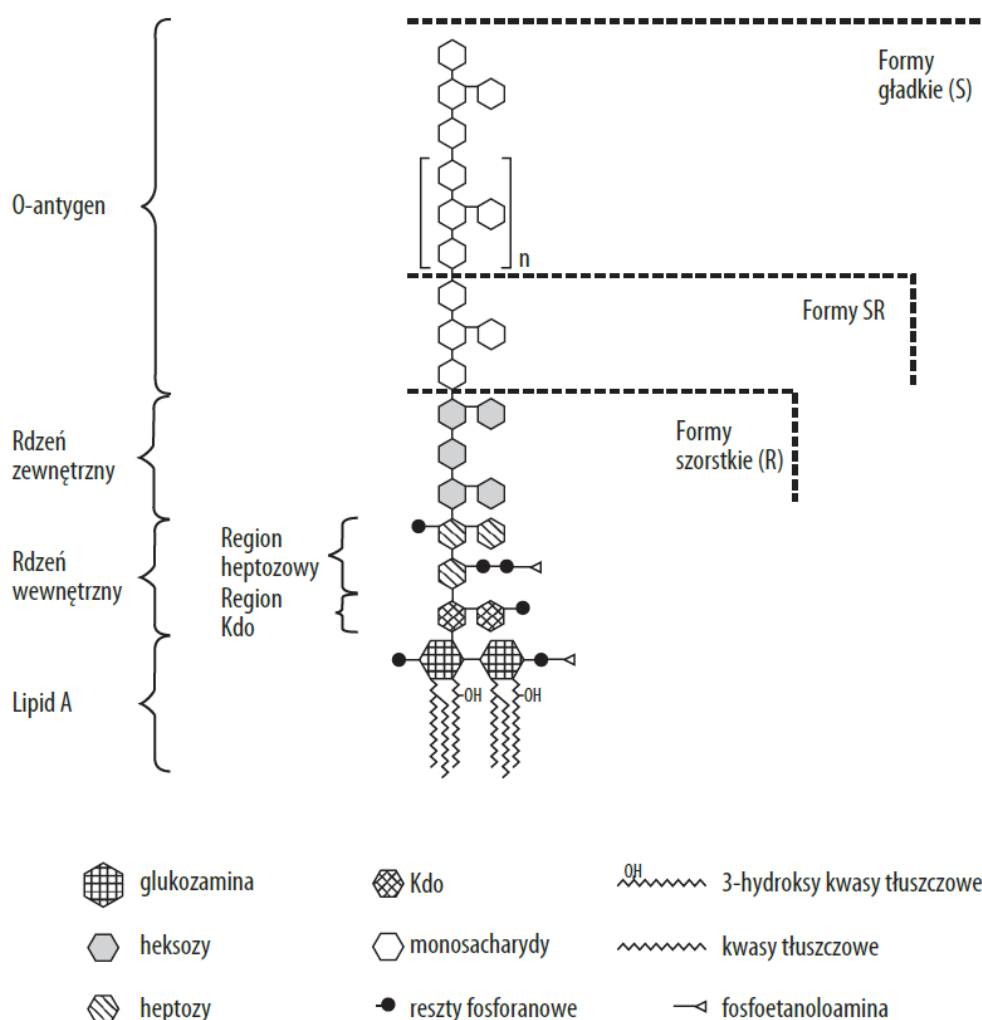
Antygen O determinuje serologiczną swoistość lipopolisacharydu danego szczepu bakterii i jest najbardziej zmienną komponentą. Strukturalnie jest to heteropolimer zbudowany z powtarzających się podjednostek oligosacharydowych różniących się rodzajami cukrów, typami wiązań oraz niecukrowymi podstawnikami [Gibson i wsp., 2008].

Oligosacharyd rdzeniowy również wykazuje dość dużą heterogenność. Zróznicowanie struktury tego regionu jest jednak mniejsze niż w przypadku łańcucha O-swoistego. Plan budowy w zależności od chemotypu bakterii może składać się z części heksozowej, heptozowej oraz tzw. regionu Kdo zbudowanego z kwasu 2-keto-3-deoksyoktonowego [Różalski, 1995a].

Lipid A określa się czasem mianem najbardziej konserwatywnego składnika lipopolisacharydów. W jego strukturze możemy wyróżnić szkielet cukrowy zbudowany często z disacharydu podstawionego zazwyczaj 3-hydroksykwasami tłuszczowymi, do których z kolei mogą być przyłączone estrowo inne kwasy tłuszczowe. Pomimo dość dużej konserwatywności cząsteczki, u wielu mikroorganizmów występują liczne modyfikacje strukturalne. Heterogenność lipidu A jest zazwyczaj związana z rodzajem i stopniem podstawienia występujących w nim kwasów tłuszczowych [Raetz i Whitfield, 2002, Becker i wsp., 2005, Turska-Szewczuk i Russa, 2004].

Wśród preparatów pochodzących od bakterii symbiotycznych należących do *Rhizobiales* zazwyczaj izoluje się dwa typy frakcji lipopolisacharydu. Pierwsza frakcja wyróżnia się większą masą cząsteczkową. Zawiera ona kompletny lipopolisacharyd składający się z lipidu A, rdzenia i łańcucha O-swoistego i określana jest, jako LPS I lub typ S (ang. *smooth*). Frakcja druga charakteryzuje się mniejszą masą cząsteczkową. LPS izolowany z tych bakterii jest pozbawiony łańcucha O - swoistego i jest określany mianem LPS II lub typu R (ang. *rough*). W przypadku niektórych szczepów bakteryjnych wyizolowano również frakcje pośrednie zawierające LPS z jednym lub kilkoma podjednostkami łańcucha O-swoistego (**Ryc. 4**). Tego typu lipopolisacharydy produkowane są m.in. przez mutanty typu SR i są czasem określane mianem LPS III. Istnieją także tzw. mutanty głęboko szorstkie, syntetyzujące LPS o skróconym rdzeniu [Lodowska i wsp., 2006].

LPS wyizolowany ze ściany komórkowej niektórych mikroorganizmów nieposiadający łańcucha O-swoistego określany jest mianem lipooligosacharydu (LOS) i występuje m.in. u *Chlamydia*, *Haemophilus* czy *Neisseria*.



Ryc. 4. Schemat budowy LPS typowego dla enterobakterii. Zaznaczono różne formy tego glikolipidu (formy S, SR i R) [Lodowska i wsp., 2006].

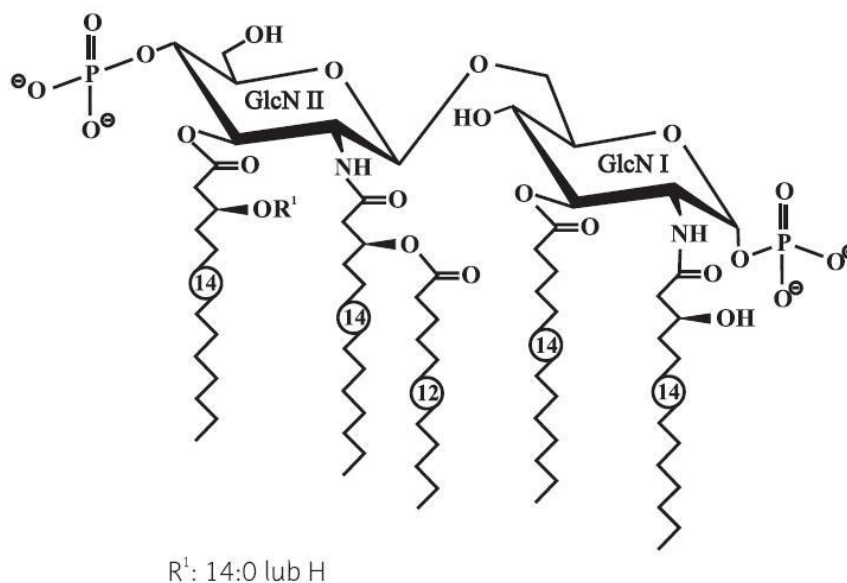
I.3.1.1 Lipid A

Lipid A jest najbardziej konserwatywną częścią lipopolisacharydu. Jednocześnie jest najbardziej aktywnym biologicznie składnikiem uczestniczącym w indukowaniu odpowiedzi immunologicznej podczas infekcji bakteryjnej. Jego aktywność biologiczna determinowana jest liczbą i rozmieszczeniem kwasów tłuszczowych i reszt fosforanowych. Konserwatywność lipidu A jest warunkowana obecnością dwóch podstawowych elementów strukturalnych. Pierwszy fragment stanowi hydrofilowy szkielet cukrowy, na który zazwyczaj składa się disacharyd β -D-glukozaminylo-(1,6)-D-glukozaminy. Szkielet cukrowy jest zawsze O- i N-acylowany. Drugim fragmentem lipidu A jest część hydrofobowa, na którą składają się zazwyczaj

4 cząsteczki kwasów tłuszczowych typu 3-hydroksy z przynajmniej 2 resztami acyloksyacylowymi [Raetz i Whitfield 1990].

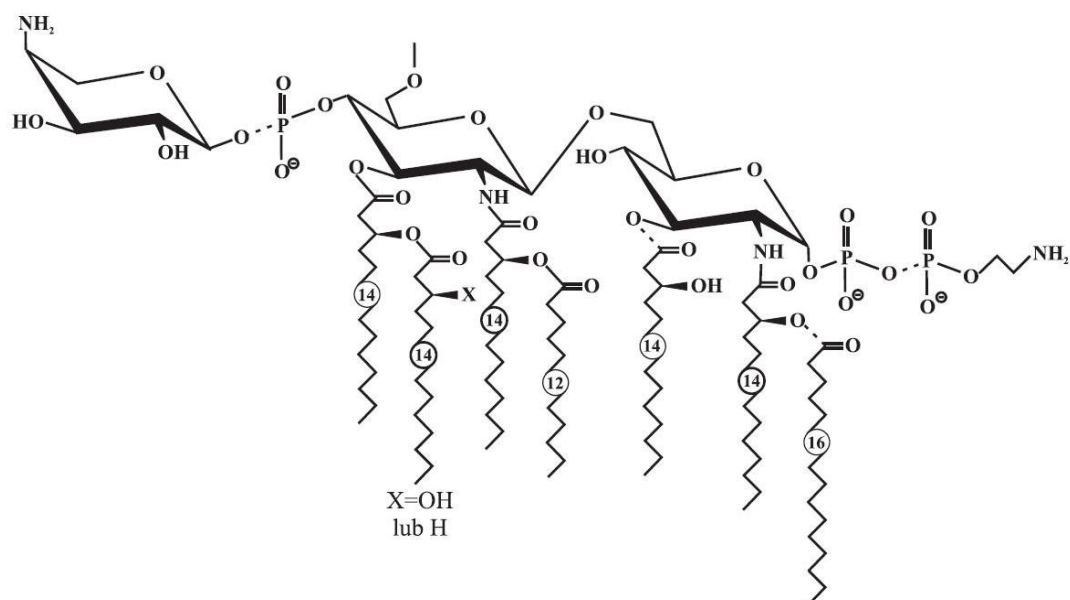
Odstępstwa i modyfikacje od tej struktury mogą dotyczyć zarówno budowy szkieletu cukrowego jak i podstawiających go kwasów tłuszczowych. Sacharydy rdzenia mogą różnić się zarówno składem, typem wiązań, jaki i ufosforylowaniem. Duża zmienność pojawia się również w typie i rozmieszczeniu reszt acyloksyacylowych. Do najczęściej występujących 3-hydroksykwasów możemy zaliczyć m.in. kwas 3-hydroksydodekanowy (3-OH-12:0), 3-hydroksytetradekanowy (3-OH-14:0) i 3-hydroksyheksadekanowy (3-OH-16:0). Do nich poprzez grupę hydroksylową mogą być przyłączone wiązaniem estrowym kwasy nasycone tj. kwas dodekanowy (laurynowy 12:0), tetradekanowy (mirystynowy 14:0), heksadekanowy (palmitynowy 16:0) i inne. Dodatkowo mogą pojawiać się kwasy nienasycone oraz kwasy długołańcuchowe charakterystyczne dla ryzobiowych lipidów A. Badanie zmienności składu lipidów A jest użyteczne w ustalaniu pokrewieństwa filogenetycznego pomiędzy szczepami bakteryjnymi. Dodatkowo znajomość struktury chemicznej pozwala na określenie jego funkcji biologicznej. Lipid A jest połączony z rdzeniem poprzez resztę kwasu 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowego (Kdo) [Anwar, i Choi, 2014].

Dotychczas najlepiej poznane zostały lipidy produkowane przez *Enterobacteriaceae* (**Ryc. 5**). Najwcześniej scharakteryzowano strukturę lipidu A produkowanego przez *Escherichia coli* [Imoto i wsp., 1983]. Rdzeń cukrowy tworzy disacharyd D-glukozaminylo-D-glukozamina. Cukry w nim są połączone wiązaniem $\beta(1-6)$ -glikozydowym. Do szkieletu są przyłączone dwie reszty fosforanowe. Pierwsza przyłączona jest do końca nieredukującego (dystalnego) wiązaniem estrowym w pozycji 4', druga z kolei do końca redukującego (proksymalnego) przy pomocy wiązania α -glikozydowego w pozycji 1. Lipid A łączy się z rdzeniem poprzez podstawienie grupy hydroksylowej przy 6' atomie węgla drugiej glukozaminy przez cząsteczkę Kdo. Jedynie druga grupa hydroksylowa przy 4 atomie pierwszej glukozaminy pozostaje wolna. Disacharyd jest acylowany czterema resztami kwasu β -hydroksymirystylowego. Dwie z nich przyłączone są estrowo w pozycjach 3, 3', a kolejne są związane amidowo w pozycjach 2, 2'. Przy nieredukującej cząsteczce glukozaminy reszty kwasu tłuszczowego mogą być podstawione kwasem laurynowym i mirystynowym [Meredith i wsp., 2006].



Ryc. 5. Schemat budowy lipidu A *E. coli* [Na podstawie Ormeño-Orrillo, 2005].

Tego typu struktura disacharydu została zidentyfikowana nie tylko u nie tylko u *E. coli*, ale również w lipidzie A innych bakterii tj. *Pseudomonas aeruginosa* [Kulshin i wsp., 1991], *Vibrio cholerae* [Broady i wsp., 1981], *Chromobacterium violaceum* [Hase i Reitschel, 1977] czy też *Bordetella pertussis* [Caroff i wsp., 1994]. Podobną strukturą charakteryzuje się również lipid A *Salmonella* sp. jego cząsteczka jest jednak bardziej rozbudowana [Trent, 2004]. Do reszty fosforanowej przy węglu C-1 przyłączona jest fosfoetanolamina, natomiast przy węglu C-4' występuje 4-amino-4-deoksyarabinoza. Do redukującej cząsteczki glukozaminy przyłączony jest amidowo kwas hydroksymirystylowy, do którego z kolei dołączona jest reszta kwasu palmitynowego (**Ryc. 6.**).



Ryc. 6. Schemat budowy lipidu A *Salmonella* sp. [Na podstawie Ormeño-Orrillo, 2005].

U niektórych bakterii komponenta węglowodanowa zbudowana jest z dwóch cząsteczek 2,3-diamino-2,3-dideoksyglukozy (GlcN₃N, DAG) połączonych wiązaniem β-(1-6) glikozydowym. Tego typu disacharyd występuje w tzw. lipidach typu lipid A_{DAG}. Jego obecność wykryto m.in. u *Bartonella henselae*, *Legionella pneumophila*, *Leptospira interrogans*, *Aquifex pyrophilus*, *Pseudomonas diminuta*, *P. vesicularis* czy *Bdellovibrio bacteriovorus* [Kasai i wsp., 1990, Plötz i wsp., 2000, Que-Gewirth i wsp., 2004, Schwudke i wsp., 2003, Weckesser i Mayer, 1988, Zähringer i wsp., 1995, 2004].

Dość często rdzeń cukrowy jest ufosforylowany w pozycjach 1 i 4'. Do reszt fosforanowych mogą być przyłączone podstawniki różnego typu tj. np. etanoloamina, fosfoetanoloamina, grupa metylowa czy też D-arabinofuranoza. Etanoloamina występuje u *Porphyromonas gingivalis* [Kumada i wsp., 1995, Tanamoto i wsp., 1997] oraz u *Campylobacter jejuni* [Moran i wsp., 1991]. Fosfoetanoloamina poza *Salmonella typhimurium* [Trent, 2004] jest obecna u *Rhodobacter capsulatus* [Krauss i wsp., 1989], *Moraxella catarrhalis* [Masoud i wsp., 1994] oraz *Neisseria meningitidis* [Trent, 2004]. U *Leptospira interrogans* badania wykazały obecność grupy metylowej [Que-Gewirth i wsp., 2004]. D-arabinofuranoza jest z kolei obecna w szkieletie cukrowym *Yersinia pestis* [Dalla i wsp., 1985] i *Rhodospirillum tenue* [Tharanathan i wsp., 1978]. Kolejna zmiana strukturalna dotycząca budowy szkieletu cukrowego może się objawiać tym, że disacharyd nie jest ufosforylowany w pozycjach 1 i 4'.

Dodatkowe reszty węglowodanowe jak np. kwas galakturonowy, 4-aminoarabinoza lub mannoza przyłączone są bezpośrednio do disacharydu. Takie struktury występują m.in. u *Aquifex pyrophilus* [Plötz i wsp., 2000], *Bdellovibrio bacteriovorus* [Schwudke i wsp., 2003] i *Rhodocrobium vannielii* [Mayer i wsp., 1984].

Badania lipopolisacharydów wykazały w niektórych przypadkach, że jeden szczep bakteryjny jest zdolny do produkcji lipidów A różnego typu. Mogą także występować rdzenie cukrowe zbudowane z różnego typu monosacharydów. Tego typu mieszaniny lipidów występują np. u bakterii z rodzaju *Thiobacillus* i *Brucella*. W izolacie pochodzącym z bakterii *Campylobacter jejuni* stwierdzono obecność aż trzech postaci lipidu A. Dominującą formą jest mieszany rdzeń cukrowy zbudowany z diaminoglukozy i glukozaminy, dodatkowo występuje cukier zbudowany z 2 cząsteczek diaminoglukozy oraz disacharyd glukozaminylo-glukozaminylowy.

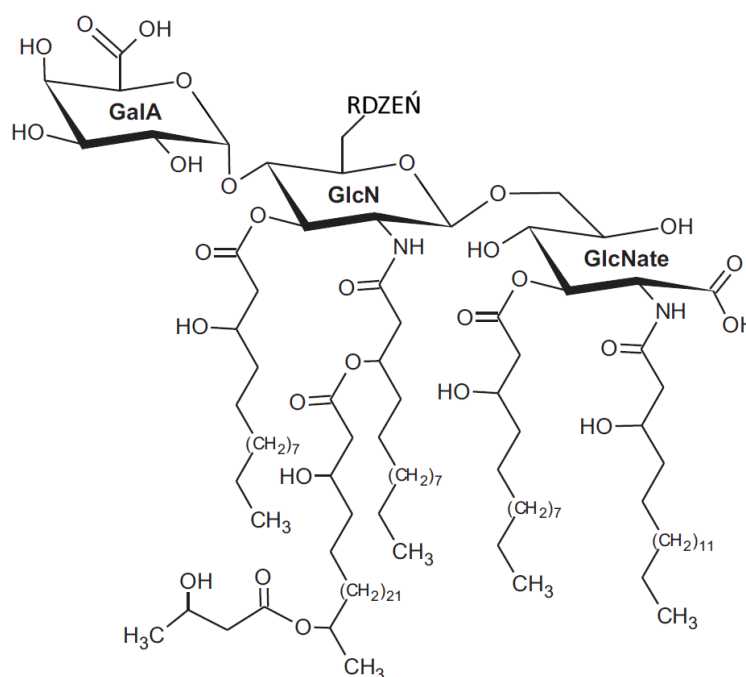
Zróżnicowanie strukturalne lipidu A dotyczy także w dużej mierze rodzaju i rozmieszczenia reszt acylowych przyłączonych do cukrowej komponenty. Pierwszy typ modyfikacji dotyczy stopnia podstawienia disacharydu kwasami tłuszczowymi. Na tej podstawie wyróżnia się triacylowane lipidy A występujące m.in. u *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* [Ogawa, 1993], tetraacylowane lipidy A występujące m.in. u *Francisella tularensis* [Vinogradov i wsp., 2003], pentaacylowane (np. *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Pseudomonas aeruginosa*) [Qureshi i wsp., 1991, Kulshin i wsp., 1991], heksoacylowane lipidy A popularne wśród *Enterobacteriaceae* oraz heptaacylowane lipidy A występujące np. u *Proteus mirabilis* [Sidorczyk i wsp., 1983].

Kolejny typ modyfikacji dotyczy rodzaju podstawników acylowych. Najczęściej dołączanymi kwasami tłuszczowymi są 3-hydroksykwasy bądź 3-oksokwasy. Mogą jednak występować również kwasy nasycone i nienasycone.

Lipidy ryzobiowe cechuje odmienna od lipidów typowych dla enterobakterii struktura. Charakterystyczną cechą jest brak krótkich podstawników acylowych związanych estrowo do 3-hydroksykwasów. Drugą odróżniającą je cechą jest obecność długołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Pierwszym tego typu zidentyfikowanym kwasem był kwas 27-hydroksyoktakozanowy (27-OH-28:0) scharakteryzowany w lipidzie A *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* [Hollingsworth i Carlson, 1989]. W toku późniejszych badań okazało się, że długołańcuchowe kwasy występują u wszystkich ryzobiów za wyjątkiem *Azorhizobium caulinodans*. Z tego też

względę są wykorzystywane, jako marker taksonomiczny podklasy *α-Proteobacteria* [Bhat i wsp., 1991].

Lipidy A produkowane przez ryzobia ze względu na strukturę oraz skład dzielone są na trzy odrębne grupy. Pierwsza grupa reprezentowana przez biowary *R. leguminosarum* i *R. etli* charakteryzuje się nieufosforylowanym szkieletem cukrowym zbudowanym z reszt kwasu 2-aminoglukonowego (GlcAN), glukozaminy (GlcN) i reszty kwasu galakturonowego (GalA). Do glukozaminy oraz kwasu 2-aminoglukonowego przyłączone są estrowo reszty kwasu 3-hydroksytetradekanowy lub 3-hydroksypentadekanowego (**Ryc. 7**). Amidowo związane są natomiast kwasy 3-OH-14:0, 3-OH-16:0 i 3-OH-18:0.

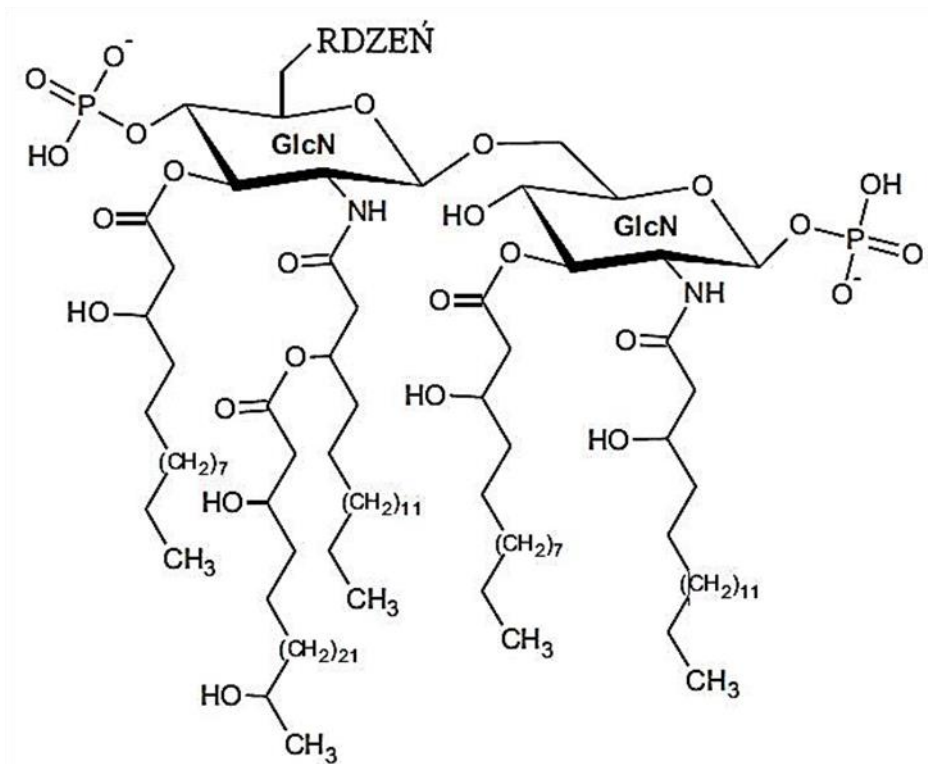


Ryc. 7. Struktura lipidu A *R. etli* CE3 [Na podstawie Serrato, 2014].

Kwas 27-hydroksyoktakozanowy jest przyłączony poprzez kwas 3-hydroksymirystynowy do glukozaminy. Do niego poprzez wolną grupę hydroksylową może być z kolei podstawiony kwas 3-hydroksymaśłowy [Carlson i wsp., 1999, Price i wsp., 1995].

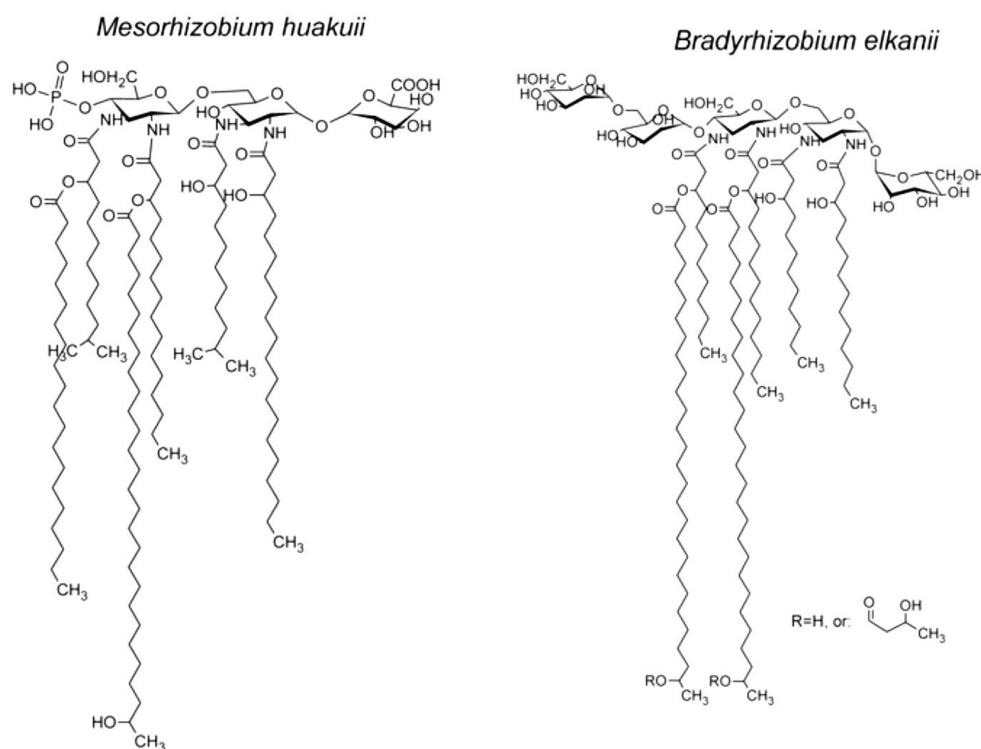
Drugi rodzaj lipidu A występuje u *Sinorhizobium* i strukturalnie jest najbardziej zbliżony do lipidów enterobakteryjnych (**Ryc. 8**). Szkielet tego lipidu A zbudowany jest z ufosforylowanego dwucukru β -glukozaminylo-(1,6)- α -glukozaminy. Jest on podstawiony 3-hydroksykwasami (3-OH-14:0, 3-OH-15:0,

3-OH-16:0 i 3-OH-18:0), długołańcuchowymi hydroksykwasami oraz nasyconymi i nienasyconymi kwasami polarnymi [Urbanik-Sypniewska i wsp., 1989, Carlson i wsp., 1992a].



Ryc. 8. Struktura lipidu A *Sinorhizobium meliloti* [Na podstawie Serrato, 2014].

Trzeci typ lipidu A charakteryzuje się szkieletem cukrowym zbudowanym z 2,3-diamino-2,3-dideoksyglukozy (DAG). Tego typu struktury występują u bakterii należących do rodzaju *Mesorhizobium* (*M. loti*, *M. huakuii*) i *Bradyrhizobium* (*B. diazoefficiens*, *B. elkanii* i *B. sp. (Lupinus)*). W lipidzie A *Mesorhizobium loti* szkielet 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozowy może być częściowo ufosforylowany. Reszta fosforanowa przyłączona jest do nieredukującej reszty DAG w pozycji 4' [Carrion i wsp., 1990, Russa i wsp., 1995a]. U *Mesorhizobium huakuii* dwucukier podstawiony jest kwasem galaktouronowym [Choma i Sowiński 2004]. Natomiast w lipidzie A *B. elkanii* do disacharydu przyłączona jest dodatkowo mannoza [Carlson i wsp., 1999] (**Ryc. 9**).



Ryc. 9. Struktura lipidu A *Mesorhizobium huakuii* [Choma i Sowiński, 2004] i *Bradyrhizobium elkanii* [Komaniecka i wsp., 2010].

U większości lipidów zawierających w komponencie cukrowej DAG występuje duża różnorodność podstawników acylowych. U *Mesorhizobium* zidentyfikowano 3-hydroksykasy zawierające łańcuchy zbudowane z 12-22 atomów węgla. Długołańcuchowy ω -1 hydroksykwasy może być przyłączony estrowo do terminalnej reszty DAG poprzez kwas 3-OH-20:0. W preparatach obecny jest również kwas 27-oksokozanowy [Russa i wsp., 1995a, Choma i wsp., 2000].

Struktura lipidu A bakterii należących do rodzajów *Brucella* i *Ochrobactrum* jest bardzo zbliżona do trzeciego rodzaju lipidów występujących u ryzobiów. Szkielet lipidu zbudowany jest z dwóch cząsteczek 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukozy (**Tabela 3**). Wśród podstawników acylowych występują 3-hydroksykasy zawierające od 12-18 atomów węgla. Obecne są również przyłączone estrowo długołańcuchowe kwasy takie jak 28:0(27-OH), 28:0(27-keto), 30:0(29-OH) czy też 30:0(29-keto) oraz nasycone i nienasycone kwasy (16:0, 18:0, 19:0, 12:1, 18:1) występujące w różnych proporcjach. Szkielet jest fosforylowany jedną bądź dwoma resztami fosforanowymi [Velasco i wsp., 2000].

Tabela 3. Składniki lipidu A w różnych szczepach bakteryjnych

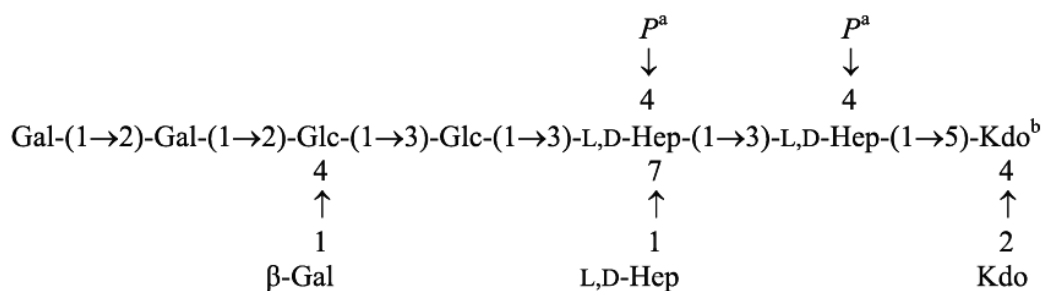
ORGANIZM	SZKIELET CUKROWY	PODSTAWNIKI DISACHARYDU	GŁÓWNE RESZTY ACYLOWE	LITERATURA
<i>Bradyrhizobium elkani</i>	DAG-DAG	Man	3OH-12:0, 3OH-14:0, 27OH-28:0, 14:0, 16:0, 18:0	Carlson i wsp., 1999 Choma i Komaniecka, 2001
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	DAG-DAG	Reszty fosforanowe	3OH-12:0, 3OH-14:0, 27OH-28:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1	Mayer i wsp., 1984, Carrion i wsp., 1990
<i>Bradyrhizobium</i> sp. (<i>Lupinus</i>)	DAG-DAG/ DAG-GlcN	Reszty fosforanowe	3OH-12:0, 3OH-14:0, 27OH-28:0, 14:0, 16:0, 16:1, 18:1	Mayer i wsp., 1984, Bhat i wsp., 1991,
<i>Mesorhizobium loti</i>	DAG-DAG/ DAG-GlcN	Reszta fosforanowa	3OH-12:0, 3OH-13:0, 3OH-20:0, 27OH-28:0, 27- keto-28:0, 12:0, 16:0, 17:0, 20:0, 22:1	Carlson i wsp., 1999, Choma 1999, Russa i wsp., 1995
<i>Mezorhizobium huakuii</i>	DAG	GalA, reszta fosforanowa	3OH-13:0, 3OH-20:0, 3OH-23-1, 3OH-22:0, 27OH- 28:0, 27-keto-28:0, 16:0, 18:0, 20:0, 22:1, 22:0	Choma, 1999, Choma i wsp., 2000b, Choma i Sowiński, 2004
<i>Rhizobium etli</i> CE3	GlcN-GlcNA	GalA	3OH-14:0, 27OH-28:0, 3OH-15:0, 3OH-16:0, 3OH-18:0	Bhat i wsp., 1994
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	GlcN-GlcNA	GalA	3OH-14:0, 27OH-28:0, 3OH-15:0, 3OH-16:0, 3OH-18:0	Carlson i wsp., 1999, Bhat i wsp., 1994
<i>S. fredii</i>	GlcN-GlcN	Reszty fosforanowe	3OH-14:0, 3OH-16:0 3OH-18:0 27OH-28:0, 3OH- 18:0, 18:1	Bhat i wsp., 1991
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	GlcN-GlcN	Reszty fosforanowe	3OH-14:0, 3OH-15:0, 3OH-16:0, 3OH-18:0, 3OH- 18:1, 27OH-28:0, 16:0, 18:0, 18:1	Urbanik- Sypniewska i wsp., 1989
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	DAG-DAG	Reszty fosforanowe	3OH-14:0, 3OH-16:0, 27OH-28:0, 19:0	Velasco i wsp., 1998
<i>Ochrobactrum intermedium</i>	DAG-DAG	Reszty fosforanowe	3OH-14:0, 3OH-16:0, 3OH-18:0, 27OH-28:0, 18:0, 18:1	Velasco i wsp., 2000
<i>Brucella abortus</i>	DAG-DAG	Reszty fosforanowe	16:0, 19:0, 3OH-14:0, 3OH-16:0, 27OH-28:0, 27- keto-28:0	Qureshi i wsp., 1994

I.3.1.2 Region rdzeniowy

Rdzeń oligosacharydowy (*core*) jest fragmentem łączącym lipid A z łańcuchem O-swoistym. Fragment ten cechuje się dużo większą zmiennością w porównaniu do konserwatywnego lipidu A obejmującą nawet zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe. Niemniej jednak w jego strukturze można wyróżnić stałe elementy. We wszystkich dotychczas przebadanych rdzeniach obecny jest kwas 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowy (Kdo). Ponadto w rdzeniu możemy zazwyczaj wyróżnić dwie części. Pierwsza to część wewnętrzna proksymalna do lipidu A, określana również, jako *inner core* jest przyłączona ketozydowo do disacharydu lipidu A. Druga część rdzenia to tzw. region zewnętrzny (ang. *outer core*) zlokalizowany od strony łańcucha O-swoistego, charakteryzujący się większą zmiennością strukturalną. Większość badań strukturalnych dotyczących budowy rdzenia wykonywana jest przy wykorzystaniu mutantów pozbawionych łańcuchów O-swoistych. Chemiczna analiza tego oligosacharydu jest jednak dość utrudniona ze względu na występujące w nim podatne na obróbkę chemiczną reszty Kdo [Molinaro i wsp., 2009].

W regionie zewnętrznym identyfikowane są heksozy tj. np. glukoza, galaktoza, glukozamina czy też galaktozamina. Z tego też względu jest on często określany, jako region heksozowy. Natomiast rdzeń wewnętrzny zawiera reszty Kdo oraz heptopiranozy i nazywany jest regionem heptozowym.

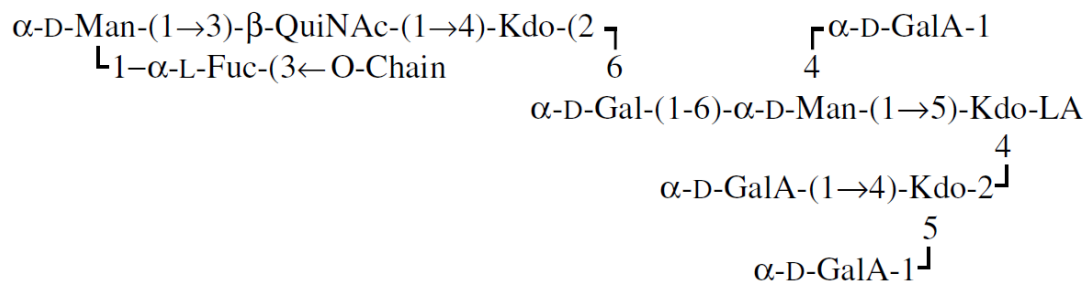
Wśród *Enterobacteriaceae* wyróżniono dwa typy rdzenia oligosacharydowego. Pierwszy z nich określany jest, jako typ *Salmonella* ze względu na organizm, u którego po raz pierwszy został on zbadany. Charakteryzuje się występowaniem struktury o składzie: L- α -D-Hep-(1 $\rightarrow$ 7)-L- α -D-Hep-(1 $\rightarrow$ 3)-L- α -D-Hep-(1 $\rightarrow$ 5)-Kdo podstawionej resztami fosforanowymi (**Ryc. 10**). Drugi rodzaj rdzenia jest określany jako odmienny od typu *Salmonella* w którym heptozy nie są zazwyczaj podstawione resztami fosforanowymi [Holst, 2011].



Ryc. 10. Struktura regionu rdzeniowego *Escherichia coli* R4 [Müller-Loennies i wsp., 2002].
a) - produkt uzyskany po O-deacylacji, dalsze podstawniki nie są znane b) - reszta KDO łącząca rdzeń z lipidem A.

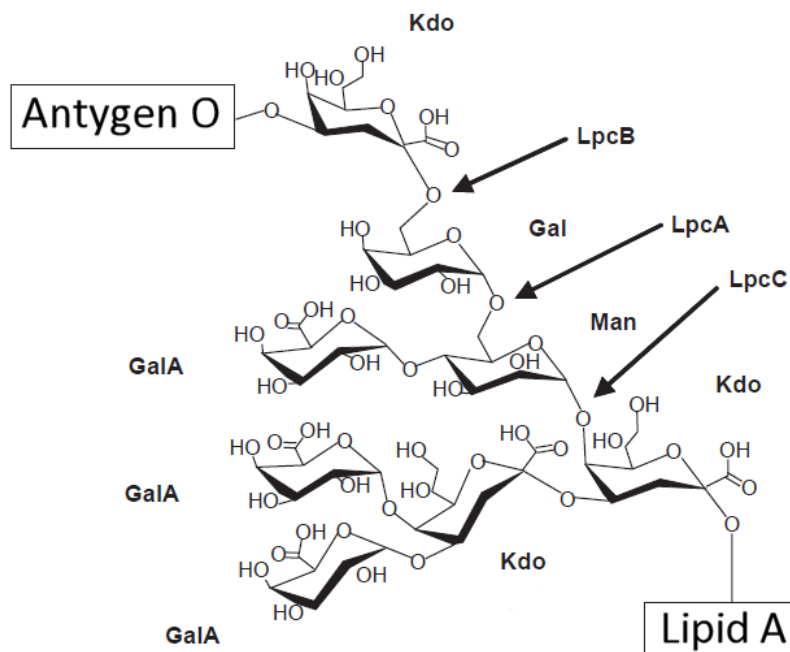
Pomiędzy rdzeniem oligosacharydowym bakterii jelitowych, a rdzeniem występującym u *Rhizobiales* występuje szereg różnic strukturalnych. W ryzobiowych oligosacharydach nie występuje region heptozowy, reszty fosforanowe, a trzecia dystalna cząsteczka Kdo jest zlokalizowana w znacznej odległości od dwu pozostałych.

Struktura regionu rdzeniowego *R. etli* CE3 tworzona jest przez heptamer zbudowany z galaktozy, mannozy, trzech cząsteczek kwasu galakturonowego i dwóch cząsteczek kwasu 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowego (Kdo). W trakcie łagodnej kwaśnej hydrolizy heptamer ulega degradacji na dwa oligosacharydy. Pierwszy z nich to tetrasacharyd $\alpha\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{6)-}[\alpha\text{-D-GalA-(1}\rightarrow\text{4)]-}\alpha\text{-D-Man-(1}\rightarrow\text{5)-Kdo}$. Drugi natomiast tworzony jest przez trisacharyd zbudowany z dwóch cząsteczek GalA i reszty Kdo (**Ryc. 11**). Zewnętrzny fragment oligosacharydu tworzony jest przez tetrasacharyd w skład, którego wchodzi mannoza, fukoza, *N*-acetylochinoxamina i dystalna reszta Kdo łącząca obie części rdzenia [Forsberg i Carlson, 1998].



Ryc. 11. Struktura regionu rdzeniowego *R. etli* CE3 [Castro i wsp., 2008].

U *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* struktura rdzenia jest bardzo zbliżona do opisanej u *R. etli*. Brak jest jednak w wewnętrznej części rdzenia fragmentu tetrasacharydowego (**Ryc. 12**). Wyjątkowe jest to, że wszystkie preparaty łańcuchów O-swoistych uzyskanych z *R. leguminosarum* w wyniku łagodnej kwaśnej hydrolizy zakończone są od strony redukującej cząsteczką Kdo. Jest to kolejna cecha odróżniająca je od antygenów O uzyskiwanych z preparatów enterobakterii [Cedergren i wsp., 1996, Carlson, 1984, Carlson i wsp., 1987a].



Ryc. 12. Struktura regionu rdzeniowego *R. leguminosarum* [na podstawie Ormeño-Orrillo, 2005].

U *Bradyrhizobium japonicum* rdzeń tworzony jest przez pentamer, z którego w trakcie łagodnej kwaśnej hydrolizy uwalniane są dwa fragmenty. Pierwszy to 4-O-Me- α -D-Man-(1 $\rightarrow$ 5)-Kdo, drugi natomiast to α -Man-(1 $\rightarrow$ 4)- α -Glc-(1 $\rightarrow$ 4)-Kdo [Carlson R i Krishnaiah B., 1992].

Również w przypadku *Sinorhizobium fredii* rdzeń jest zbudowany z pentameru, w którego skład wchodzi Kdo, glukoza, galaktoza, kwas galakturonowy oraz kwas glukuronowy. Zbliżoną strukturę zidentyfikowano także u *S. meliloti* i *Sinorhizobium* sp. NGR234 z tą różnicą, że w rdzeniu *S. meliloti* występuje dodatkowo bardzo rzadki wśród bakterii kwas 3-deoksy-2-heptulozarowy (DHA) [Reuhs i wsp., 1994, Russa i wsp., 1992, 1996]. Dotychczas nie określono wszystkich typów wiązań łączących cukry w rdzeniu. Poszczególne składniki rdzenia występujące u *Sinorhizobium* zebrane zostały w **tabeli 4**.

Tabela 4. Składniki cukrowe regionu rdzeniowego u różnych szczepów *Sinorhizobium*.

Szczep	Glc	Gal	Kdo	DHA	Man	GlcA	GalA	Literatura
<i>S. meliloti</i> 102F51	+	+	+	+	-	+	+	Russa i wsp., 1996
<i>S. meliloti</i> 1021	+	+	+	+	+	+	+	Reuhs i wsp., 1998, Campbell i wsp., 2003
<i>S. fredii</i> USDA205	+	+	+	-	+	+	+	Reuhs i wsp., 1998
<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR234	+	+	+	-	+	+	+	Reuhs i wsp., 1998

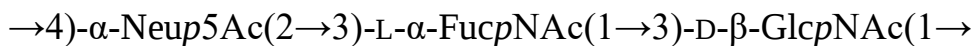
I.3.1.3 Łańcuchy O-swoiste

O-swoisty łańcuch cukrowy (ang. *O-chain*) jest najbardziej zewnętrzną częścią lipopolisacharydu, charakteryzującą się największą zmiennością. Ze względu na unikatową i charakterystyczną dla danej bakterii czy szczepu strukturę jest on wykorzystywany w serologii, jako antygen powierzchniowy bakterii Gram-ujemnych. W łańcuchach O-swoistych dotychczas przebadanych bakterii wykryto obecność aż 40 różnych cukrów w tym cukrów obojętnych oraz aminocukrów a także deoksyheksoz i dideoksyheksoz. Najczęściej spotykanymi cukrami obojętnymi są glukoza, mannoza, glukozamina, galaktozamina, wśród 6-deoksyheksoz ramnoza, fukoza i 6-deoksyaltroza. [Katzenellenbogen i wsp., 1988, 1995, 2001, Jann i wsp., 1978, Kocharova i wsp., 2004].

Łańcuchy cukrowe są zbudowane najczęściej z powtarzających się podjednostek zawierających 2-8 takich samych bądź różnych monosacharydów. Dodatkowo łańcuch może być podstawiony związkami niecukrowymi takimi jak np. aminokwasy, fosforany, glicerol, kwas pirogronowy czy kwas sialowy [Knirel i wsp., 2009].

Najlepiej przebadanymi łańcuchami są O-specyficzne polisacharydy pałeczek należących do rodzaju *Salmonella*. Wśród dotychczas poznanych serotypów wyodrębniono aż 100 różnych antygenów O. Duża różnorodność cukrów obecnych w łańcuchu O-swoistym może determinować jego charakter, jako obojętny, kwaśny bądź zasadowy. W przypadku wszystkich zbadanych szczepów z rodzaju *Salmonella* łańcuchy O-swoiste mają charakter obojętny.

Przykładowo powtarzająca się podjednostka łańcucha O-swoistego *Salmonella enterica* serovar Toucra O48 to trisacharyd zbudowany z kwasu *N*-acetylneuraminowego, *N*-acetylofukozaminy i *N*-acetyloglukozaminy [Gamian i wsp., 2000]. Struktura podjednostki przedstawiona została na **rycinie 13**.



Ryc. 13. Struktura powtarzalnej podjednostki polisacharydu O-swoistego *Salmonella enterica* serovar Toucra O48 [Wg. Gamian i wsp., 2000].

Analiza łańcuchów O-swoistych bakterii należących do *Rhizobiales* również wykazała występowanie bardzo dużego zróżnicowania struktur. Heterogenność łańcuchów określana najczęściej przy pomocy elektroforezy w żelu poliakrylamidowym jest dość znaczna nawet u poszczególnych szczepów bakterii. Na elektroforegramie widoczny jest charakterystyczny rozkład prążków w postaci drabinki. Jest on wynikiem obecności silnie zróżnicowanych frakcji lipopolisacharydowych zawierających łańcuchy cukrowe o zmiennej ilości powtarzających się podjednostek cukrowych.

Jednym z lepiej poznanych antygenów jest polisacharyd *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Powtarzająca się pięciocukrowa podjednostka zbudowana jest z *N*-acetyloglukozaminy, trzech reszt ramnozy i *N*-acetylomannozaminy [Wang i Hollingsworth, 1994].

Dobrze poznana została również struktura łańcucha O-swoistego *Rhizobium etli* CE3. Wyróżnia się ona dość nietypową strukturą powtarzającej się podjednostki. Jest ona zbudowana z trisacharydu zawierającego kwas glukuronowy, fukozę i 3-O-Me-6-deoksytałozę, do którego na końcu nieredukującym przyłączona jest tzw. sekwencja czapeczkująca. W skład jej wchodzi kwas glukuronowy i 2,3,4-tri-O-Me-fukoza [Forsberg i Carlson, 1998, Forsberg i wsp., 2000]. Przykładowe struktury powtarzających się podjednostek polisacharydu O-swoistego innych bakterii zebrane zostały w **tabeli 5**.

Stosunkowo często w łańcuchu O-swoistym bakterii symbiotycznych pojawiają się dwa cukry – fukoza (Fuc) i 6-deoksytałoza (6dTal). Oba obecne są w łańcuchu *R. etli* CE3 i *R. tropici* CIAT899 [Forsberg i wsp., 2000, Gil-Serrano i wsp., 1995]. Sama 6-deoksytałoza występuje u *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 24 [Russa i wsp., 1996b], *Mesorhizobium huakuii* IFO 15243^T [Choma i wsp., 2000]

i *M. loti* NZP2213 [Russa i wsp., 1995b]. Cukry te występują stosunkowo rzadko u innych bakterii, dlatego też uważane są za charakterystyczny składnik polisacharydu O-swoistego ryzobiów [Castro i wsp., 2008].

Badania strukturalne polisacharydu O-swoistego nie zostały przeprowadzone w przypadku przedstawicieli *Ochrobactrum*. Poznana została natomiast struktura *Brucella melitensis* 16M, którego powtarzająca podjednostka to pentasacharyd [Kubler-Kielb i Vinogradov, 2013].

Tabela 5. Struktury powtarzających się podjednostek polisacharydu O-swoistego wybranych bakterii.

ORGANIZM	STRUKTURA	LITERATURA
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i> 4S	3)- α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 2 $\uparrow$ α -D-ManNAc-1	Wang i Hollingsworth 1994
<i>R. etli</i> CE3	4)- β -D-6OMeGlcA-(1 $\rightarrow$ 4)- α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 3 $\uparrow$ α -3OMe6dTal-1	Forsberg i wsp., 2000
<i>R. tropici</i> CIAT899	4)- β -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-2OAc6dTal-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$	Gil-Serrano i wsp., 1995
<i>R. loti</i> NZP2213	3)- α -L-2OAc6dTal-(1 $\rightarrow$	Russa i wsp., 1995b
<i>R. leguminarum</i> bv. <i>viciae</i> 128C53	3)- α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-Fuc-(1 $\rightarrow$ 2 $\uparrow$ α -D-Man-1	Kannenberga i wsp. 1998
<i>Mesorhizobium huakuii</i> IFO15243T	2)- α -L-Rha-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-6dTal-(1 $\rightarrow$ 3)- α -L-6dTal-($\rightarrow$	Choma i wsp., 2000
<i>Brucella melitensis</i> 16 M	[-2- α -D-Rha4NFO-2- α -D-Rha4NFO-3- α -D-Rha4NFO-2- α -D-Rha4NFO-2- α -D-Rha4NFO-]	Kubler-Kielb i Vinogradov, 2013
<i>A. tumefaciens</i> F/1	3)- α -L-Ram-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-GlcNAc-(1 $\rightarrow$	De Castro i wsp., 2004

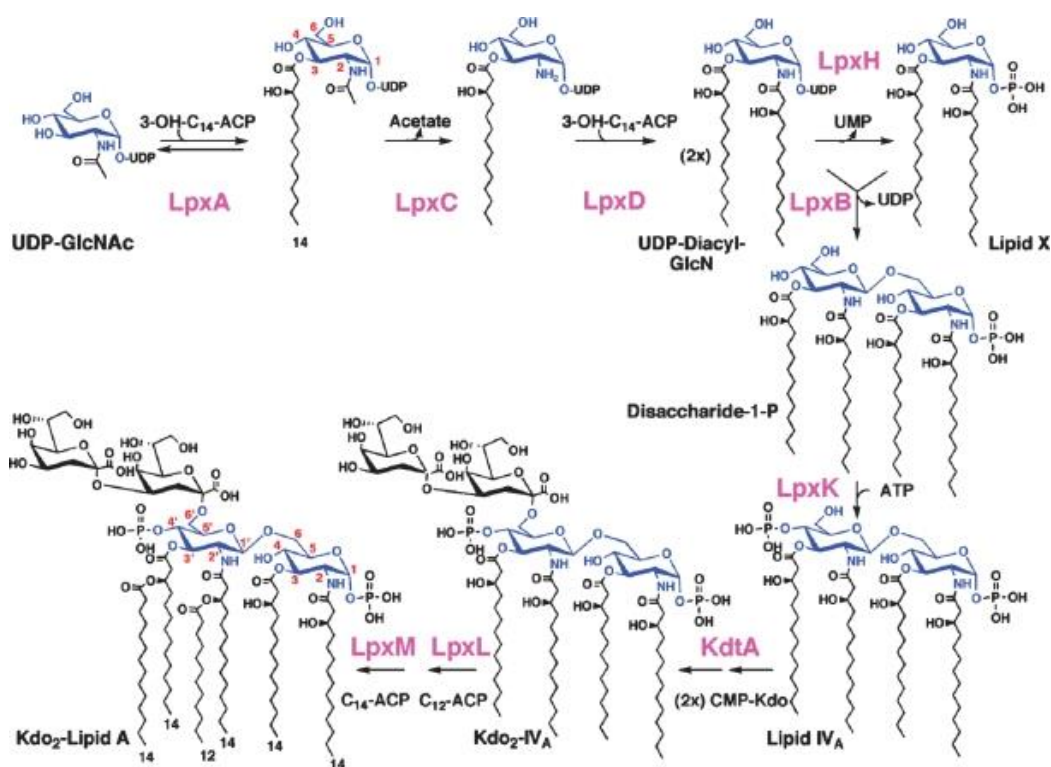
I.3.1.4 Biosynteza lipopolisacharydu

Biosynteza lipopolisacharydu to proces złożony, wieloetapowy i nie do końca przebadany. Większość badań nad poszczególnymi etapami biosyntezy opiera się na wykorzystaniu mutantów bakteryjnych. Przebiega on w dwóch niezależnych etapach, w których syntetyzowane są lipid A i cukry rdzenia oligosacharydowego oraz polisacharyd O-swoisty.

I.3.1.4.1 Biosynteza lipidu A u ryzobiów

Proces syntezy lipidu A został dość dobrze opisany u *Escherichia coli* i często jest określany mianem szlaku Raetz'a [Raetz i wsp., 2009]. Przebiega w 9 etapach, wśród których pierwsza część ma miejsce w cytoplazmie i jest katalizowana kolejno przez enzymy: LpxA, LpxC, LpxD, LpxH i LpxB. Druga część szlaku związana jest z wewnętrzną powierzchnią błony cytoplazmatycznej – i przebiega przy udziale czterech enzymów: LpxK, KdtA, LpxL i LpxM (**Ryc. 14**).

Pierwsza reakcja to acylacja UDP-GlcNAc przez acylotransferazę (LpxA) [Anderson i wsp., 1985, 1993]. Reakcja ta może zachodzić w obu kierunkach. Powstała cząsteczka UDP-3-O-(acyl)-GlcNAc jest przekształcana przez N-deacylazę (LpxC) w UDP-3-acyloglukozaminę [Sorensen i wsp., 1996, Whittington i wsp., 2003]. Kolejna reakcja katalizowana przez N-acylotransferazę glukozaminy (LpxD) to przyłączenie do UDP-3-acylo-GlcN kwasu 3-hydroksymirystynowego [Kelly i wsp., 1993]. Z powstałej cząsteczki UDP-2,3-diacyloglukozaminy pirofosfataza (LpxH) usuwa UMP. W ten sposób powstaje lipid X (2,3-diacyloglukozamino-1-fosforan) [Bulawa i Raetz, 1984, Ray i wsp., 1984]. Następnym etapem jest kondensacja lipidu X z UDP-2,3-diacyloglukozaminą katalizowana przez syntazę disacharydową lipidu A (LpxB). Utworzone zostaje wiązanie $\beta(1\rightarrow6)$ glikozydowe. Dołączenie reszty fosforanowej w pozycji C-4' zachodzi przy udziale kinazy (LpxK) [Ray i Raetz, 1987]. W ten sposób powstaje cząsteczka lipidu IV_A. Do powstałego lipidu IV_A przyłączane są cząsteczki Kdo, których prekursorem jest rybulozo-5-fosforan [Volk, 1960]. W dalszych etapach dodawane są kolejno łańcuchy drugorzędowych kwasów tłuszczowych przy udziale ACP-zależnych acylotransferaz (LpxL, LpxM) [Clementz i wsp., 1996].



Ryc. 14. Szlak biosyntezy lipidu A u *E. coli* [Raetz i wsp., 2009].

Biosynteza lipidu A u *Rhizobiaceae* przebiega tak samo do momentu wytworzenia prekursora KDO₂-lipid IV_A. Dalsze etapy szlaku syntezy przebiegają już odmiennie.

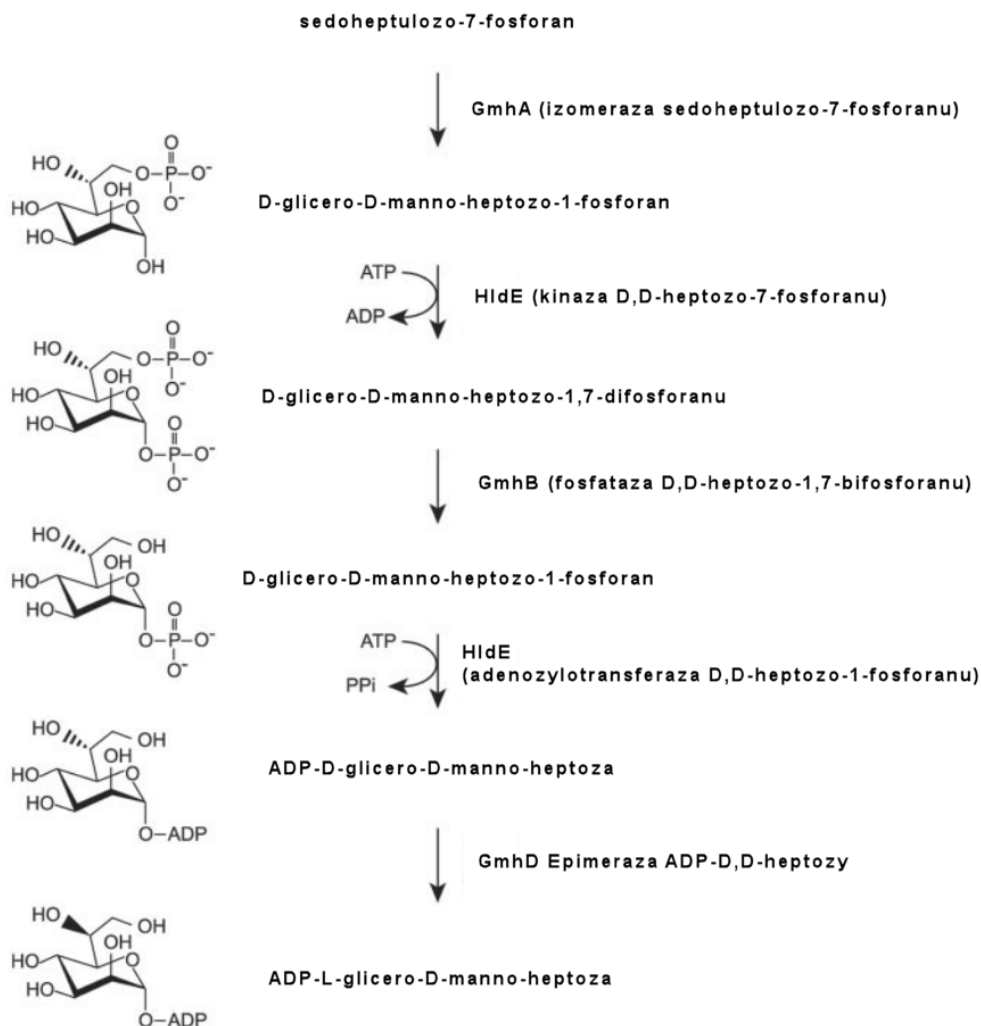
W powstaniu lipidu bezfosforanowego uczestniczą dwa enzymy: 1-fosfataza - produkt genu *lpxE* i 4'-fosfataza-produkt genu *lpxF*. Dodatkowo 1-fosfataza dzięki aktywności fosfotransferazy przenosi resztę fosforanową na fosfatydyloinozytol. Enzymy te nie zostały znalezione u *E. coli*. W przyłączaniu kwasów długołańcuchowych udział bierze specyficzny enzym LpxXL. W proces zaangażowane jest także białko - przenośnik reszt acylowych AcpXL. Następny etap katalizowany przez białka RgtA, RgtB i RgtD polega na przyłączeniu reszt kwasu galakturonowego do regionu Kdo. Kolejne etapy przebiegają już w błonie zewnętrznej. LpxQ – oksydaza glukozaminy utlenia proksymalną resztę glukozaminy do 2-aminoglukonianu [Raetz i wsp., 2007].

I.3.1.4.2 Biosynteza części rdzeniowej

Biosynteza części rdzeniowej tak samo jak lipidu A ma miejsce w cytoplazmie i na wewnętrznej części błony cytoplazmatycznej. Ze względu na zróżnicowanie struktur rdzenia w tym podział na część proksymalną i dystalną do lipidu A proces ten jest bardziej skomplikowany. Trudności w badaniu poszczególnych etapów syntezy rdzenia cukrowego związane są z brakiem możliwości uzyskania mutantów pozbawionych tego oligocukru. Te z kolei są pochodną funkcji biologicznej, jaką pełni LPS w życiu bakterii.

Zakłada się, że za skoordynowaną i wydajaną syntezę oligosacharydu rdzeniowego odpowiada związany z błoną kompleks glikozylotransferaz. Jest on zlokalizowany na wewnętrznej powierzchni błony i zawiera akceptory oraz nukleotydowe donory cukrów. Region chromosomowy *waa* (dawniej *rfa*) zawiera główne operony zaangażowane w biosyntezę rdzenia. U *E. coli* i *Salmonella* locus *wwa* składa się z trzech operonów. Każdy operon jest definiowany przez pierwszy gen zlokalizowany w tej jednostce transkrypcyjnej. Geny te to kolejno *gmhD*, *waaQ*, i *waaA*. Geny *gmhD-waaFC* uczestniczą w biosyntezie i przenoszeniu heptozy. Transkrypcja operonu *gmhD* u *E. coli* K-12 jest regulowana przez promotor szoku cieplnego. Operon *waaQ* zawiera geny niezbędne do biosyntezy i modyfikacji rdzenia zewnętrznego [Raetz i Whitfield, 2002].

Akceptorem, do którego przyłączane są składniki oligocukru rdzeniowego jest kompleks lipid A-Kdo. W przypadku bakterii jelitowych proces można podzielić na dwa główne etapy. Pierwszy z nich obejmuje reakcje przyłączania reszt heptozowych. Rozpoczyna się on od izomeryzacji sedoheptulozo-7-fosforanu do D-glicero-D-mannoheptozo-1-fosforanu przez enzym izomerazę (GmhA) [Brooke i Valvano, 1996]. Otrzymany związek przekształcany jest przez fosfokinazę (HldE /RfaE) do D-glicero-D-mannoheptozo-1,7-difosforanu (**Ryc. 15**). Usunięcie grupy fosforanowej zachodzi przy udziale fosfatazy (GmhB) w wyniku, czego powstaje D-glicero-D-mannoheptozo-1-fosforan. Powstały produkt jest przekształcany do ADP-D-glicero-D-manno-heptozy przez adenozylotransferazę (HldE). Ta z kolei jest przekształcana w ADP-L-glicero-D-mannoheptozę przy udziale epimerazy (GmhD/RfaD) [Kneidinger i wsp, 2002].

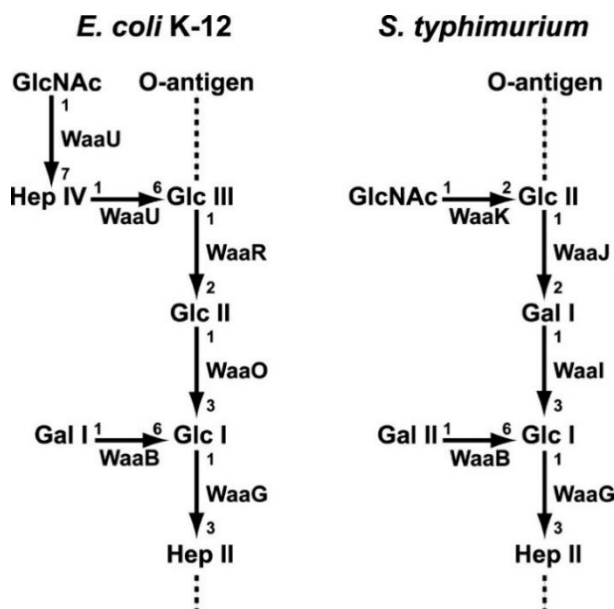


Ryc. 15. Szlak biosyntezy ADP-L-glicero-D-manno-heptozy u *E. coli* [Na podstawie: Raetz i Whitfield, 2002].

Modyfikacja wewnętrznej części rdzenia u *E. coli* i *Salmonella* wymaga udziału trzech enzymów:

- WaaP - kinazy LPS,
- WaaY – enzymu odpowiadającego za drugą fosforylację,
- WaaQ – transferazy dodającej boczną resztę heptozową.

Ponieważ modyfikacje następują w ścisłej kolejności największą aktywność wykazuje enzym WaaP. Zapoczątkowuje cały proces i umożliwia dalsze działanie kolejno WaaQ i WaaY. W przypadku braku enzymu WaaP mamy do czynienia z zahamowaniem całego dalszego szlaku. Takie mutanty są głęboko szorstkie i niewirulentne.



Ryc. 16. Enzymy uczestniczące w biosyntezie zewnętrznej części rdzenia lipopolisacharydu *E. coli* i *S. typhimurium* [Qian i wsp., 2014].

Pierwszym cukrem przyłączanym do części dystalnej (heksozowej) rdzenia u *E. coli* i *Salmonella* jest reszta glukozy. Enzymem katalizującym tą reakcję jest glukozylotransferaza WaaG.

U *E. coli* drugą i trzecią przyłączaną heksozą również jest glukoza. Reakcje te przeprowadzane są kolejno przez enzym WaaO oraz WaaR. Boczne podstawniki cukrowe dołączane są przy udziale glukozylotransferaz WaaB i WaaU. Galaktoza przyłączana jest przez WaaB do pierwszej heksozy za pomocą wiązania α -(1-6). Kolejnym etapem jest przyłączenie heptozy do trzeciej heksozy za pomocą wiązania α -(1-6). Do niej zostaje następnie przyłączona wiązaniem α -(1-7) *N*-acetyloglukozamina. Enzymem katalizującym obie reakcje jest WaaU (**Ryc. 16**).

W przypadku *S. typhimurium* drugą przyłączaną heksozą jest galaktoza. Reakcja ta zachodzi przy udziale glukozylotransferazy WaaI. Trzecią heksozą jest glukoza. Za utworzenie wiązania α -(1-2) odpowiada enzym WaaJ. Do niej przy udziale WaaK przyłączana jest poprzez wiązanie α -(1-2)-glikozydowe *N*-acetyloglukozamina [Qian i wsp., 2014].

U ryzobiów przebieg biosyntezy rdzenia ma odmienny charakter. Zarówno w przypadku *Rhizobium etli* oraz *Rhizobium leguminosarum* do fragmentu Kdo₂-lipid A przyłączana jest bezpośrednio reszta mannozy. Proces ten jest przeprowadzany przy udziale białka LpcC (mannozylotransferaza) [Carlson i wsp., 1995, Kanipes i wsp., 2003]. Do reszty mannozy przyłączona zostaje kolejno galaktoza. Etap ten

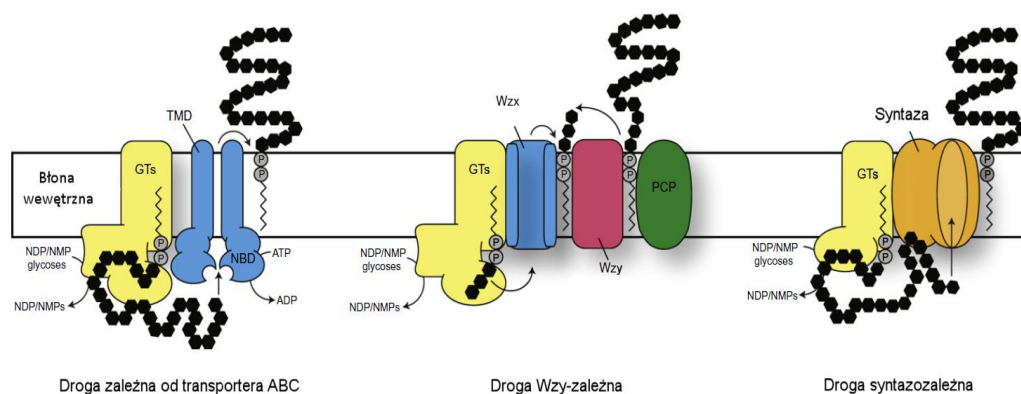
katalizowany jest przy pomocy α -(1-6)-galaktozylotransferazy będącej produktem genu *lpcA*. Do dwucukru przyłączana jest dystalna reszta Kdo przy udziale transferazy α -(2-6)-Kdo. Enzym ten jest produktem genu *lpcB* [Kadrmas i wsp., 1998].

I.3.1.4.3 Biosynteza łańcucha O-swistego

Przebieg biosyntezy łańcucha O-swistego został najdokładniej zbadany u *Salmonella enterica* i *Salmonella typhimurium*. Znaczna część enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę tej części LPS jest kodowana przez geny znane jako *rfb*. Produkty tych genów odpowiadają za syntezę cukrowych prekursorów antygeny O, ich polimeryzację i transport do miejsca ligacji. Powtarzające się podjednostki polisacharydu O-swoistego są syntetyzowane w odrębny polimer. Zostaje on przyłączony do glikolipidu [Trent i wsp., 2006].

Synteza powtarzającej się podjednostki rozpoczyna się na wewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej od przeniesienia reszty cukrowej z prekursora UDP-Gal na lipidowy nośnik – fosforan undekaprenyłu (UndP) w przypadku *S. enterica* [Keenleyside i Whitfield, 1996]. Z kolei u *S. typhimurium* lipidowym przenośnikiem jest alkohol poli-izoprenolowy C₅₅ (baktoprenol). Dotychczas poznane zostały trzy możliwe mechanizmy syntezy i eksportu OPS (**Ryc. 17**). Szlaki te to:

- Droga Wzy-zależna (*Wzy-dependent pathway*)
- Droga zależna od transportera ABC (*ABC transporter-dependent pathway*)
- Droga syntazozależna (*synthase-dependent pathway*) [Greenfield i wsp., 2012].



Ryc. 17. Mechanizmy biosyntezy łańcucha O-swistego [Na podstawie: Greenfield i wsp., 2012].

Droga Wzy-zależna dotyczy heteropolisacharydów mających rozgałęzienia i to samo wiązanie pomiędzy kolejnymi przyłączanymi podjednostkami. Występuje np. w syntezie polisacharydu O-swoistego *Salmonella enterica*. Transport przez błonę cytoplazmatyczną odbywa się za pomocą kompleksu czterech peryferyjnie związanych membranowych białek: WbaP (lub WecA), Wzy, Wzx, Wzz. Do WbaP przyłączane są podjednostki cukrowe związane z fosforanem undekaprenyłu. Flipaza Wzx przenosi te cząsteczki przez błonę do przestrzeni peryplazmatycznej. Następnie po zewnętrznej stronie błony cytoplazmatycznej polimeraza antygeny-O (Wzy) kontroluje polimeryzację łańcuchów polisacharydowych przez dodawanie kolejnych podjednostek do redukującego końca powstającego polimeru. Proces ten jest kontrolowany przez białko Wzz, które moduluje długość powstających łańcuchów. Po skończonej polimeryzacji powstały polimer jest przyłączany do kompleksu lipid A-oligocukier rdzenia przez ligazę (WaaL) [Liu i wsp., 1996, Feldman i wsp., 1999].

Droga zależna od transportera ABC dotyczy łańcuchów O-polisacharydowych zbudowanych z nierozgałęzionych homopolimerów. Występuje m.in. w polimannozowych antygenach 09 i 08 *E coli*. Taki proces zaobserwowano również u *Rhizobium etli* CE3. W skład kasety transportera ABC wchodzi białka: WecA, Wzm oraz Wzt. W pierwszym etapie dochodzi do połączenia cukrowej podjednostki z cząsteczką lipidowego nośnika – fosforanu undekaprenyłu (UndP). W kolejnych etapach następuje przyłączenie ściśle określonej liczby podjednostek cukrowych (mannozowych). Białka Wzt (o aktywności ATPazy) oraz Wzm tworzą kanał, przez który odbywa się transport powstałych polimerów do przestrzeni peryplazmatycznej, gdzie białko WaaL doprowadza do ich ligacji z fragmentem lipid A-oligocukier rdzenia [Lerouge i wsp., 2001].

Droga syntazozależna dotyczy np. O-polisacharydu *S. enterica* z serowaru *Borreze*. Antygen O jest zbudowany z GlcNAc, ManNAc oraz reszt poli-*N*-acetylomannozaminowych. Białkami budującymi polimer cukrowy są tutaj swoiste syntazy. Połączenie cząsteczki GlcNAc z fosforanem undekaprenyłu zachodzi przy udziale białka WecA. Przyłączanie reszty *N*-acetylomannozaminy jest katalizowane przez glikozylotransferazę (WbbE). W polimeryzacji łańcucha poli-*N*-Ac-mannozaminowego udział bierze z kolei białko WbbF [Keenleyside i Whitfield, 1995, 1996].

I.3.1.5 Udział lipopolisacharydu w symbiozie

Lipopolisacharyd, jako integralny składnik osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych ma podstawowe znaczenie w procesie symbiozy pomiędzy bakteriami i roślinami motylkowatymi. Pełna struktura LPS zapewnia integralność błony zewnętrznej i stabilizuje jej strukturę, warunkuje jej wzrost, wpływa na skuteczność endocytozy oraz decyduje o właściwej organizacji i dojrzewaniu symbiosomów. Dodatkowo, struktury powierzchniowe zapobiegają powstawaniu reakcji nadwrażliwości u roślinnego gospodarza. Ze względu na istotną rolę, jaką spełnia lipopolisacharyd na różnych etapach symbiozy jego struktura i funkcja są intensywnie badane [Serrato, 2014].

Kompletna struktura LPS zapobiega indukcji reakcji nadwrażliwości ze strony gospodarza roślinnego poprzez maskowanie innych składników błony bakteryjnej. Podczas procesu symbiozy cząsteczki lipopolisacharydu podlegają modyfikacjom. Jest to odpowiedź na zmieniające się warunki środowiska bakterii i jest wynikiem ekspozycji komórek bakteryjnych na roślinne cząsteczki sygnałne oraz spadek stężenia tlenu i zmiany pH. W momencie, gdy komórka bakteryjna staje się endosymbiontem roślinnym jej metabolizm ulega zmianom przystosowawczym [Carlson i wsp., 1992b, Campbel i wsp., 2003]. Modyfikacji ulegają proporcje pomiędzy frakcjami lipopolisacharydu. Zmniejsza się ilość frakcji gładkiej LPS, a wzrasta ilość frakcji szorstkiej. Jest to prawdopodobnie spowodowane tworzeniem się błony prebakteroidalnej. Podczas podziałów i dojrzewania bakteroidów następują zmiany ładunku i charakteru LPS – wzrasta hydrofobowość cząsteczki. Wzrasta stopień metylacji i acetylacji cukrów w łańcuchu O-swoistym, zwiększa się ilość cukrów obojętnych tj. np. mannoza i glukoza. W cząsteczkach lipidu A następuje wzrost ilości kwasów tłuszczowych [Lerouge i Vanderleyden, 2001].

Ważna jest również ogólna ilość lipopolisacharydu produkowanego przez komórki bakteryjne. Mutanty produkujące mniejsze ilości tego składnika błony zewnętrznej poza zmniejszeniem tempa wzrostu charakteryzowały się brakiem zdolności do efektywnego brodawkowania. W przypadku roślin tworzących brodawki niezdeteminowane kompletna struktura LPS wpływa na wnikanie bakterii do komórek gospodarza roślinnego i warunkuje tworzenie symbiosomów [Bhat i Carlson, 1992].

U mutantów *Azorhizobium caulinodans* defektywnych w produkcji LPS i produkujących LPS o zmienionym składzie wykazano zahamowanie procesu

brodawkowania na *Sesbania rostrata*. Świadczy to o tym, że zarówno kompletna struktura jak i specyficzny skład lipopolisacharydu są istotne do zaistnienia oddziaływań symbiotycznych [Mathis i wsp., 2005, Gao i wsp., 2001].

Badania nad mutantami *B. japonicum* R110 wykazały, że tylko niezmieniona kompletna struktura łańcuchów O-swoistych powoduje zahamowanie reakcji obronnych ze strony gospodarza roślinnego - soi [Gharyal i wsp., 1989]. Również badania prowadzone nad mutantami transpozonowymi *R. etli* pozbawionymi części O-swoistej wykazały zaburzenia w procesie brodawkowania. Początkowe etapy infekcji przebiegały prawidłowo jednak powstające brodawki były nieefektywne w wiązaniu azotu [Carlson i wsp., 1987b]. Istotna wydaje się również proporcja pomiędzy frakcjami lipopolisacharydu produkowanego przez ryzobia. Bakterie produkujące znaczne ilości LPS I (typu gładkiego) zawierającego kompletny LPS wykazały znacząco lepsze przystosowanie do wchodzenia w interakcje z roślinami motylkowatymi niż bakterie produkujące głównie LPS II (typu szorstkiego) pozbawiony antygeny O. Wskazuje to na znaczący udział antygeny O w pierwszych etapach kolonizacji brodawek przez bakterie. Duża różnorodność tego fragmentu LPS warunkuje wysoką specyficzność. Ma to bezpośrednie przełożenie na zdolności do zakażenia konkretnego gospodarza roślinnego i pozwala na wzajemne rozpoznawanie się makro i mikrosymbionta [Noel i wsp., 1986].

I.3.2 PERYPLAZMATYCZNE β - GLUKANY

Peryplazmatyczne glukany (PG) to oligomery glukozy będące jednym ze składników przestrzeni peryplazmatycznej. Na ich produkcję wpływają głównie zmiany ciśnienia osmotycznego i dlatego nazywane są także osmoregulowanymi peryplazmatycznymi glukanami (OPG - *Osmoregulated Periplasmic Glucans*). W największych ilościach wykrywane są podczas wzrostu bakterii w warunkach stresu hipoosmotycznego [Miller i wsp., 1988].

Glukany zawierają D-glukozę połączoną wiązaniami typu β -(1,2), β -(1,3), β -(1,6) glikozydowymi. Sporadycznie występują wiązania typu α . Związki te mogą występować w postaci cyklicznej bądź też liniowej. Glukoza może być podstawiana składnikami niecukrowymi takimi jak np. reszty acetylowe, bursztynianowe i inne. Na szkielet cząsteczki glukanu składa się zazwyczaj od 5 do nawet 40 reszt glukozy. Mogą one stanowić od 5% do 20% całkowitej suchej masy komórkowej. Stężenie

glukanów w przestrzeni peryplazmatycznej waha się w zakresie 10-100 mM [Lee i wsp., 2009]. Wśród podstawników wyróżnia się te, które pochodzą z peryplazmatycznych fosfolipidów błonowych są to: reszty fosfoglicerolu, fosfoetanolaminy i fosfocholiny. Reszty kwasu bursztynowego, kwasu octowego i metylomalonianu powstają natomiast z metabolitów pośrednich. W późniejszych fazach wzrostu glukany są wykrywane także w podłożu bakteryjnym. Może to świadczyć o ich uwalnianiu się z komórek pod wpływem niekorzystnych warunków środowiska np. wysokiej temperatury, niskiej osmolarności czy pod wpływem uszkodzeń błon zewnętrznych lub z rozpadu obumarłych komórek [Komaniecka i Choma, 2008].

Pierwszymi zidentyfikowanymi peryplazmatycznymi glukunami były cykliczne β -glukany, odkryte w 1942 roku w pożywce, w której hodowano *Agrobacterium tumefaciens* (obecnie *Rhizobium radiobacter*) [McIntire i wsp., 1942]. Kolejno odkryto obecność glukanów u *E. coli*. Związki te okazały się oligosacharydami zawierającymi od 10 do 12 podjednostek glukozy połączonych ze sobą wiązaniami β -(1,2) i β -(1,6) glikozydowymi [Schneider i wsp., 1979]. Od tego czasu stwierdzono występowanie cyklicznych β -glukanów u wielu innych Gram-ujemnych bakterii w tym u *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* i *Brucella*.

Peryplazmatyczne glukany zaangażowane są w proces infekcji i rozwoju brodawek, mechanizmy osmoprotekcji oraz wirulencji. Wykazano, że mutanty defektywne w produkcji cyklicznych β -(1,2)-glukanów są nieefektywne w procesie zakażenia roślin motylkowatych oraz w tworzeniu u nich brodawek (np. mutanty *S. meliloti*) [Dylan i wsp., 1990].

Peryplazmatyczne glukany zostały podzielone na cztery rodziny na podstawie cech strukturalnych ich łańcuchów głównych. Glukany różnią się między sobą podstawnikami, stopniem polimeryzacji (DP) a przede wszystkim typem wiązań, jakimi są połączone poszczególne monomery glukozy (**Tabela 6**).

Tabela 6. Klasyfikacja peryplazmatycznych glukanów syntetyzowanych przez *Proteobacteria* (na podstawie Lee i wsp., 2009). Skróty: PG- reszty fosfoglicerolu, PEA- reszty fosfoetanoloaminy, Suc – reszty kwasu bursztynowego, Ac- reszty kwasu octowego, MeMal- reszty metylomalonianu.

Rodzina glukanów	Organizm	DP	Wiązania	Podstawniki	Geny zaangażowane w biosyntezę
Liniowe β-(1,2)-glukany	<i>E. coli</i>	5-12	β -(1,2) β -(1,6)	PG, PEA, Suc	<i>opgG, opgH, opgB, opgC, opgD</i>
	<i>P. syringae</i>	6-28	β -(1,2) β -(1,6)	Suc, Ac	<i>opgG, opgH</i>
	<i>P. aeruginosa</i>	6-10	β -(1,2) β -(1,6)	Suc	<i>opgG, opgH</i>
	<i>E. chrysanthemi</i>	5-12	β -(1,2) β -(1,6)	Suc, Ac	<i>opgG, opgH</i>
Cykliczne β-(1,2)-glukany	<i>S. meliloti</i>	17-40	β -(1,2)	PG, Suc, MeMal	<i>ndvB, cgmB</i>
	<i>M. huakuii</i>	17-28	β -(1,2)	Brak	Nieznany
	<i>A. tumefaciens</i>	17-25	β -(1,2)	PG	<i>chvA, chvB</i>
	<i>B. abortus</i>	17-25	β -(1,2)	Suc	<i>cgs, cgm</i>
Cykliczne β-(1,3);(1,6)-glukany	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (<i>B. japonicum</i>)	10-13	β -(1,3) β -(1,6)	PG	<i>ndvB, ndvC</i>
	<i>A. brasilense</i>	12-13	β -(1,3) β -(1,4) β -(1,6) α -(1,3)	Suc	Nieznane
	<i>A. caulinodans</i>	10-13	β -(1,3) β -(1,6)	Brak	Nieznane
Cykliczne β-(1,2)-glukany z jednym wiązaniem typu α-(1,6)	<i>X. campestris</i>	16	β -(1,2) α -(1,6)	PG	<i>opgHXcv, opgB</i>
	<i>R. solanacearum</i>	13	β -(1,2) α -(1,6)	Ac	<i>opgG, opgH</i>
	<i>R. sphaeroides</i>	18	β -(1,2) α -(1,6)	Suc, Ac	<i>opgG, opgI, opgH, opgC</i>

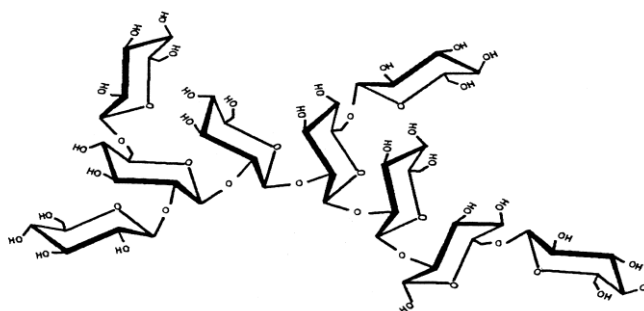
I.3.2.1 Klasy glukanów

I.3.2.1.1 Liniowe β -(1,2)-glukany

Oligocukry należące do tej grupy są niejednorodne pod względem wielkości. Ich stopień polimeryzacji waha się od 5 do 28 reszt glukozyłowych. Oligomer ma strukturę liniową, a cząsteczki glukozy w głównym łańcuchu połączone są wiązaniami typu β -(1,2). Mogą również występować odgałęzienia łańcucha głównego przyłączone wiązaniami typu β -(1,6). Istotną cechą glukanów należących do I rodziny jest to, że mogą posiadać one liczne niecukrowe podstawniki takie jak np. reszty fosfoglicerolu,

reszty fosfoetanolaminy, reszty kwasu bursztynowego oraz kwasu octowego. Glukany tej grupy występują u *Enterobacteriaceae*.

Najbardziej charakterystycznym glukanem reprezentowanym przez tą rodzinę jest PG produkowany przez *E. coli*, którego stopień polimeryzacji wynosi 5-12. (**Ryc. 18**). OPG *E. coli* ma charakter anionowy, co jest spowodowane występowaniem licznych reszt fosfoglicerolu, fosfoetanolaminy [Kennedy, 1996, Van Golde i wsp., 1973, Bontemps-Gallo, 2013].



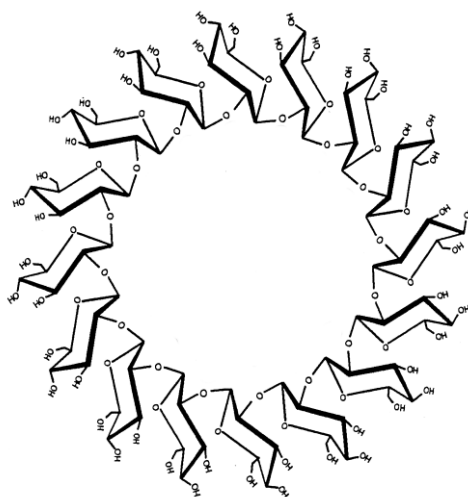
Ryc. 18. Struktura liniowych peryplazmatycznych glukanów *E. coli* [Bohin 2000].

Dobrze poznaną strukturą jest glukan *Erwinia chrysanthemi* (obecnie *Dickeya dadantii*). OPG wytwarzane przez *E. chrysanthemi* są bardzo heterogeniczne pod względem struktury szkieletu i występujących podstawników. Stopień polimeryzacji głównego łańcucha waha się od 5-12 podjednostek. Łańcuch może być podstawiony np. resztami kwasu octowego oraz bursztynowego [Cogez i wsp., 2001, Bontemps-Gallo, 2013].

Podobną strukturą charakteryzuje się OPG *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Zawiera on od 6-13 reszt glukozy w łańcuchu i jest wysoce rozgałęziony. Do niedawna uważano, że cząsteczka ta nie zawiera żadnych podstawników. Ostatnie badania wskazują jednak na występowanie podstawników bursztynylowych dołączonych do węgla 6 glukozy. Stwierdzono również, że synteza łańcuchów glukanowych u *P. syringae* pv. *syringae* nie podlega ścisłej kontroli wielkości. *P. syringae* pv. *syringae* może syntetyzować oligocukry o stopniu polimeryzacji wynoszącym 6-22 reszt glukozy, podstawionych jedną grupą acetylową, a także glukany o stopniu polimeryzacji 7-17 z dwiema resztami kwasu octowego [Cho i wsp., 2009].

I.3.2.1.2 Cykliczne β -(1,2)-glukany

Do grupy tej należą oligosacharydy cykliczne, syntetyzowane przez bakterie należące do *Rhizobiales* z rodzajów; *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* oraz *Brucella*. Oligocukry te mają bardzo zróżnicowany stopień polimeryzacji. Zazwyczaj wynosi on od 17 do 25 podjednostek tak jak np. u *Agrobacterium tumefaciens* i *Brucella abortus*, ale może też być znacznie wyższy jak u *Sinorhizobium meliloti* gdzie oligomery zawierają 17-40 reszt glukozy (**Ryc. 19**). Nie stwierdzono występowania cząsteczek o stopniu polimeryzacji mniejszym niż 17, co prawdopodobnie jest spowodowane energetycznym uprzywilejowaniem pierścienia. Cząsteczki glukozy w polimerze połączone są wyłącznie wiązaniami β -(1,2). Mogą występować podstawniki niecukrowe takie jak bursztynian, fosfoglicerol, metylomalonian [Breedveld i Miller, 1994].



Ryc. 19. Struktura cyklicznych β -(1,2)-glukanów [Bohin, 2000].

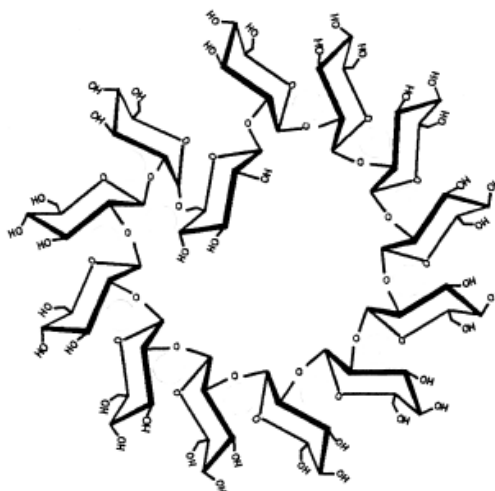
Przykładem szczepu produkującego glukany tej klasy jest *Mesorhizobium huakuii*. Jest to polimer obojętny i nierozgałęziony o stopniu polimeryzacji wynoszącym 17-28. Najczęściej występujące cząsteczki glukanu zawierają 22 glukozy. Glukan *M. huakuii* jest podobny do oligocukrów produkowanych przez szczepy należące do gatunków *Agrobacterium* i *Sinorhizobium*. OPG *Sinorhizobium meliloti* i *Agrobacterium tumefaciens* są zbudowane z 17-25 podjednostek i mogą być dodatkowo podstawione resztami tj. bursztynianową, metylomalonianową czy też sn-1-fosfoglicerolową [Choma i Komaniecka, 2003].

I.3.2.1.3 Cykliczne β -(1,2)-glukany z jednym wiązaniem typu α -(1,6) w pierścieniu

Cząsteczki należące do tej grupy wyizolowane zostały z komórek *Ralstonia solanacearum*, *Rhodobacter sphaeroides* i *Xanthomonas campestris* [Talaga i wsp. 1996, Cho i wsp. 2008, York, 1995]. Stopień polimeryzacji glukanów należących do tej klasy waha się od 13 podjednostek u *Ralstonia* przez 16 u *Xanthomonas* do 18 u *Rhodobacter*. W pierścieniu oligocukrowym poza wiązaniami β -(1,2) występuje jedno wiązanie α -(1,6) (**Ryc. 20**). Obecność tego wiązania wpływa na wzrost sztywności oligomeru. Znaczenie biologiczne tej modyfikacji nie jest znane [Lippens i wsp., 1998].

Badania przeprowadzone na preparatach *X. campestris* pv. *campestris* wykazały, że cząsteczka glukanu może być podstawiona jedną bądź dwiema resztami fosfoglicerolu w pozycji C6 glukozy. Glukan produkowany przez *Ralstonia solanacearum* może być wzbogacony resztami fosfoglicerowymi, fosfoetanolaminy, fosfocholiny, acetylowymi, bursztynianowymi i metylomalonianowymi [York, 1995, Jung i wsp. 2005, Talaga i wsp. 2002, Cho i wsp., 2008].

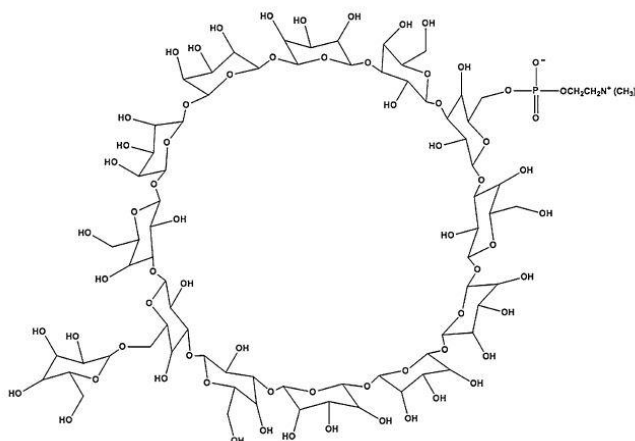
R. sphaeroides syntetyzuje cykliczny glukan zawierający 18 reszt glukozy. Część pierścieni jest podstawiona w pozycji C6 glukozy resztami kwasu bursztynowego, a także jedną bądź dwiema resztami acetylowymi [Talaga i wsp., 2002].



Ryc. 20. Struktura cyklicznych β -(1,2)-glukanów z jednym wiązaniem typu α -(1,6) w pierścieniu [Bohin, 2000].

I.3.2.1.4 Cykliczne β -(1,3);(1,6)-glukany

Glukany należące do tej klasy to cząsteczki cykliczne, połączone wiązaniami β -(1,3) oraz wiązaniami β -(1,6)-glikozydowymi. Do tej grupy zaliczono m.in. oligocukry syntetyzowane przez *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Azospirillum brasilense* oraz *Azorhizobium caulinodans*. Glukan produkowany przez *Bradyrhizobium* sp. jest znacznie mniejszą cząsteczką niż np. glukan produkowany przez *Agrobacterium* czy *Rhizobium*. Zawiera on od 10 – 13 podjednostek glukozy. Pierścienie glukanu mogą być podstawione resztami fosfocholiny w pozycji C6 glukozy (**Ryc. 21**). Fosfocholina tworzy jony obojnacze, gdyż zawiera równą liczbę grup zjonizowanych o przeciwnych ładunkach i w zależności od środowiska może nadawać cząsteczce glukanu charakter anionowy, kationowy bądź obojętny [D’Haeze i wsp., 2004].



Ryc. 21. Struktura cyklicznego β -(1,3)-(1,6)-glukanu *B. japonicum* [Rolin i wsp. 1992].

Kolejnym gatunkiem bakterii produkującym glukany należące do tej klasy jest *Azospirillum brasilense*. Stopień polimeryzacji podobnie jak u *Bradyrhizobium diazoefficiens* (*B. japonicum*) wynosi 12-13. Są to jednak cząsteczki niejednorodne. Glukany *A. brasilense* stanowią mieszaninę trzech typów oligomerów. Podstawowa cząsteczka (glukan I) to polimer 12 glukozy, które połączone są wiązaniami β -(1,3) (trzy wiązania), β -(1,4) (jedno wiązanie) oraz β -(1,6) (osiem wiązań). Drugi typ glukanu (glukan II) powstaje przez dołączenie dodatkowej cząsteczki glukozy wiązaniem α -(1,3) do łańcucha glukanu I. Trzeci typ to zmodyfikowany glukan II powstały poprzez metylację dodatkowej glukozy [Altabe i wsp., 1994, 1998].

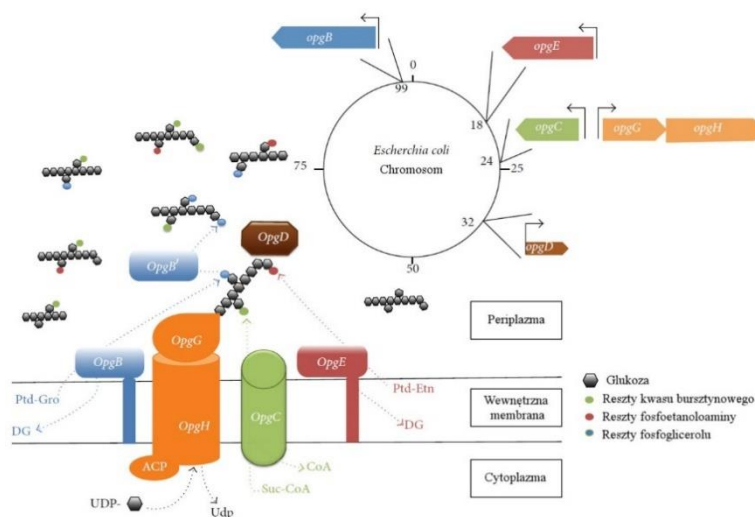
Kolejnym przykładem jest glukan *Azorhizobium caulinodans*. W większości jest to polimer jedenastoczłonowy, ale mogą także występować cząsteczki 10 i 13

cukrowe. Cechą wyraźnie odróżniającą go od oligomerów bradyryzobiowych jest brak rozgałęzień oraz podstawników [Komaniecka i Choma, 2003].

I.3.2.2 Synteza OPG

Główną metodą badawczą umożliwiającą scharakteryzowanie genów niezbędnych do biosyntezy peryplazmatycznych glukanów jest analiza fenotypów mutantów. Poznane zostały cztery główne geny biorące udział w biosyntezie OPG. Dwa z nich są niezbędne do tworzenia szkieletu i są wysoce konserwatywne. Geny te tworzą operon *opgGH* [Lacroix i wsp. 1991].

W przypadku *E. coli* produktami genów *opgH* i *opgG* są odpowiednio białka OpgH i OpgG (Ryc. 22). Białko OpgH zostało zidentyfikowane jako transbłonowa glukozylotransferaza o masie cząsteczkowej 97 kDa. OpgH katalizuje, wraz z białkowym przenośnikiem grup acylowych (ACP – *acryl carrier protein*) jako kofaktorem, przenoszenie UDP-glukozy na nowotworzony szkielet glukanu [Bontemps-Gallo i wsp., 2013]. Główna domena białka OpgH wykazuje podobieństwo strukturalne do rodziny 2-glikozylotransferaz. Białko to tworzy kanał składający się z ośmiu transbłonowych segmentów połączonych trzema długimi oraz krótkimi regionami cytoplazmatycznymi. Jego funkcją jest umożliwienie translokacji OPG z wnętrza komórki do przestrzeni peryplazmatycznej. Translokacja jest procesem przebiegającym równolegle z biosyntezą łańcucha oligosacharydowego [Komaniecka i Choma, 2008].



Ryc. 22. Biosynteza OPG u *E. coli*. W prawym górnym rogu - lokalizacja genów OPG na chromosomie. Skróty: Ptd-Gro: fosfatydyloglicerol, Ptd-Etn: fosfatydyloetanolamina DG: digliceryd, Succ-CoA: bursztynylo-koenzym A, i CoA: koenzym A [wg. Bontemps-Gallo i wsp., 2013].

Produkt drugiego genu - białko OpgG zlokalizowane jest w przestrzeni peryplazmatycznej. Jest to peryplazmatyczna glukozylotransferaza, odpowiedzialna za wycinanie reszt glukozy, przenoszenie i przyłączanie ich jako bocznych odgałęzień poprzez tworzenie wiązań β -(1,6)-glikozydowych. Masa cząsteczkowa tego białka jest mniejsza niż OpgH i wynosi 56 kDa. Białko to zbudowane jest z dwóch domen o strukturze β kartki, a miejsce aktywne zawiera kwaśne i aromatyczne aminokwasy.

Produkty kolejnych genów – białka OpgB, OpgC i OpgE odpowiedzialne są za dołączanie do głównego łańcucha dodatkowych podstawników. Gen *opgB* koduje dwie transferazy fosfoglicerolowe. Transferaza fosfoglicerolu I jest zakotwiczona w błonie wewnętrznej, ale jej duża katalityczna domena przekazuje reszty fosfoglicerolu z fosfatydyloglicerolu na cząsteczkę OPG w peryplazmie. Transferaza fosfoglicerolu II to rozpuszczalny enzym zlokalizowany w peryplazmie odpowiedzialny za transfer reszt fosfoglicerolu z jednej cząsteczki OPG na drugą.

Gen *opgC* koduje bursztynylotransferazę przenoszącą reszty kwasu bursztynowego, prawdopodobnie z bursztynylo-CoA, na cząsteczki OPG.

Kolejnym niedawno zidentyfikowanym genem jest *opgE*. Jego produkt jest odpowiedzialny za podstawianie łańcucha glukanu resztami fosfoetanolaminy [Bontemps-Gallo i wsp., 2013]. Natomiast gen *opgD* jest odpowiedzialny za kontrolę wielkości tworzonego polimeru [Lacroix i wsp., 1991, 1999; Jackson i wsp., 1984; Lanfroy i wsp., 1993; Lequette i wsp., 2004].

Sekwencje analogiczne do *opgGH* zidentyfikowano także u *Pseudomonas syringae*, *P. aeruginosa* i *E. chrysanthemi* [Lequette i wsp., 2007, Mukhopadhyay i wsp., 1988, Page i wsp., 2001].

Geny *ndvB* i *chvB* występujące u *S. meliloti* i *A. tumefaciens* są zaangażowane w biosyntezę szkieletu cyklicznego β -1,2-glukanów z prekursorów UDP-glukozy. Dodatkowo wiadomo, że gen *cgmB* zlokalizowany u *S. meliloti* koduje rozpuszczalne białko, biorące udział w modyfikacji łańcuchów głównych poprzez podstawianie ich resztami fosfoglicerolu. Białko NdvB jest białkiem błonowym o masie cząsteczkowej 319 kDa. U *S. meliloti* wykryto również obecność cytoplazmatycznego białka NdvA o masie cząsteczkowej 67 kDa. Jego sekwencja aminokwasowa jest zbliżona do sekwencji białka HlyB – jednego ze składników systemu sekrecyjnego typu I (ABC transporter). Może to wskazywać na jego zaangażowanie w proces translokacji glukanów do przestrzeni peryplazmatycznej i środowiska zewnętrznego [Wang i wsp., 1999].

Locus genów zaangażowanych w syntezę cyklicznych β -(1,3); β -(1,6)-glukanów u *Bradyrhizobium* spp. składa się z dwóch sprzężonych genów; *ndvB* i *ndvC*. Produkty tych genów – NdvB i NdvC to białka błonowe o masach odpowiednio 102 kDa i 62 kDa. Stwierdzono że, w przypadku inaktywacji genu *ndvB* synteza glukanów zostaje zahamowana. Natomiast jeśli dezaktywowany jest tylko gen *ndvC* syntetyzowane są zmodyfikowane łańcuchy glukanów, połączone jedynie wiązaniami β -(1,3). Może to wskazywać na udział genu *ndvC* w syntezie wiązań β -(1,6)-glikozydowych [Bhagwat i wsp., 1999].

Genami odpowiedzialnymi za syntezę peryplazmatycznych glukanów u *Brucella abortus* są geny *cgm* i *cgs*. Są one homologiczne do genu *opgC* występującego u *R. sphaeroides*. Produkt tego genu - białko OpgC jest odpowiedzialne za przyłączanie reszt kwasu bursztynowego do nowotworzonego łańcucha glukanu [Roset i wsp., 2006, Cogež i wsp., 2002].

U przedstawiciela czwartej klasy glukanów – *R. solanacearum* w biosyntezie glukanu bierze udział glukozylotransferaza H (produkt genu *opgH* (*mdoH*)) oraz produkt genu *opgG* (*mdoG*) [Salanoubat i wsp., 2002].

Pomiędzy genami odpowiedzialnymi za syntezę peryplazmatycznych glukanów występuje wiele podobieństw. Przykładem są geny *opgG* produkowane przez różne organizmy, takie jak *R. solanacearum* i *P. aeruginosa*. W niektórych przypadkach tego typu podobieństwo nie występuje. Przykładem są geny *cgm* i *opgC* u *B. abortus* i *E. coli*, które kodują dwa różne enzymy odpowiedzialne za podstawianie reszt kwasu bursztynowego do łańcucha PG. Fakt ten sugeruje, że geny, które kodują białka strukturalnie zróżnicowane, ale posiadające podobne funkcje biochemiczne mogą ewoluować niezależnie od siebie [Lee i wsp., 2009].

I.3.2.2.1 Regulacja biosyntezy glukanów

Wzrost mikroorganizmów jest w dużej mierze limitowany warunkami środowiskowym, takimi jak: temperatura, pH, promieniowanie i ciśnienie osmotyczne. Bakterie Gram-ujemne akumulują osmolity w przestrzeni peryplazmatycznej w celu adaptacji do zmieniających się warunków. Proces aktywnego przeciwdziałania skutkom stresu osmotycznego jest określany, jako osmoregulacja. Polega on na utrzymaniu równowagi wodno-elektrolitowej komórki. Stwierdzono zasadniczą różnicę w podatności na plazmolizę między bakteriami

Gram-dodatnimi i Gram-ujemnymi. Bakterie Gram-dodatnie są mniej podatne na zmiany ciśnienia, co jest spowodowane odmienną budową komórki jak i wyższym ciśnieniem turgorowym. W sytuacji stresu hiperosmotycznego bakterie Gram-ujemne gromadzą w komórce duże ilości glutaminianu potasu, podczas gdy Gram-dodatnie gromadzą prolinę [Sochocka i Boratyński, 2011].

Biosynteza peryplazmatycznych glukanów jest to proces regulowany na dwa sposoby. Głównym i najbardziej rozpowszechnionym sposobem regulacji produkcji peryplazmatycznych glukanów jest kontrola osmotyczna. Stwierdzono, że znaczny spadek osmolarności środowiska skutkuje znacznym przyspieszeniem syntezy OPG. Natomiast przy wysokim ciśnieniu osmotycznym transkrypcja operonu *opgGH* jest tłumiona i produkcja OPG ustaje. Regulacja tego typu zachodzi m.in. u *E. coli*, *E. chrysantemi*, *R. solanacearum* [Lacroix i wsp., 1999].

U niektórych szczepów wykryto możliwość występowania dodatkowego mechanizmu regulacji kontroli osmotycznej. U *S. meliloti* i *A. tumefaciens* stwierdzono, że w wysokich stężeniach mannitolu i sacharozy (powyżej 400 mM) nie następuje zahamowanie syntezy OPG. Również w przypadku szczepów *B. abortus* i *B. ovis* w wysokich stężeniach soli (250-500 mM KCl) nie dochodziło do zahamowania produkcji glukanów. Kiedy gen *cgs* zaangażowany w syntezę OPG został przeniesiony do mutantów *S. meliloti* i *A. tumefaciens* stwierdzono u nich zdolność do syntezy glukanów nawet w wysokich stężeniach KCl (250 – 500 mM). Natomiast kiedy gen *chvB* *A. tumefaciens* został przeniesiony do mutantu *B. abortus* nie był zdolny do syntezy OPG w warunkach wysokiego ciśnienia osmotycznego. Wyniki te sugerują występowanie alternatywnego mechanizmu regulacji syntezy glukanów u *Brucella*, który umożliwia ochronę przed wahaniami ciśnienia osmotycznego.

Drugim, odrębnym mechanizmem syntezy OPG jest szlak oparty na kontroli metabolicznej przy użyciu sprzężenia zwrotnego (tzw. *feedback control*). Został on wykryty niedawno u szczepów *E. coli* podczas ich hodowli na pożywce pozbawionej glukozy. Szczepy te nie były zdolne do produkcji glukanów przy braku glukozy w podłożu. Szybka synteza glukanów następowała w momencie dodania do podłoża glukozy. Podobną zależność zaobserwowano również u *Azorhizobium caulinodans*. W obecności wysokiego stężenia osmoregulatorów takich jak glukoza czy chlorek sodu - zamiast zahamowania syntezy glukanów obserwowano jej wzrost [Kennedy i wsp., 1996, Komaniecka i Choma, 2003].

I.3.2.2.2 Rola peryplazmatycznych glukanów

Szczegółowa rola, jaką pełnią peryplazmatyczne glukany nie została jeszcze dokładnie poznana. Wiadomo jednak, że są one niezbędne do prawidłowego funkcjonowania wielu bakterii. Do najistotniejszych funkcji możemy zaliczyć ich rolę w ochronie komórki przed szokiem osmotycznym.

Glukany odgrywają ważną rolę w zaistnieniu efektywnej symbiozy diazotroficznej. Polisacharydy te są istotne w początkowych etapach rozwoju symbiozy, zapewniają prawidłową adhezję bakterii do włosników korzeniowych, a następnie umożliwiają bakteriom i bakteroidom adaptację do zmienionych warunków osmotycznych panujących we wnętrzu brodawki. Szczepy niezdolne do produkcji glukanów nie są zdolne do zakażenia gospodarza roślinnego i tworzenia efektywnych brodawek. Mutanty defektywne w produkcji glukanów wykazują również szereg defektów strukturalnych. Występuje u nich zwiększona wrażliwość na antybiotyki i detergenty. Są one nieruchliwe, gdyż nie są w stanie wytwarzać rzęsek. Tego typu zależność stwierdzono m.in. u *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium fredii* i *Mesorhizobium loti* [Bohin, 2000].

U mutantów *A. tumefaciens* stwierdzono defekty w możliwości tworzenia biofilmu i zdolności adhezji do podłoża. Zaobserwowano zahamowanie syntezy białka transmembranowego VirB10 – jednego ze składników IV systemu sekrecji odpowiedzialnego za wirulencję.

U *Bradyrhizobium* glukany odgrywają istotną rolę w dalszych etapach rozwoju brodawek. W przypadku mutacji w genie *ndvB* występował całkowity brak syntezy PG oraz tworzenie nieefektywnych brodawek [Bhagwat i wsp., 1999].

U *Brucella abortus* OPG są niezbędne w procesie infekcji, przeciwdziałają odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Analogicznie glukany produkowane przez *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* są niezbędne bakterii do przeżycia w liściach kolonizowanego tytoniu – glukany odgrywają ważną rolę w tłumieniu działania systemu odpornościowego roślin [Gay-Fraret i wsp., 2012]. U *E. chrysanthemi* będącej patogenem roślinnym prawidłowa synteza glukanów zapewnia efektywność w procesie wirulencji [Page i wsp., 2001, Bhagwat, 2009].

I.3.3 POLISACHARYDY KAPSULARNE (KPS)

Kapsularne polisacharydy (KPS, CPS) są kolejną klasą polisacharydów powierzchniowych. Spotykane są zarówno u bakterii Gram-dodatnich np. *Staphylococcus aureus* czy *Streptococcus pneumoniae*, jak i u Gram-ujemnych patogenów, takich jak *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* oraz wśród ryzobiów [Willis i wsp., 2013].

W odróżnieniu od egzopolisacharydów nie są one wydzielane do podłoża, ale ściśle przylegają do powierzchni komórki bakteryjnej. Polisacharydy kapsularne są ważnymi czynnikami wirulencji dla wielu patogenów. Zróżnicowanie struktur KPS jest bardzo duże nawet w obrębie danego gatunku i dlatego też jest wykorzystywane do oznaczeń serologicznych. KPSy pełnią istotną funkcję podczas kolonizacji nici infekcyjnej. Wraz z egzopolisacharydem tworzą zewnętrzną barierę ochronną, dzięki której bakterie są chronione przed odpowiedzią immunologiczną ze strony roślinnego gospodarza. Dodatkowo KPS chronią komórki przed wysychaniem i nadają im oporność na bakteriofagi [Frayse i wsp., 2003].

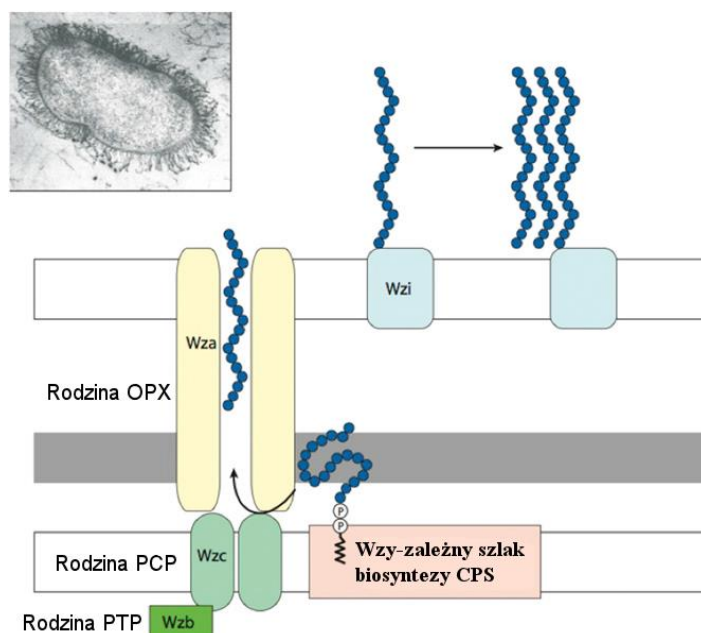
Wyróżniamy dwa typy KPS. Pierwsza grupa to nierozpuszczalne polimery cukrów obojętnych wykryte u *Rhizobium leguminosarum*. Oligocukry te zbudowane są z glukozy, galaktozy i mannozy połączonych w proporcji 1:4:1. Wzmoczona produkcja kapsularnych polisacharydów najczęściej sprzężona jest z nadprodukcją egzopolisacharydów, a więc występuje w późniejszych fazach hodowli bakteryjnej [Breedveld i wsp., 1993].

Drugą grupę stanowią polimery o charakterze kwaśnym, co jest spowodowane obecnością kwasu 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowego (Kdo) lub 1-karboksy-2-keto-3-dezoksycukru (Kdx). Cukry te są także określane mianem ryzobiowych antygenów K ze względu na podobieństwo strukturalne do antygenów K klasy II *E. coli*. Tego typu polisacharydy zidentyfikowane zostały m.in. u *Sinorhizobium meliloti* oraz *S. fredii*. W zależności od szczepu antygeny K mogą być zbudowane z glukozy, mannozy, galaktozaminy, Kdo, kwasu *N*-acetylneuraminowego, Kdx. Pomimo znacznego zróżnicowania strukturalnego w kapsularnych polisacharydach możemy wyróżnić konserwatywny disacharydowy motyw strukturalny podjednostki. Przykładowe struktury tych oligomerów znajdują się w **tabeli 7** [Kereszt i wsp., 1998, Kiss i wsp., 1997, Janczarek i wsp., 1999].

Tabela 7. Struktura wybranych antygenów K u ryzobiów [Frayssé i wsp., 2003].

Szczep	Struktura
<i>S. fredii</i> USDA205	$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 5)\text{-}\alpha\text{-D-Kdop-(2}\rightarrow)_n$ $[-2\text{-O-MeManp}\rightarrow\beta\text{-Kdo-}]_n$
<i>S. fredii</i> USDA257	$[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Manp-(1}\rightarrow 5)\text{-}\beta\text{-D-Kdop-(2}\rightarrow)_n$ $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-2-O-MeManp-(1}\rightarrow 5)\text{-}\beta\text{-D-Kdop-(2}\rightarrow)_n$
<i>S. meliloti</i> AK631	$[-\beta\text{-GlcA}\rightarrow\text{Pse5N}(\beta\text{-OH-But})7\text{NAc-}]_n$
<i>S. meliloti</i> NGR247	$[-\alpha\text{-Glc}\rightarrow\alpha\text{-NeuNAc-}]_n$
<i>S. meliloti</i> NGR185	$[-\beta\text{-GlcNAc}\rightarrow\beta\text{-Kdo-}]_n$
<i>S. fredii</i> USDA208	$[-\alpha\text{-Gal}\rightarrow\beta\text{-Kdo-}]_n$
<i>S. fredii</i> USDA201	$[-\alpha\text{Gal}\rightarrow\beta\text{-Kdo}\rightarrow\alpha\text{-2-O-MeHex}\rightarrow\beta\text{-Kdo-}]_n$
<i>S. fredii</i> HH303	$[\text{Rha, GalA}]_n$
<i>Sinorhizobium</i> sp. NGR234	$[-\beta\text{-Glc}\rightarrow\alpha\text{-Pse5NAc7NAc-}]_n$

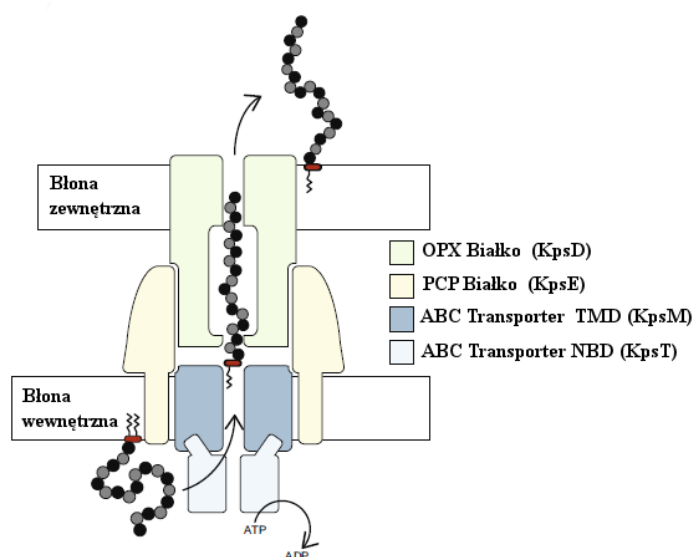
Produkcja polisacharydów kapsularnych u Gram-ujemnych bakterii zachodzi przy udziale dwóch odrębnych szlaków, do których należą system zależny od transporterów ABC oraz system Wzy- zależny [Cuthbertson i wsp., 2009].

**Ryc. 23.** Wzy-zależny szlak biosyntezy KPS (CPS) [Bushell i wsp., 2013].

Pierwszym etapem Wzy-zależnej ścieżki jest zachodząca w cytoplazmie synteza powtarzających się podjednostek kapsularnego polisacharydu, kontynuowana przy udziale białka Wzy. Polimery te są następnie przenoszone poprzez błonę zewnętrzną przy użyciu białek Wzc i Wza i kolejno łączone w zespoły/grupy przy

udziale białka Wzi (**Ryc. 23**). Dokładny proces syntezy kompletnego KPS na powierzchni komórki bakteryjnej nie został jeszcze poznany. Tego typu synteza i transport ma miejsce m.in. u niektórych przedstawicieli *E. coli*, a także u innych gatunków bakterii np.: *Klebsiella* i *Erwinia* [Bushell i wsp., 2013, Willis i Whitfield, 2013].

Szlak syntezy kapsularnych polisacharydów przy udziale transporterów ABC został poznany dużo lepiej niż Wzy-zależny u niektórych szczepów *E. coli* a także u *Neisseria meningitidis* i *Haemophilus influenzae*. Charakterystyczną cechą tego modelu jest obecność fosfolipidów na redukującym końcu łańcucha polisacharydu. Fosfolipidem tym może być na przykład fosfatydyloglicerol przyłączony do głównego łańcucha polisacharydowego przy pomocy łącznika – Kdo.



Ryc. 24. Szlak biosyntezy CPS przy udziale transporterów ABC [wg. Willis i Whitfield, 2013].

W szlaku tym podjednostki KPS syntetyzowane są w cytoplazmie i eksportowane poprzez błonę zewnętrzną przy użyciu transporterów ABC. Zidentyfikowane zostały cztery grupy komponentów biorących udział w eksporcie kompleksu KPS. Są to dwa transportery ABC: TMD (KpsM) i NBD (KpsT) oraz dwa białka: OPX (KpsD) i PCP (KpsE). To ostatnie pełni funkcję kopolimerazy (**Ryc. 24**) [Willis i Whitfield, 2013].

I.3.4 EGZOPOLISACHARYDY

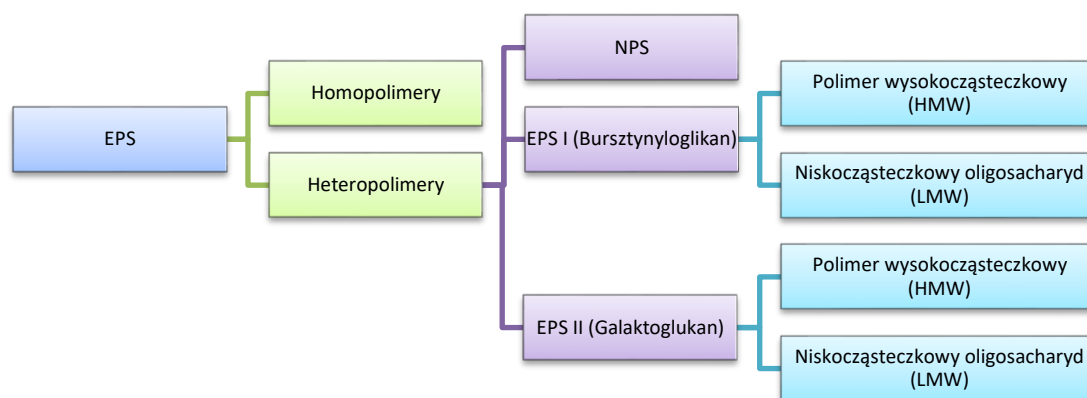
I.3.4.1 Egzopolisacharydy ryzobiowe

Cechą charakterystyczną bakterii należących do *Rhizobiales* jest wytwarzanie dużych ilości zewnątrzkomórkowych polisacharydów. Związki te mogą być akumulowane na powierzchni komórki bakteryjnej tworząc ściśle przylegającą otoczkę (kapsularne polisacharydy - CPS), bądź być wydzielane do środowiska w postaci śluzu (egzopolisacharydy - EPS).

Polisacharydy powierzchniowe pełnią w komórce wiele istotnych funkcji. Biorą udział w tworzeniu efektywnej symbiozy pomiędzy bakterią, a roślinnym gospodarzem podczas wszystkich jej etapów. Stanowią ochronę komórki przed niekorzystnymi warunkami środowiska tj. zmiany pH, temperatury, ciśnienia, działanie szkodliwych związków chemicznych np. metali ciężkich oraz czynnikami biologicznymi jak np. bakteriofagi. Zabezpieczają komórkę przed nadmiernym wysychaniem tworząc warstwę ochronną [Górska i wsp., 2007].

Egzopolisacharydy bakteryjnie to polimery cukrowe wykazujące specyfikę gatunkową, a nawet szczepową. Są to cząsteczki bardzo zróżnicowane strukturalnie pod względem składu cukrów prostych, rodzaju wiązań oraz występowania podstawników niecukrowych. Łańcuch główny egzopolisacharydu może zawierać liczne rozgałęzienia [Skorupska i wsp., 2006]. Ze względu na skład cukrowy egzopolisacharydy dzieli się na homopolimery, które składają się z monosacharydów jednego typu oraz heteropolimery o bardziej zróżnicowanej strukturze. Wśród cukrów prostych występujących w składzie egzopolisacharydów możemy wyróżnić glukozę, galaktozę, ramnozę, kwas glukuronowy oraz kwas galakturonowy. Mogą one być podstawione grupami acetylowymi, metylowymi, pirogronianowymi czy też resztami kwasu bursztynowego oraz kwasów uronowych. Obecność grup karboksylowych z kwasów organicznych i reszt pirogronianu nadaje cząsteczce egzopolisacharydu charakter kwaśny [Reinhold. i wsp., 1994, Her. i wsp., 1990, Zevenhuizen, 1997].

Wśród egzopolisacharydów ryzobiowych najlepiej poznana została struktura egzopolisacharydu produkowanego przez *Sinorhizobium meliloti*. Bakterie te syntetyzują dwa rodzaje zewnętrznych polisacharydów – EPS I czyli bursztynyloglikan oraz EPS II – galaktoglikan. Schemat obrazujący rodzaje egzopolisacharydów u *Sinorhizobium* przedstawiony został na **rycinie 25**.



Ryc. 25. Typy egzopolisacharydów u *Sinorhizobium*.

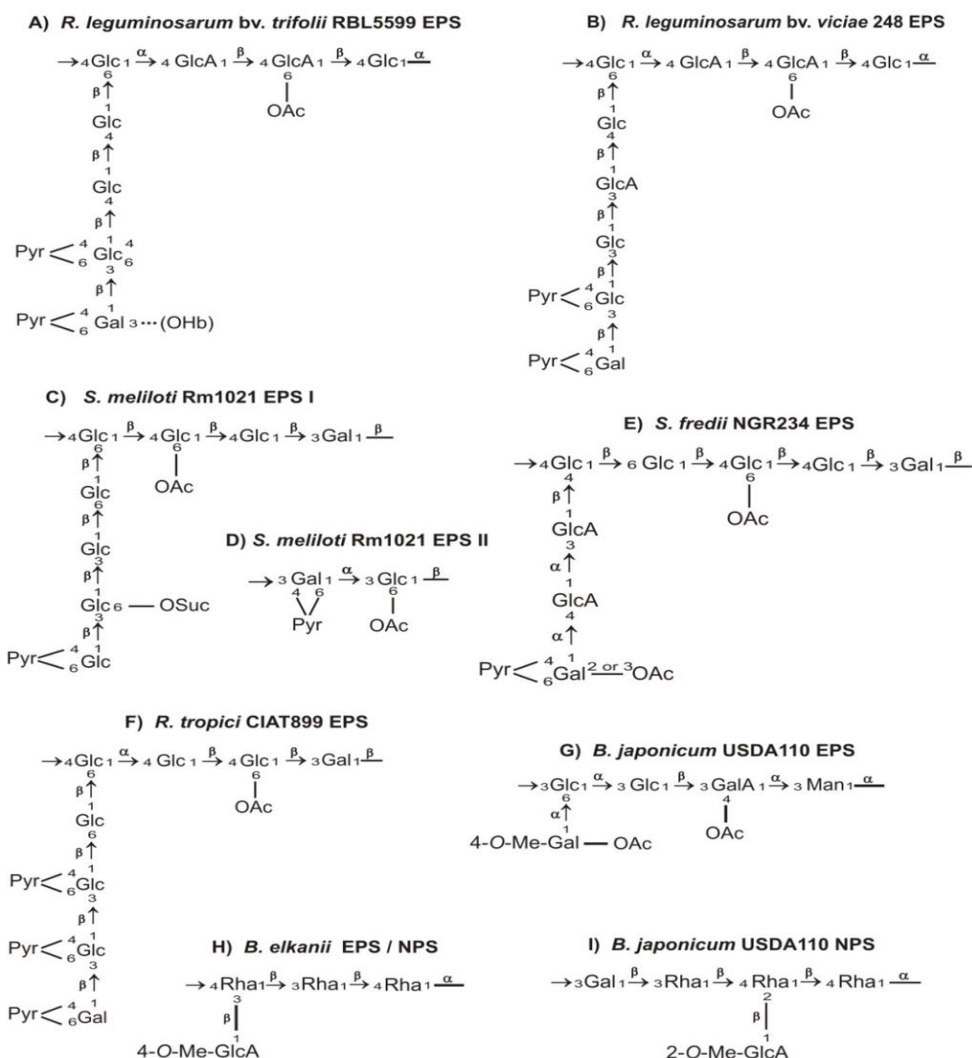
Bursztynyloglikan zbudowany jest z powtarzającej się ośmioczłonowej podjednostki zawierającej jedną resztę galaktozy i siedem reszt glukozy połączonych wiązaniami β -(1,3), β -(1,4) oraz β -(1,6)-glikozydowymi. Łańcuch udekorowany jest dodatkowo grupą octanową, pirogronianową i bursztynianową (**Ryc. 26**) [Gonzalez i wsp., 1996, Reinhold i wsp., 1994, Zevenhuizen, 1997].

Galaktoglukan (EPS II) syntetyzowany jest przez *S. meliloti* jedynie w warunkach stresu fosforanowego bądź w przypadku występowania mutacji w jednym z genów regulatorowych tj. *mucR* czy *expR*. EPS II różni się znacząco od bursztynyloglikanu. Jest to polimer tworzony przez powtarzające się disacharydowe podjednostki zbudowane z acetylowanej glukozy i galaktozy podstawionej grupą pirogronianową. Cukry są połączone ze sobą wiązaniami α -(1,3) i β -(1,3)-glikozydowymi (**Ryc. 26**) [Her i wsp., 1990, Reuber i Walker, 1993, Zevenhuizen, 1997].

Oba typy egzopolisacharydu mogą być produkowane w formie dwóch różniących się masą cząsteczkową frakcji. Egzopolisacharyd wysokocząsteczkowy HMW (ang. *high molecular weight*) jest frakcją reprezentowaną przez polimery o masie cząsteczkowej od 10^6 - 10^7 Da, na którą składa się od setek do tysięcy podjednostek cukrowych. Polimer niskocząsteczkowy LMW (ang. *low molecular weight*) tworzą monomery, trimery i tetrametry powtarzającej się disacharydowej podjednostki w przypadku EPS II, bądź oligomery zbudowane z 15-20 reszt cukrowych w przypadku EPS I [Amemura i wsp., 1983, Gonzalez i wsp., 1996].

U *Bradyrhizobium diazoefficiens* (*B. japonicum*) i u *B. elkani* odkryto występowanie dodatkowej klasy polisacharydów zwanych NPS (ang. *nodule polysaccharide*), wytwarzanych wewnątrz symbiosomów w brodawkach na

korzeniach soi (*Glycyne max*). W przypadku *B. diazoefficiens* NPS tworzą powtarzające się podjednostki cukrowe zbudowane z reszt ramnozy, galaktozy i metylowanego kwasu glukuronowego, które występują w proporcji 3:1:1. Natomiast NPS *B. elkanii* ma strukturę identyczną jak EPS i zbudowany jest z powtarzających się podjednostek ramnozy i metylowanego kwasu glukuronowego (**Ryc. 26**) [Streeter i wsp., 1993, Minamisawa, 1989, Fraysee i wsp., 2003].



Ryc. 26. Struktura wybranych podjednostek ryzobiowych egzopolisacharydów: (A) *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, (B) *R. leguminosarum* bv. *viciae*, (C) *S. meliloti* EPS I, (D) *S. meliloti* EPS II, (E) *S. fredii* NGR234, (F) *R. tropici*, (G) *B. japonicum*, (H) *B. elkanii*, (I) *B. japonicum* NPS [Janczarek, 2011].

Kolejnym dobrze przebadanym egzopolisacharydem jest polimer syntetyzowany przez *Rhizobium leguminosarum*. U biowarów *viciae* i *trifolii* główny rdzeń polimeru stanowi identyczny oktamer zbudowany z glukozy, kwasu glukuronowego i galaktozy

występujących w stosunku molowym 5:2:1. Do oktameru dołączone są podstawniki niecukrowe takie jak: octan, pirogronian i 3-hydroksymaślan. Pomimo iż jest to dość konserwatywna struktura to w przypadku niektórych szczepów występują modyfikacje. Przykładowo u *R. leguminosarum* 4S główny rdzeń jest pomniejszony o terminalną galaktozę. Natomiast główny rdzeń EPS *R. leguminosarum* bv. *viciae* 248 zawiera dodatkową resztę kwasu glukuronowego. Rozmieszczenie podstawników niecukrowych również jest cechą charakterystyczną dla poszczególnych szczepów [Robertson i wsp., 1981, O'Neill i wsp., 1991, Breedveld i wsp., 1993, McNeil i wsp., 1986, Philip-Hollingsworth i wsp., 1989, Canter Cremers i wsp., 1991].

I.3.4.2 Biosynteza egzopolisacharydu

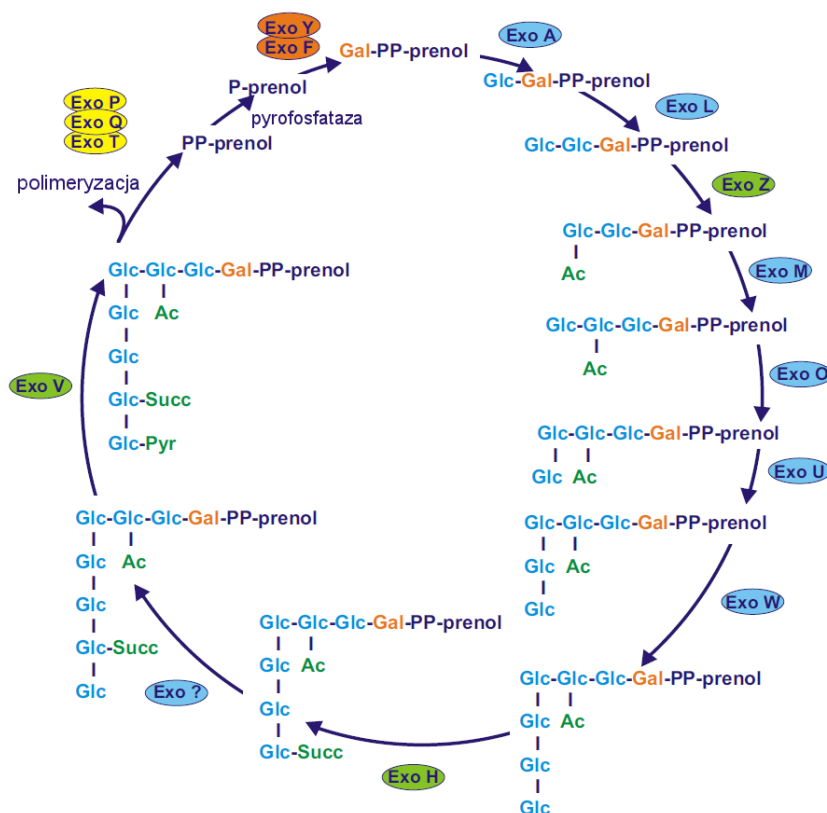
Biosynteza egzopolisacharydów ryzobiowych to proces złożony, regulowany przy udziale wielu genów. Główne geny zaangażowane w proces syntezy podjednostek egzopolisacharydu, ich polimeryzacji, modyfikacji oraz eksportu zlokalizowane są zarówno na chromosomie jak i na megaplazmidach ryzobiowych. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na proces syntezy są warunki środowiskowe. Wszystkie te czynniki – zarówno genetyczne jak i środowiskowe warunkują efektywność procesu syntezy egzopolisacharydu.

Miejszem zachodzenia procesu jest błona cytoplazmatyczna komórki bakteryjnej. W cykl zaangażowane są wieloskładnikowe kompleksy enzymatyczne w tym enzymy tworzące nukleotydowe prekursory cukrowe, specyficzne transferazy przenoszące kolejne reszty cukrowe na podjednostkę EPS, enzymy przyłączające podstawniki niecukrowe oraz białka uczestniczące w polimeryzacji i eksporcie powstających się podjednostek [Glucksmann i wsp., 1993, Skorupska i wsp., 2006].

I.3.4.2.1 Biosynteza EPS *Sinorhizobium meliloti*

Na genom *S. meliloti* składają się trzy odrębne replikony: chromosom oraz dwa megaplazmidy. Geny zaangażowane w syntezę bursztynyloglikanu zlokalizowano na chromosomie oraz na jednym z megaplazmidów [Reuber i Walker., 1993, Finan i wsp., 2001]. Wśród genów chromosomalnych wymienić można *exoC*, *exoR*, *exoS*, *exoD* i *mucR*. Obecność kolejnych 28 genów oznaczonych, jako *exo* i *exs* stwierdzono na plazmidzie symbiotycznym pSymB [Glucksmann i wsp., 1993, Becker i wsp., 1993a].

Synteza EPS I odbywa się na lipidowym nośniku, którym jest fosforan C₅₅ izoprenyłu zakotwiczony w błonie wewnętrznej. Proces zaczyna się od syntezy ośmiocukrowych podjednostek z ich prekursorów: UDP-Glc i UDP-Gal. Początkowym etapem jest przeniesienie UDP-Gal na nośnik lipidowy przy udziale białek ExoY i ExoF. Następnie przy udziale glikozylotransferaz do rosnącej podjednostki przyłączane są kolejne reszty glukozy. Za pomocą białek ExoZ, ExoV i ExoH następuje modyfikacja podjednostki przez przyłączenie kolejno reszty acetylowej, pirogronianowej i bursztynianowej. Następnym etapem jest eksport podjednostek EPS I i ich polimeryzacja do dojrzałej cząsteczki EPS. W procesie uczestniczą między innymi białka zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej (ExoP, ExoQ i ExoT) [Buendia i wsp., 1991, Becker i wsp., 1993b, Reed i wsp., 1991, Reuber i Walker, 1993]. Dotychczas nie zidentyfikowano genu odpowiedzialnego za syntezę enzymu biorącego udział w przyłączeniu terminalnej glukozy. Szczegóły procesu przedstawione zostały na **rycinie 27**.



Ryc. 27. Szlak biosyntezy bursztynyloglikanu *S. meliloti* [Na podstawie: Skorupska i wsp., 2011].

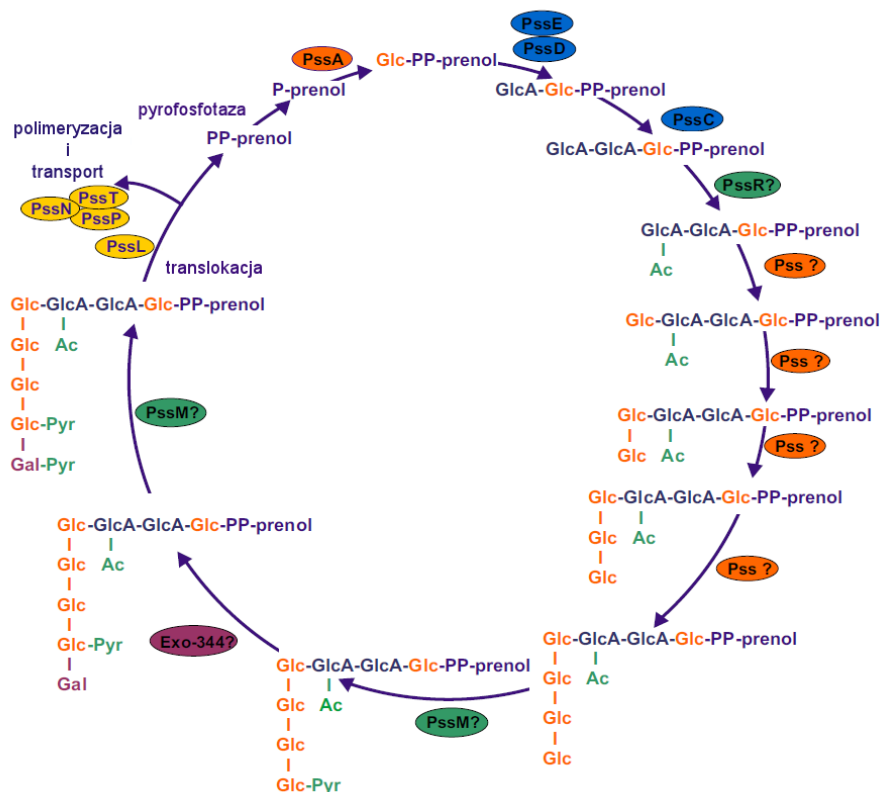
Drugi typ egzopolisacharydu produkowany jest przez *S. meliloti* w warunkach stresu fosforanowego. W syntezę galaktoglukanu zaangażowane są geny *exp* zlokalizowane na pSymB oraz na chromosomie. Pomimo iż szlak biosyntezy galaktoglukanu nie został dokładnie zbadany, na zasadzie homologii określono przypuszczalne funkcje białek. Cztery białka Exp są zaangażowane w tworzenie dTDP-ramnozy. Prekursorem jest w tym przypadku dTDP-glukoza. W kolejnych etapach biorą udział glukozylotransferazy tworzące wiązania α - i β -glikozydowe w nowopowstającym łańcuchu. W eksport EPS II może być zaangażowane białko ExpE1 wykazujące homologię do sekrecyjnego białka NodO *Rhizobium leguminosarum*. Z kolei białka ExpD1 (ABC transporter) i ExpD2 (należące do grupy białek błonowych typu MFP - *membrane fusion protein*) są niezbędne do sekrecji białka ExpE1 wykazują homologię do białek sekrecyjnych PrtD i PrtE *Erwinia chrysanthemi* [Becker i wsp., 1997, Reuber i Walker, 1993].

I.3.4.2.2 Biosynteza EPS *Rhizobium leguminosarum*

R. leguminosarum jest gatunkiem, w którym wyodrębniono dwa biowary – *viciae* i *trifolii* różniące się zakresem gospodarza. Na genom *R. leguminosarum* biowar *viciae* 3841 składają się kolisty chromosom oraz 6 plazmidów o wielkości od ok. 147 do 870 kb. Genom *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA 1 to pięć replikonów tj. chromosom i cztery megaplazmidy o wielkościach od ok. 497- 798 kb [Skorupska i wsp., 2008]. W syntezę egzopolisacharydu *R. leguminosarum* zaangażowane są geny chromosomalne. Większość z nich zlokalizowana jest w obrębie klastra Pss-I. Jak dotąd scharakteryzowano dwa geny odpowiedzialne za syntezę cukrowych prekursorów: *exoB* i *exo5*. Gen *exoB* koduje 4-epimerazę-UDP-glukozy odpowiedzialną za syntezę UDP-galaktozy. Gen *exo5* koduje dehydrogenazę UDP-glukozy odpowiedzialną za przekształcenie UDP-glukozy w kwas UDP-glukuronowy [Jumas-Bilak i wsp., 1998, Król i wsp., 2005, Sanchez-Andujar i wsp., 1997]. Gen *pssA* koduje białko uczestniczące w pierwszym etapie syntezy ośmiocukrowej podjednostki. Białko to posiada aktywność glukozylotransferazy i przenosi glukozę na lipidowy nośnik. Gen *pssA* jest bardzo konserwatywny, wykryto go u obu biowarów *R. leguminosarum* a także u *R. etli* i *R. gallicum*. Mutacje w tym genie powodują całkowite zahamowanie produkcji EPS [Janczarek i wsp., 2009]. W regionie Pss-I znajdują się również geny odpowiedzialne za kolejne etapy syntezy

egzopolisacharydu. Region ten obejmuje obszar o wielkości 35 kbp i zawiera ponad 20 genów. Jest on również jednym z najbardziej konserwatywnych fragmentów zsekwencjonowanych u *R. leguminosarum*. Przyłączenie drugiej reszty cukrowej do nowotworzonej podjednostki EPS jest katalizowane przez glukuronozyl- β -1,4-glukozylotransferazę, enzym kodowany przez region *pssD/pssE*. Mutacje w tych genach powodują zahamowanie syntezy egzopolisacharydu, co wpływa kolejno na zahamowanie symbiotycznych zdolności mikrosymbionta. W trzecim etapie syntezy EPS zaangażowana jest glukuronozyl- β -1,4-glukozylotransferaza kodowana przez gen *pssC*. Enzymy biorące udział w kolejnych etapach syntezy nie zostały jeszcze scharakteryzowane, mimo to istnieje przypuszczenie, że niektóre z genów zlokalizowanych w klastrze Pss-I kodują glukozylotransferazy, które są w ten proces włączone. Za przyłączanie podstawników niecukrowych są prawdopodobnie odpowiedzialne produkty genów *pssR* i *pssM*.

Polimeryzacja i eksport egzopolisacharydu na zewnątrz komórki są przeprowadzane przez system sekrecji składający się z 3 białek kodowanych przez geny *pssT*, *pssN* i *pssP*. Białko PssP wykazuje podobieństwo do białka ExoP *S. meliloti*. PssT to białko zakotwiczone w błonie wewnętrznej, o strukturze zbliżonej do białek należących do szlaku Wzy. Natomiast PssN to lipoproteina związana z błoną zewnętrzną [Ivashina i wsp., 1994, Król i wsp., 2007]. Szczegóły szlaku syntezy egzopolisacharydu *R. leguminosarum* przedstawione zostały na **rycinie 28**.



Ryc. 28. Szlak biosyntezy egzopolisacharydu *R. leguminosarum* [Na podstawie Skorupska i wsp., 2011].

I.3.4.2.3 Regulacja biosyntezy egzopolisacharydu

I.3.4.2.3.1 Regulacja biosyntezy u *S. meliloti*

Biosynteza egzopolisacharydu jest procesem podlegającym ścisłej regulacji zarówno na poziomie transkrypcyjnym jak i posttranskrypcyjnym. Mechanizmy regulacji zostały najlepiej poznane u *S. meliloti* i u *R. leguminosarum*. Na skład i ilość produkowanego egzopolisacharydu mają wpływ także warunki hodowli takie jak źródło węgla i wiek hodowli [Breedveld i wsp., 1993, Quelas J.I. i wsp., 2006]. Jednym z ważniejszych czynników stymulujących produkcję EPS są warunki środowiskowe takie jak osmolarność środowiska, dostępność związków siarki, azotu i fosforu czy też obecność flawonoidów [Leigh i Walker, 1994].

Geny regulatorowe syntezy EPS I i EPS II *S. meliloti* zlokalizowane zostały na dwóch replikonach. Na chromosomie wyróżniono 7 genów tj. *mucR*, *exoR*, *exoS*, *exoD*, *expR*, *syrM* i *phoB*. Natomiast wśród genów zlokalizowanych na plazmidzie pSymB wyróżniono trzy geny: *exsB*, *exoX* i *wggR*. Większość białek kodowanych przez te geny pełni funkcje represorów. Do represorów syntezy EPS I zaliczono produkty genów *exoR*, *exoS*, *exoX* i *exsB*. Natomiast produkt genu *mucR* jest

represorem syntezy EPS II. Białka SyrM i PhoB są składnikami regulacji pozytywnej w produkcji EPS I i EPS II. Białko MucR zdaje się dodatkowo pełnić rolę nadrzędnej cząstki regulatorowej obu szlaków syntezy EPS [Becker i wsp., 1995, Keller i wsp., 1995, Bahlawane i wsp., 2008, Rüberg i wsp., 1999].

I.3.4.2.4 Regulacja biosyntezy bursztynyloglikanu (EPS I)

Ograniczone źródła siarki i azotu bądź też wysokie stężenie fosforu oraz stres osmotyczny stanowią czynniki stymulujące produkcję EPS I. Z drugiej strony głód fosforanowy jest induktorem produkcji EPS II. Poziom fosforu w podłożu jest czynnikiem warunkującym, który z egzopolisacharydów jest produkowany. Ciśnienie osmotyczne wpływa na stopień polimeryzacji EPS. Niskie ciśnienie osmotyczne skutkuje produkcją LMW EPS I podczas gdy synteza frakcji HMW jest stymulowana przez wzrost ciśnienia osmotycznego [Mendrygal i González, 2000].

Synteza bursztynyloglikanu (EPS I) jest zwiększana podczas głodu azotowego. Proces ten regulowany jest poprzez działanie systemu *exoR* i *exoS*. Dwa chromosomalne geny *exoR* i *exoS* pełnią rolę negatywnych regulatorów syntezy bursztynyloglikanu. Wykazano że mutacje w tych genach powodują nadprodukcję bursztynyloglikanu. ExoR i ExoS regulują poziom ekspresji genów *exoA*, *exoP*, *exoY* i *exoQ-phoA*. Mutant *exoR* wytwarza brodawki nieefektywne, natomiast u mutantu *exoS* nie stwierdzono zahamowania procesu symbiozy. Białko ExoS strukturalnie jest bardzo zbliżone do białka ChvG *Agrobacterium tumefaciens* pełniącego funkcję sensora w systemach regulatorowych. ExoS jest homodimerem zlokalizowanym w błonie wewnętrznej, którego domena sensorowa skierowana ku peryplazmie odpowiedzialna jest za rozpoznawanie sygnałów płynących ze środowiska. Wraz z białkiem ChvI tworzy dwuskładnikowy system regulacji syntezy EPS I [Reed i wsp., 1991, Ozga i wsp., 1994, Cheng i Walker 1998].

Gen *exsB* jest kolejnym negatywnym regulatorem biosyntezy EPS I. Zlokalizowany został na megaplazmidzie pSymB w regionie genów *exo*. Mutanty defektywne w produkcji białka ExsB produkują trzykrotnie większą ilość bursztynyloglikanu w porównaniu do szczepu dzikiego. Wysoka liczba kopii tego genu powoduje zmniejszenie produkcji EPS o 80% [Becker i wsp., 1995].

Kolejnym genem należącym do systemu negatywnej regulacji jest *exoX*. Gen zlokalizowany jest na megaplazmidzie w klastrze *exo/exs*. ExoX jest małym białkiem

błonowym wykazującym duże podobieństwo do wcześniej scharakteryzowanego białka PsiA występującego u *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* oraz u *Rhizobium* sp. NGR 234. U mutantu obserwuje się 3-krotne zwiększenie produkcji EPS I, natomiast w przypadku zwiększonej liczby kopii genu stwierdzono zahamowanie produkcji polimeru [Reed i Walker, 1991, Zhan i Leigh, 1990].

SyrM to gen zaangażowany w szlaki produkcji EPS oraz produkcję czynników Nod. Białko *SyrM* wykazuje podobieństwo do białek *NodD* i razem z nimi należy do rodziny *LysR* będących aktywatorami transkrypcji. *SyrM* aktywuje transkrypcję genów *nodD3* i *syrA*. W przypadku niedoborów azotu *SyrM* wraz z *NtrC* pełni funkcje pozytywnych regulatorów produkcji bursztynyloglikanu. Mutacje w tych dwóch genach skutkują zmniejszeniem produkcji EPS I. *SyrM* pośrednio, poprzez indukcję ekspresji *SyrA*, powoduje zwiększenie transkrypcji genów *exoF* i *exoP*. Dodatkowo jest induktorem transkrypcji genu *exoP*. Białko to jest również zaangażowane w determinację długości powstającego polimeru cukrowego.

Kolejnym genem zaangażowanym w proces biosyntezy EPS I jest *exoD*. Jego dokładna rola nie została poznana, wiadomo jednak, że mutanty *exoD* produkują zmniejszone ilości EPS I, co wskazuje na to, że pełni on funkcje regulatora pozytywnego. Wykazano także, że mutanty są wrażliwe na warunki alkaliczne środowiska [Reed i Walker, 1991].

Gen *exoK* ma szczególne znaczenie wśród wszystkich genów zlokalizowanych w regionie *exo/exs*. Jego poziom ekspresji jest regulowany działaniem, co najmniej 3 innych białek regulatorowych tj. *MucR*, *SyrM* i *ExsD*. Wskazuje to na jego istotną rolę w procesie biosyntezy bursztynyloglikanu [Janczarek, 2011]. Wśród białek regulatorowych *S. meliloti* *MucR* wydaje się odgrywać kluczową rolę w pozytywnej regulacji syntezy EPS I. Mutacje w regionie genu skutkują wysokim poziomem produkcji EPS II, ale również znaczącym spadkiem syntezy frakcji LMW EPS I. Białko to posiada motyw palca cynkowego typu C₂H₂ i wpływa na transkrypcję genów *exoH*, *exoX* i *exoY* poprzez wiązanie się do sekwencji palindromowej znajdującej się w regionie promotorowym tych genów. *MucR* jest również autorepresorem – reguluje poziom własnej ekspresji [Keller i wsp., 1995, Bertram-Drogatz i wsp., 1997, 1998].

Ostatnio został scharakteryzowany nowy, dwuskładnikowy system regulacyjny. Białka *EmmA*, *EmmB* i *EmmC* będące jego składnikami wydają się odgrywać kluczową rolę w adaptacji i przeżywalności *S. meliloti* w zmiennym środowisku. *EmmA* wydzielane jest do podłoża, *EmmB* to białko sensorowe,

natomiast EmmC to efektor. Geny *emmABC* odpowiadają za produkcję EPS I, ruchliwość bakterii oraz adaptację do warunków stresowych. Stwierdzono, że mutacje w tych genach powodują defekty ruchliwości, zwiększoną syntezę bursztynyloglikanu oraz zmniejszenie tolerancji na stres, co w konsekwencji powoduje utratę zdolności symbiotycznych bakterii [Morris i González, 2009].

I.3.4.2.5 Regulacja biosyntezy galaktoglikanu (EPS II)

Oprócz azotu, fosfor jest kolejnym limitującym czynnikiem środowiska, który odgrywa istotną rolę w regulacji syntezy EPS u *S. meliloti*. Synteza EPS I jest indukowana w obecności wysokiego stężenia fosforanów (ponad 10mM), zaś niski poziom fosforu stymuluje wytwarzanie EPS II. Produkcja EPS II jest również obserwowana w przypadku wystąpienia mutacji w genach regulatorowych *expR* lub *mucR* [Djordjevic i wsp., 1987].

W przypadku *S. meliloti* ilość związków fosforu w podłożu jest czynnikiem regulującym ekspresję wielu genów zaangażowanych w syntezę EPS II. Wpływa ono na działanie dwuskładnikowego systemu regulacji tworzonego przez białka PhoB i PhoR. Białko PhoB jest pozytywnym regulatorem wpływającym na ekspresję genów należących do regulonu Pho. Fosforylacja PhoB aktywuje transkrypcję kolejnych genów odpowiadających za regulację biosyntezy EPS II. Wśród genów należących do regulonu Pho można wyróżnić geny: *wgaA*, *wggR*, *wgdA* i *wgeA*. Ich dokładna rola nie została jeszcze poznana wiadomo jednak że są one zaangażowane w syntezę galaktoglikanu i poziom ekspresji tych genów jest znacząco podwyższony w komórkach narażonych na niedobory fosforu [Becker i wsp., 1997, Bahlawane i wsp., 2008, Rüberg i wsp., 1999, Summers i wsp., 1999]. Synteza EPS jest również regulowana przez dwa inne białka: WggR (ExpG) i MucR. WggR jest pozytywnym regulatorem syntezy EPS II, którego gen zlokalizowany jest na megaplazmidzie pSymB. Białko WggR należy do rodziny białek MarR będących regulatorami transkrypcyjnymi zawierającymi motyw helisa-skręt-helisa. Jako induktor genów *wgaA*, *wggR/wgdA* i *wgeA* przyłącza się w obrębie palindromowej sekwencji regulatorowej i aktywuje ich ekspresję. W przypadku mutantów z delecją w genie *wggR* obserwowany jest znaczący spadek syntezy EPS II [Krol i Becker, 2004, Yuan, 2006, Quester i Becker, 2004]. Białko MucR jest represorem biosyntezy EPS II. Mutacje w genie *mucR* skutkują wyższym poziomem produkcji EPS II, podczas gdy

EPS I produkowany jest w bardzo małych ilościach. Strukturalnie MucR jest bardzo podobny do białka RosR będącego negatywnym regulatorem genów *vir*, niezbędnych do produkcji burszynyloglikanu u *A. tumefaciens*. MucR podobnie jak RosR zawiera motyw palca cynkowego typu C₂H₂. MucR jako represor podczas transkrypcji łączy się z powtórzonym motywem Ros-box zlokalizowanym powyżej genów *exoH*, *exoX* i *exoY* hamując ich ekspresję [Djordjevic i wsp., 1987, Skorupska i wsp., 2006].

I.3.4.2.6 Regulacja biosyntezy u *R. leguminosarum*

Regulacja biosyntezy egzopolisacharydu *R. leguminosarum* nie została tak dobrze poznana jak u *S. meliloti*. Poznano jednak kilka genów zaangażowanych w ten proces. Dwa geny regulatorowe tj. *psr* (ang. *polysaccharide restoration*) i *psi* (ang. *polysaccharide inhibition*) zostały zlokalizowane na pSym w pobliżu regionu *nod-nif*. Produkt genu *psiA* jest inhibitorem syntezy egzopolisacharydu natomiast *psrA* koduje regulator transkrypcyjny należący do białek zawierających motyw helisa-skręt-helisa. Stwierdzono, że mutant *psiA* nie jest zdolny do tworzenia efektywnych brodawek. Dodatkowe kopie genu powodują utratę zdolności symbiotycznych oraz hamują produkcję EPS u *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* i bv. *viciae*. Inhibitorowy wpływ dodatkowych kopii *psiA* może być zniesiony w przypadku obecności dodatkowych kopii genów *psrA* i *pssA* kodujących galaktozylo-IP-transferazę [Borthakur i Johnston, 1987, Latchford i wsp., 1991, Mimmack i wsp., 1994].

PsiA to białko błonowe o wielkości 10 kDa wykazujące znaczne podobieństwo do ExoX *S. meliloti*. Oba to małe hydrofobowe białka zlokalizowane są po wewnętrznej stronie membrany. Sugeruje się, że białka PsiA/ExoX funkcjonują, jako represory genów *pssA/exoY*. Inny z proponowanych modeli zakłada, że białka PsiA/ExoX i PssA/ExoY tworzą kompleks regulatorowy, który w momencie połączenia hamuje proces biosyntezy egzopolisacharydu [Mimmack i wsp., 1994].

Białko PsrA należy do rodziny regulatorów transkrypcyjnych zawierających motyw łączący się z DNA (helisa-skręt-helisa). Mutant *psrA* produkuje normalne ilości EPS i indukuje tworzenie efektywnych brodawek. Natomiast szczepy zawierające dodatkowe kopie genu produkują brodawki nieefektywne [Borthakur i Johnston, 1987].

Kolejną grupą genów zaangażowanych w regulację biosyntezy u *R. leguminosarum* są geny zlokalizowane na chromosomie. Zaliczamy do nich geny *exoR*, *pssB*, *rosR* i *expR* kodujące inhibitory transkrypcji.

RosR to bardzo konserwatywny gen, występujący u wszystkich biowarów *R. leguminosarum* a także u *R. etli* i *R. galici*. Wykazuje znaczne podobieństwo do genu *mucR* *S. meliloti* i do *rosR* występującego u *A. tumefaciens*. Koduje regulator transkrypcyjny należący do rodziny białek Ros/MucR zawierający motyw palca cynkowego. Białko RosR uczestniczy w regulacji wielu zróżnicowanych genów w tym genów zaangażowanych w syntezę i modyfikacje powierzchniowych polisacharydów (*exoB*, *prsD*, *pssK* i *plyA*). Mutant *rosR* formuje zmienione, wypukłe kolonie, co wynika z hydrofobowości powierzchni komórki bakteryjnej [Bittinger i wsp., 1997, Mimmack i wsp., 1994, Borthakur i Johnston, 1987, Reeve i wsp., 1997, Janczarek i wsp., 1999].

Obecność genu *pssB* stwierdzono u *R. leguminosarum* bv. *viciae* oraz u bv. *trifolii*. Mutanty produkują zwiększone ilości EPS i indukują powstawanie nieefektywnych brodawek. Dodatkowe kopie genu redukują poziom produkcji EPS. Białko PssB jest homologiczne do białek należących do rodziny IMPaz (inozytolo - monofosfataz) obecnych u wielu prokariotów i eukariotów. Rola IMPazy jest niejasna, ale sugeruje się, że może być istotna w przeżywalności i konkurencyjności bakterii w ryzosferze [Janczarek i Skorupska, 2007].

I.3.4.3 Rola EPS w symbiozie

Produkcja dużych ilości egzopolisacharydu jest jedną z charakterystycznych cech bakterii symbiotycznych. Jedną z najważniejszych funkcji egzopolisacharydów jest ochrona bakterii przed stresem środowiskowych. Egzopolisacharydy uczestniczą w początkowych etapach zawiązywania symbiozy tłumiąc reakcje obronne roślin. Pomagają w uwalnianiu bakterii z nici infekcyjnej oraz umożliwiają rozwój bakteroidów. EPS może wzmacniać wiązanie bakterii do rosnącej nici infekcyjnej, co jest kluczowe w początkowych etapach symbiozy. Wyniki badań wskazują na to, że LMW EPS może pełnić rolę cząsteczki sygnałnej podczas procesu inwazji roślin. Rośliny wykształciły wiele zróżnicowanych mechanizmów obronnych zapobiegających wniknięciu patogenu. Mechanizmy te podzielono na dwie główne grupy. Pierwsza to lokalne odpowiedzi, do których zaliczamy reakcje nadwrażliwości

(ang. *hypersensitive response* - HR). W trakcie kontaktu z patogenem następuje wzrost ilości aktywnych form tlenu (ang. *Active Oxygen Species* – AOS) i wybuch tlenowy. Reakcje te prowadzą do śmierci komórek roślinnych bezpośrednio sąsiadujących z bakteriami. Hamuje to dalsze rozprzestrzenianie się patogenu. Reakcje lokalne mogą też polegać na działaniu metabolitów wtórnych np. fitoaleksyny oraz białek obronnych [Crespi i Gálvez, 2000, Maassen i Hennig, 2001, Jakubowska i Kowalczyk, 1998]. Drugim sposobem obrony są reakcje systemowe. Wśród nich wymienić można systemową odporność nabytą (ang. *systematic acquired resistance* – SAR) oraz systemową odporność indukowaną (ang. *induced systemic resistance* – ISR). Mechanizmy nabyte są następstwem działania aktywnych form tlenu. W ten sposób wzmocnione zostaje działanie systemu obronnego w niezainfekowanych częściach rośliny. System immunologiczny roślin oparty jest na działaniu tzw. białek związanych z patogenezą (ang. *Pathogens related proteins*), których induktorem jest kwas salicylowy. Systemiczna odporność indukowana jest również uzależniona od obecności pochodzącego od patogenu bodźca – elicytora. Częsteczkami sygnałnymi są kwas jasmonowy i etylen. W wyniku tej reakcji następuje akumulacja fenoli, wzrost ilości flawonoidów oraz synteza licznych białek związanych z patogenezą. W przypadku rozpoznania przez roślinę mikrosymbionta następuje tzw. pasywne ominięcie, czyli zahamowanie mechanizmów obronnych. [Crespi i Gálvez, 2000 Schultze i Kondorosi, 1998, Wielbo i Skorupska, 2003].

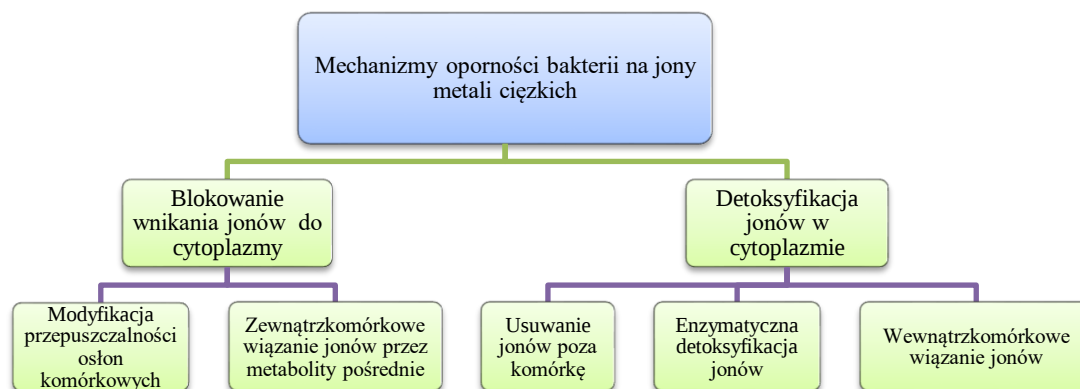
Mutanty *S. meliloti* nieprodukujące EPS powodują powstawanie niezainfekowanych pseudobrodawek na korzeniach i indukują odpowiedź obronną u *Medicago sativa*. Zaobserwowano histochemiczne zmiany w ścianie komórkowej pseudobrodawek tj. zwiększenie grubości i inkrustacje komórek korowych pseudobrodawek. Ponadto ściany komórkowe zawierały kalozę - polisacharyd roślinny należący do β -glukanów, wydzielany w miejscach zranienia roślin. Dodatkowo w pseudobrodawkach pojawiała się zwiększona ilość związków fenolowych. Dodanie niewielkiej ilości LMW EPS I umożliwiło wniknięcie mutantów *S. meliloti* do gospodarza roślinnego. Wskazuje to na istotną rolę egzopolisacharydu w tłumieniu działania systemu obronnego roślin [Cheng i Walker, 1998, van Workum i wsp., 1998, Dazzo i wsp., 1984, Smit i wsp, 1992].

W przypadku symbiozy pomiędzy koniczyną a *R. leguminosarum* bv. *trifolii* u mutantów niezdolnych do syntezy EPS również stwierdzono tworzenie pseudobrodawek. Ryzobia nieprodukujące EPS indukowały powstawanie pustych

brodawek, martwicę komórek roślinnych oraz zgrubienia tkanek roślinnych, co wskazywało na występowanie reakcji obronnych u gospodarza roślinnego. W przypadku mutantów *exo⁻* produkujących niewielkie ilości egzopolisacharydu reakcja obronna rośliny nie była tak mocna i obserwowano nawet uwalnianie bakterii z nici infekcyjnych. Nie znajdowano jednak bakteroidów zdolnych do wiązania azotu. Wskazuje to na rolę EPS w maskowaniu bakteryjnych antygenów podczas zakażenia brodawek. W przypadku symbiozy *Bradyrhizobium* z soją mutanty *exoB* produkują strukturalnie zmieniony EPS indukując powstawanie brodawek ze zwiększoną ilością fitoaleksyny, kumulującej się również podczas infekcji soi przez zjadliwy szczep – *Phytophthora megasperme*. W przypadku symbiozy *Azorhizobium caulinodans* z *Sesbania rostrata* mutanty defektywne w produkcji EPS są blokowane przez roślinę na wczesnych etapach infekcji. Wnioskuje się, że EPS jest niezbędny w początkach infekcji jako bariera dyfuzyjna w ochronie bakterii przed toksycznym działaniem H₂O₂ produkowanym przez roślinnego gospodarza [van Rhijn i wsp., 2001].

I.3.4.4 Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie

Bakterie są organizmami stale narażonymi na niekorzystne zmiany środowiskowe. Jednym z zagrożeń spowodowanym wzrostem industrializacji jest toksyczność metali ciężkich, których ilość w środowisku stale rośnie. Metale ciężkie stanowią jeden z najważniejszych czynników ograniczających wzrost, aktywność oraz różnorodność gatunkową zarówno mikroorganizmów jak i roślin. Jednocześnie bakterie odgrywają istotną rolę w cyklach biogeochemicznych metali. Bakterie rozwinęły różne mechanizmy oporności na metale ciężkie. Drobnoustroje mogą zwiększać rozpuszczalność, zmieniać stopień utlenienia oraz formę jonów metali poprzez produkcję organicznych ligandów, wydzielanie metabolitów oraz sideroforów zdolnych do wiązania metali, desorpcję na drodze wymiany z innymi związkami czy też sorpcję na egzopolisacharydach (**Ryc. 29**). Mechanizmy te pozwalają nie tylko zwiększyć zdolności adaptacyjne bakterii, ale umożliwiają wykorzystanie mikroorganizmów do procesów bioremediacji. Z tego względu rola ryzosfery i procesy w niej zachodzące zdają się być niezwykle istotne [Clemens S. 2001, Słomka A. i wsp., 2011].



Ryc. 29. Mechanizmy oporności bakterii na toksyczne działanie jonów metali ciężkich [Na podstawie Oleńska i Małek, 2013].

Do mechanizmów oporności bakterii na metale ciężkie zaliczamy:

1. Modyfikacje osłon komórkowych uniemożliwiające wnikanie jonów metali do cytoplazmy,
2. Usuwanie toksycznych jonów metali na zewnątrz komórki,
3. Enzymatyczną detoksykację jonów metali,
4. Pozakomórkowe wiązanie jonów metali przez metabolity bakterii,
5. Wewnątrzkomórkowe wiązanie jonów metali [Mathema i wsp, 2011, Oleńska i Małek, 2013].

Działanie pierwszego mechanizmu polega na związaniu jonów metali z elementami strukturalnymi ścian komórkowych i otoczek bakteryjnych. W tego typu oddziaływaniach biorą udział składniki błon komórkowych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Jest to system niespecyficzny substratowo i ograniczony ze względu na szybkość wysycenia grup funkcyjnych związków chemicznych wchodzących w skład struktur powierzchniowych. Jony metali mogą być wiązane zarówno poprzez oddziaływania z otoczką polisacharydową jak również w przestrzeni peryplazmatycznej [Bruins i wsp, 2000, Mergeay, 1991].

Drugi mechanizm ochrony przed toksycznymi metalami jest oparty na transporcie jonów poza komórkę bakteryjną przy użyciu specyficznych pomp białkowych. Jest to system kosztowny energetycznie mimo to szeroko rozpowszechniony. Wśród mikroorganizmów wyróżniono siedem typów pomp odpowiedzialnych za usuwanie jonów metali ciężkich na zewnątrz komórki. Dwie pierwsze pompy należą do ATP-az

i są to ATP-aza ABC oraz ATP-aza typu P. Kolejne trzy typy pomp to chemoosmotyczne antyportery jon/ H^+ . Zaliczamy do nich nadrodzinę białek MFS, rodzinę białek CzcCBA oraz rodzinę białek CDF. Pozostałe dwie rodziny - czyli system transportu chromu ChrA i transporter ArsB dla arsenu (III) i antymonu (II) są wysoce specyficzne [Silver i Phung, 1996, Pao i wsp., 1998, Legatzki i wsp., 2003, Nies, 2003].

Trzeci mechanizm jest oparty na inaktywacji poprzez enzymatyczną transformację toksycznych jonów w postać mniej toksyczną, nieprzyswajalną bądź lotną. Przykładem tego typu procesu jest system oporności na rtęć (II) warunkowany przez operon *mer* występujący u bakterii Gram-dodatnich tj. np. *S. aureus*, *Bacillus sp.* oraz u Gram-ujemnych jak np. *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Serratia marcescens*. Jego działanie opiera się na przekształceniu toksycznej formy Hg^{2+} w formę mniej toksyczną Hg^0 przy udziale reduktazy rtęciowej Hg^{2+} . Tak zredukowany pierwiastek jest usuwany poza komórkę [Valls i de Lorenzo, 2002].

Czwarty mechanizm polega na pozakomórkowym wiązaniu jonów metali przez metabolity takie jak np. siderofory, lipopolisacharydy czy też egzopolisacharydy. Powierzchniowe wiązanie metali jest uzależnione głównie od składu chemicznego osłon, a w szczególności od rodzaju i liczebności dostępnych ligandów, ich rozmieszczenia przestrzennego a także powinowactwa do metali. Anionowy charakter struktur powierzchniowych sprzyja adsorpcji jonowymiennej, przyciąganiu elektrostatycznemu oraz reakcjom chemicznym.

Ostatni, piąty mechanizm jest związany z cytoplazmatycznym chelatowaniem metali przy udziale peptydów niskocząsteczkowych takich jak na przykład metaloproteiny. Dzięki związaniu jonów stają się one mniej reaktywne, a w konsekwencji mniej szkodliwe dla komórek. Tego typu mechanizm wykryto np. u *Synechococcus sp.* [Ji G. i Silver, 1995].

I.3.4.5 Właściwości sorpcyjne egzopolisacharydu

Egzopolisacharydy bakteryjne to najczęściej wielkocząsteczkowe heteropolimery o ujemnym ładunku elektrycznym. Są to cząsteczki polianionowe ze względu na występowanie w ich strukturze licznych cząstek kwasów uronowych oraz reszt pirogronian czy bursztynianu. Dodatkowo anionowy charakter EPS może być zwiększony przez obecność nieorganicznych podstawników tj. siarczany i fosforany.

Ładunek egzopolisacharydu ma znaczący wpływ na jego właściwości sorpcyjne. Przyłączanie jonów metali ciężkich oraz innych jonów przebiega najczęściej na drodze interakcji elektrostatycznej z anionowymi grupami [Sutherland, 2001].

Ze względu na swoje właściwości sorpcyjne bakteryjne egzopolisacharydy są coraz częściej wykorzystywane w celach bioremediacji zanieczyszczonych środowisk. W ten sposób neutralizowane są zarówno metale ciężkie jak i inne substancje toksyczne.

Przykładem mikroorganizmu zdolnego do redukcji chromu jest *Ochrobactrum intermedium* SDCr-5. Szczep ten jest zdolny rosnąć w środowisku zawierającym wysokie stężenia jonów metali ciężkich tj. chrom, miedź, kobalt, mangan czy też nikiel. Badania wykazały, że szczep ten redukuje jony Cr^{6+} do mniej toksycznych jonów Cr^{3+} [Sultan i Hasnain, 2007].

Właściwości sorpcyjne egzopolisacharydu *O. anthropi* umożliwiają wzrost tych bakterii na podłożach zawierających wysokie stężenia jonów chromu, kadmu i miedzi. Potencjał sorpcyjny EPS jest ściśle uzależniony od odczynu środowiska, w którym następuje wzrost bakterii. Wykazano, że w przypadku Cr^{6+} sorpcja zachodziła najintensywniej w pH 2 i wynosiła 16 mg/l. W przypadku Cd^{2+} w pH 8 (30 mg/l) a w przypadku Cu^{2+} w pH 3 (125 mg/l) [Ozdemir i wsp., 2003].

Podobne właściwości wykazano u *Ochrobactrum lupini* DG-S-01. W tym przypadku szczep okazał się zdolny do biodegradacji insektycydu β -cypermetryny i produktu jego rozpadu kwasu 3-fenoksybenzoowego. Insektycyd jest zaliczany do związków o właściwościach neurotoksycznych. Związek ten jest również uważany za potencjalny karcynogen oraz za silny alergen [Chen i wsp., 2011]. Z tego też względu jego usuwanie ze środowiska jest tak ważne.

II CEL PRACY

Celem pracy było możliwie pełne scharakteryzowanie kolejno: łańcuchów O-swoistych LPS, glukanów oraz opisanie egzopolisacharydów (głównie pod względem ich zdolności sorpcyjnych w stosunku do metali ciężkich) syntetyzowanych przez bakterie symbiotycznie wiążące azot atmosferyczny i należących do gatunków *Ochrobactrum cytisi* i *Ochrobactrum lupini*.

Do badań wybrano dwa szczepy: ESC1^T oraz LUP21^T, które są określane mianem szczepów typowych odpowiednio dla gatunku *Ochrobactrum cytisi* i *Ochrobactrum lupini*

Szczegółowe cele pracy obejmują:

1. Ustalenie struktury chemicznej łańcuchów O-specyficznych lipopolisacharydów izolowanych z *O. lupini* LUP21^T i *O. cytisi* ESC1^T.
2. Ustalenie struktury chemicznej peryplazmatycznych glukanów *O. lupini* LUP21^T i *O. cytisi* ESC1^T
3. Analizy chemiczne i fizykochemiczne egzopolisacharydów *O. lupini* LUP21^T i *O. cytisi* ESC1^T
4. Badanie zdolności sorpcji jonów metali ciężkich (ołowiu oraz kadmu) przez egzopolisacharyd *O. lupini* LUP21^T.

III MATERIAŁY I METODY

III.1 MATERIAŁY

III.1.1 Szczepy bakteryjne

Badania prowadzone były na szczepach *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T i *Ochrobactrum lupini* LUP21^T pochodzących z Kolekcji Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu w Salamance (Hiszpania), które otrzymano dzięki uprzejmości prof. Marii Encarny Velázquez Pérez. Szczep *Ochrobactrum lupini* LUP21^T został wyizolowany i opisany po raz pierwszy przez Trujillo i wsp. [2005]. Natomiast szczep *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T wyizolowany i opisany został w przez zespół Zurdo-Pineiro [2007].

III.1.2 Podłoża hodowlane

Pożywka 79CA do hodowli bakterii glebowych [wg Vincent, 1970, zmodyfikowane]

Mannitol	10,0 g
Wyciąg drożdżowy „Difco”	1,0 g
Kwaśny hydrolyzat kazeiny	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Glicerofosforan wapnia	0,1 g
H ₂ O destylowana	do 1000 ml
pH	7,2 – 7,4

Podłoże zestalone agarem:

79CA płynne + 1,4 % (w/v) agaru

III.1.3 Bufory i odczynniki**Odczynniki do ekstrakcji LPS****Bufor L - do ekstrakcji LPS [wg. Reitz i wsp., 2000]**

Bufor fosforanowy	50 mM
EDTANa ₂ (wersenian dwusodowy)	5 mM
pH	7,0

Bufor fosforanowy (100 mM, pH 7,0)

Na ₂ HPO ₄	61 mg
NaH ₂ PO ₄	39 mg
H ₂ O dejon.	do 200 ml

Enzymy

Lizozym (Sigma)	6,0 mg/g.s.m (mg na 1 g suchej masy bakterii)
DNA-za (Sigma)	0,3 mg/g.s.m
RNA-za (Sigma)	0,3 mg/g.s.m
Proteinaza K (MP Biomedicals)	0,3 mg/g.s.m

Odczynniki do elektroforezy LPS w żelu poliakrylamidowym**Żel separujący 12,5 %**

Akrylamid/Bisakrylamid 30% /0,8%	6,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8.8	3,75 ml
H ₂ O dejonizowana	3,1 ml
5 % SDS	1,5 ml
10 % nadsiarczan amonu	97,5 µl
TEMED	9,75 µl

Żel zagęszczający 4 %

Akrylamid/Bisakrylamid 30% /0,8%	0,6 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	1,125 ml
H ₂ O dejon.	2,24 ml
5 % SDS	450 µl
10 % nadsiarczan amonu	75 µl
TEMED	7,5 µl

Bufor elektrodowy

SDS	2,5 g
Glicyna	28,8 g
Tris	6 g
H ₂ O dejon.	do 2000 ml
pH	8,4

Bufor do próbek

0,5M Tris-HCl, pH 6.8	3,5 ml
5 % SDS	0,5 ml
Glicerol	1 ml
Błękit bromofenolowy	4 mg

Odczynniki do oznaczania sorpcji metali ciężkich przez egzopolisacharyd**Triton X-100 – roztwór 5%**

5 ml Triton + 2ml 1M HCl + 93 ml H₂O

Ditizon – roztwór o stężeniu 5%:

$1,95 \times 10^{-4}$ M

W celu przygotowania 150 ml roztworu rozpuszczono 7,5 mg ditizonu w 75% etanolu

1M NaOH

4 g NaOH rozpuszczono w 50 ml H₂O, a następnie roztwór uzupełniono H₂O dejonizowaną do objętości 100 ml

Bufor boranowy

18,55 g kw. borowego
3,65 g wodorotlenku sodu
H₂O do 100 ml

Wodne roztwory soli metali ciężkich;

Roztwór zawierający jony kadmu (Cd^{+2}): siarczan kadmu $3\text{CdSO}_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$

Roztwór zawierający jony ołowiu (Pb^{+2}): octan ołowiawy $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$

III.2 METODY

III.2.1 Warunki hodowli podstawowej

Bakterie namnażano w podłożu płynnym 79CA w temperaturze 28°C. Hodowla była napowietrzana przez wytrząsanie (120 rpm). Hodowlę prowadzono dwuetapowo. Inokulum namnażano w objętości 100 ml przez 2-3 dni. Hodowla właściwa prowadzona była w objętości 900 ml przez 3 dni w dwunastu litrowych kolbach. Po tym okresie hodowle odwirowano: 15 minut, 8000 rpm w temp. 25°C na wirówce K15 firmy Sigma. W celu odmycia zewnątrzkomórkowych polisacharydów masę bakteryjną przepłukano dwukrotnie 0,5M NaCl następnie raz wodą destylowaną.

III.2.2 Izolacja lipopolisacharydu

Masę bakteryjną poddano delipidacji. W tym celu bakterie zawieszono w mieszaninie chloroform/metanol/woda w proporcji 1:2:0,8 (v/v/v) przy zachowaniu proporcji 50 mg mokrej masy bakteryjnej na 300 ml mieszaniny [Bligh-Dyer, 1959]. Zawiesinę intensywnie mieszano przez 2 h, a następnie odwirowano (30 min/5500rpm). Uzyskany po delipidacji osad bakteryjny przemyto dwukrotnie świeżo przygotowaną mieszaniną chloroform/metanol/woda w proporcji 1:2:0,8 (v/v/v). Supernatant wykorzystany został do izolacji peryplazmatycznych glukanów wg. procedury opisanej w punkcie III.2.5.

Delipidowaną masę bakteryjną (po odparowaniu metanolu i chloroformu na wyparce próżniowej w temperaturze 42°C) poddano degradacji enzymatycznej. W tym celu zawiesinę bakterii inkubowano z lizozymem (6 mg enzymu/g suchej masy, 4°C, 16h). Degradację kwasów nukleinowych przeprowadzono przy pomocy DNazy i RNazy (0,3 mg/g suchej masy, 37°C, 30 minut). Białka komórkowe trawiono przy pomocy proteinazy K, początkowo inkubując mieszaninę przez 18h w 37°C, a następnie w temperaturze 60°C przez 10 minut [Reitz i wsp., 2000].

Ekstrakcję lipopolisacharydu przeprowadzono 45% roztworem fenolu w wodzie w temperaturze 68°C wg. metody opisanej przez Westphal i Jann [1965] w modyfikacji Johnson'a i Perry'ego [1976]. Zbierano zarówno fazę wodną jak i fenolową. W celu wysycenia Na₂EDTA jonami dwuwartościowymi do roztworów dodano w nadmiarze MgSO₄. Fenol z poszczególnych faz usunięto poprzez wobec wody wodociągowej a następnie destylowanej.

Po dializie czyste preparaty zagęszczano na wyparce próżniowej w temperaturze nieprzekraczającej 68°C. Zagęszczone dializaty, po wstępnym odwirowaniu (30 min, 5500rpm), poddano ultrawirowaniu (105 tys. rpm, 4°C, 4h). Czyste preparaty LPS (osady) po zawieszeniu w niewielkiej ilości wody liofilizowano.

III.2.3 Izolacja polisacharydu O-swoistego i lipidu A

Lipopolisacharyd (roztwór 5 mg/ml) poddano łagodnej kwaśnej hydrolizie 1% kwasem octowym (2h, 100°C). Do mieszaniny reakcyjnej dodano chloroformu i metanolu w takich ilościach, aby otrzymać końcową proporcję chloroform/metanol/woda 2:2:1,8 (v/v/v). Fazy rozdzielono przez wirowanie (15 min, 5000rpm). Frakcja górna (hydrofilna) zawierała degradowany polisacharyd (dgPS), natomiast frakcja dolna (organiczna) - lipid A. Obie frakcje doczyszczono dwukrotnie poprzez ponowne dodanie odpowiednio świeżo przygotowanej fazy górnej do fazy organicznej i fazy dolnej do fazy wodnej. Połączone frakcje organiczne wysuszono na wyparce próżniowej i zawieszono w roztworze chloroform/metanol (3/1, v/v). Frakcję hydrofilną po wysuszeniu zawieszono w wodzie i liofilizowano.

Degradowane polisacharydy frakcjonowano metodą chromatografii sitowej przy użyciu 1% kw. octowego jako eluentu. Materiał rozdzielano na kolumnie o wymiarach 1,6 × 60 cm wypełnionej złożem Sephadex G50 fine.

III.2.4 Izolacja i oczyszczanie egzopolisacharydów

Hodowle przeprowadzono 2-etapowo w pożywce płynnej 79CA, wzbogaconej bursztynianem sodu. Pierwszy etap – hodowla inokulum z odmłodzonych bakterii w obj. 100 ml (28°C, 48h) z napowietrzaniem przez wytrząsanie (100 rpm). Drugi etap hodowli - w objętości 1000 ml w 28°C przez 72 h. Płyn pohodowlany otrzymano przez odwirowanie masy bakteryjnej (9000 rpm, 25-30 min). Uzyskany supernatant zagęszczono na wyparce do objętości 500 ml, dodano fenolu w celu zapobiegania wzrostu bakterii i poddano dializie w celu usunięcia soli. Kolejno supernatant zmieszano z etanolem w stosunku 1:3 (v/v) (250 ml zagęszczonego płynu pohodowlanego + 750 ml alkoholu). Mieszaninę wymrażano przez noc w temperaturze -20°C w celu całkowitego wytrącenia polisacharydów. Wytrącony materiał odwirowano (4°C, 25 min, 9000 rpm), wysuszono, zawieszono w niewielkiej ilości wody i liofilizowano.

W celu określenia składu cukrowego EPS poddano hydrolizie w 2M TFA (4h, 100°C). Po wysuszeniu preparat poddano *N*-acetylacji, redukcji w 1M amoniaku przy użyciu borowodoru (lub borodeuteru). Po zakwaszeniu kwasem octowym i usunięciu boranów przeprowadzono peracetylację i ekstrakcję do chloroformu.

W kolejnym etapie preparaty egzopolisacharydowe poddano analizie metylacyjnej wg. metody Hakomori [1964]. Otrzymane pochodne poli- i oligosacharydów ekstrahowano do chloroformu.

W celu degradacji zmetylowanych polisacharydów materiał poddano hydrolizie w 2M TFA, 100°C, 4h (całkowita hydroliza preparatu).

Po wysuszeniu (w eksykatorze) preparaty rozpuszczono w mieszaninie metanol/woda 1:1 (v/v) i poddano redukcji NaBD₄ (45°C, 2h). Po usunięciu boranów materiał poddano acetylacji bezwodnikiem octowym i pirydyną (1:1 v/v). Po ekstrakcji otrzymane per metylowane octany alditoli analizowano metodą GC-MS.

Rozdział na kolumnie Sepharose 6B-CL

Na kolumnę o wymiarach 90×0,7 cm wypełnioną Sepharose 6B-CL i przemytą 0,7% Na₂SO₄ naniesiono 5 mg preparatu EPS. Szybkość przepływu dla preparatu *O. lupini* wynosiła 8,5 ml/godz., natomiast dla *O. cytisi* 12,5 ml/godz. Eluent w drugim wypadku stanowił 1M NaOH. Zbierano frakcje o objętości 1,2 ml (40 kropel).

III.2.5 Izolacja i oczyszczanie peryplazmatycznych glukanów

Glukany uwolniono z przestrzeni peryplazmatycznej podczas procesu delipidacji masy komórkowej metodą Bligh-Dyer [1959]. W tym celu komórki bakteryjne zawieszone zostały w jednofazowym roztworze zawierającym chloroform, metanol i wodę w proporcji 1:2:0,8 (v/v/v) i intensywnie mieszano, a następnie układ uzupełniono odpowiednią objętością wody i chloroformu doprowadzając do wyodrębnienia się dwóch faz.

Fazy organiczną i wodną rozdzielano poprzez wirowanie (5000 rpm/15 min). Każdą z faz doczyszczono przez przemycie świeżo przygotowaną mieszaniną dwufazową poprzez dodanie odpowiedniej ilości czystej fazy organicznej do wodnego ekstraktu i odpowiedniej ilości fazy wodnej do ekstraktu organicznego. Faza wodna zawierała glukany, natomiast w fazie organicznej znalazły się fosfolipidy i inne związki lipidowe.

Uzyskane preparaty glukanów frakcjonowano przy użyciu chromatografii żelowej na kolumnie wypełnionej Sephadexem G50 fine (1,6cm×65cm). Materiał kolumny eluowano wodą zawierającą 0,15M octanu amonu oraz 7% propanolu (pH 7). Prędkość przepływu ustalono na 0,4 ml/min. Zbierano po 200 kropel/frakcję.

W poszczególnych frakcjach oznaczono ilość węglowodanów przy użyciu metody Dubois [Dubois i wsp., 1956].

III.2.6 Określenie składu cukrowego oraz wiązań w cząsteczkach glukanów

Preparaty glukanów hydrolizowano w 2M TFA (100°C, 4h) Hydrolizaty suszono i redukowano przy użyciu borodeuterku sodu. Po usunięciu boranów, próbki acetylowano bezwodnikiem octowym i pirydyną (1:1, v/v) w temperaturze 85°C przez 30 min. Otrzymane octany alditoli analizowano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas.

III.2.7 Analiza jakościowa i ilościowa węglowodanów

III.2.7.1 Oznaczanie cukrów obojętnych

Preparaty LPS hydrolizowano w roztworze 2M TFA w temp. 100°C przez 4h, następnie suszono w eksykatorze i poddawano *N*-acetylacji. Kolejno przeprowadzano redukcję przy użyciu NaBD₄ w 1M amoniaku w temperaturze pokojowej przez 18h. Następnie preparaty zakwaszano niewielką ilością lodowatego kwasu octowego, po czym ponownie suszono w eksykatorze nad P₂O₅ i KOH Borany usuwano stosując destylację z 5% kwasu octowego w metanolu. Próbkę acetylowano bezwodnikiem octowym i pirydyną (1:1 v/v; 85°C; 30 minut). Po odparowaniu w strumieniu azotu próbki ekstrahowano do chloroformu. Otrzymane octany alditoli analizowano przy użyciu metody GC-MS. Jako wzorca wewnętrznego użyto inozytolu (st. 1,062 µg/µl) do próbek dodawany w ilości 10 µl).

III.2.7.2 Określanie absolutnej konfiguracji cukrów [Gerwig i wsp, 1978]

Badane preparaty poddano metanolizie (1M HCl w metanolu) w temp 85°C przez 18h. Hydrolizaty wysuszono w strumieniu azotu po czym poddano butanolizie (1M HCl w *R*-(-)-2-butanolu, 100°C, 1h). Odczynnik usunięto przez odparowanie. Następnie przeprowadzono trimetylosilację wolnych grup hydroksylowych

butylowych glikozydów przez dodanie 30 µl TMSi. Preparaty inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej i analizowano metodą GC-MS. Według identycznego schematu przygotowano wzorce: L-fukozę, L-fukozę i D-galaktozaminę.

III.2.8 Analiza jakościowa i ilościowa kwasów tłuszczowych

Preparaty LPS poddano metanolizie (1M HCl/MeOH, 85°C, 18h). Metanol i HCl odparowano w strumieniu azotu, a degradowany materiał poddano ekstrakcji używając równych ilości chloroformu i wody. Fazę chloroformową wysuszono w strumieniu azotu i poddano trisililacji w celu derywatyzacji wolnych grup hydroksylowych w 3-hydroksykwasach. Otrzymane TMS-pochodne oraz metylowane estry kwasów tłuszczowych analizowano metodą GC-MS. Jako wzorca użyto kwasu heptadekanowego (17:0).

III.2.9 Inne metody chemiczne używane w analizie

III.2.9.1 Analiza metylacyjna wg Hakomori [1964]

Preparaty polisacharydów wstępnie poddano redukcji przy użyciu borowodorku lub borodeuterku, a po usunięciu boranów dokładnie wysuszono w eksykatorze. Tak przygotowane preparaty rozpuszczono w 0,4 ml DMSO (2h, intensywne mieszanie). Do klarownego roztworu dodano przy ciągłym mieszaniu 0,4 ml dimetylosulfinylokarbonianu sodu (DIMSYL-Na) i pozostawiono na mieszadle magnetycznym do wyklarowania. Do schłodzonej mieszaniny dodano 0,4 ml jodku metylu i inkubowano w temperaturze pokojowej przez noc. Czynniki metylujące usunięto przez odparowanie w strumieniu azotu. Po czym dodano kilka kropel 5% Na₂S₂O₄ do odbarwienia preparatu oraz 2 ml wody destylowanej. Kolejnym krokiem była ekstrakcja produktów metylacji - do chloroformu.

III.2.9.2 Degradacja zmetylowanych polisacharydów

Zmetylowany materiał podzielono na 3 części w celu przeprowadzenia hydrolizy w 2M TFA 0,5 ml 100°C 4h - (całkowita hydroliza preparatu). Po wysuszeniu preparaty rozpuszczono w mieszaninie metanol/woda (1:1 v/v) i zredukowano borodeuterkiem - NaBD₄ (2h, 45°C). Po redukcji nadmiar borodeuterku usunięto przy użyciu kilku kropel kw. octowego. Preparaty wysuszono. Borany usunięto poprzez odparowanie z roztworu 5% kw. octowym w metanolu i trzykrotne odparowanie z

metanolu. Acetylację przeprowadzono w pirydynie i bezwodniku octowym (85°C, 30min). Otrzymane permetylowane octany alditoli doczyszczono przez ekstrakcję w układzie chloroform/woda i analizowano metodą GC-MS.

III.2.9.3 Analiza cukrów i kwasów tłuszczowych w lipidzie A [wg Quei wsp., 2000]

Preparaty lipidów A poddano metanolizie (1M HCl/MeOH, 85°C, 18 h). Po schłodzeniu hydrolizatów, dodaniu ter-butanolu i po energicznym wytrząsaniu odparowano odczynniki w strumieniu azotu. Hydrolizaty poddano kolejno *N*-acetylacji w mieszaninie: bezwodny metanol/pirydyna/bezwodnik octowy (5:1:1, v/v/v). Reakcję prowadzono w temp. pokojowej, przez 18 h. Odczynniki odparowano. Następnym krokiem była trimetylosililacja wolnych grup hydroksylowych 3-hydroksykwasów przez dodanie TMSi oraz inkubacja preparatów (25°C, 30 min). Tak przygotowane próbki analizowano metodą GC-MS.

III.2.10 Metody instrumentalne

III.2.10.1 Elektroforeza LPS

- A) Elektroforeza LPS przeprowadzana była w 12,5% żelu poliakrylamidowym wg. procedury opisanej przez Aucken i Pitt [1993] (aparat firmy Bio-Rad). Środkiem denaturującym był SDS. Użyto prądu o natężeniu 25 mA. Żele barwiono metodą srebrową wg Tsai i Frasch [1989].
- B) Mikroekstrakcja LPS do SDS-PAGE przeprowadzona była wg. procedury Apicella [1994]. Hodowle bakterii odwirowano, osad przepłukano dwukrotnie w 0,5M NaCl. Do mokrej masy bakteryjnej dodawano mieszaniny lizujących. Lizę przeprowadzano w 100°C przez 10 minut. Po oziębieniu dodawano 10 µl roztworu proteiny K (wyjściowe stężenie 15 mg/ml), trawiono w 37°C przez 1h, a następnie w temp. pokojowej przez noc, w 60°C przez 1h. W ostatnim etapie przez 10 minut 100°C. Tak przygotowane próbki nanoszono na żel w ilości 3-5 µl. Materiały i bufony użyte w elektroforezie opisane zostały w rozdziale **III.1.3**.

III.2.10.2 Chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym

Rozdziały metodą chromatografii cienkowarstwowej przeprowadzono na płytkach aluminiowych (10 × 10 cm) pokrytych żelem krzemionkowym Si 60 F₂₅₄

(Merck). Metodę wykorzystano do rozdzielania peryplazmatycznych glukanów w solwencie: *n*-butanol / etanol / woda (5:5:4, v/v/v). Chromatogramy rozwijano trzykrotnie [Zevenhuizen i wsp., 1990]. Chromatogramy wywoływano metodą zwęglania poprzez spryskiwanie płytek 5 % H₂SO₄ w metanolu i ogrzewanie w 180°C przez 15 min. W celu określenia stosunków procentowych pomiędzy poszczególnymi składnikami mieszaniny peryplazmatycznych glukanów, wywołane chromatogramy skanowano i określano gęstość optyczną plam przy pomocy programu Bio-Profil v.99.01 (Image Analysis Software).

III.2.10.3 Chromatografia kolumnowa

Preparaty polisacharydowe frakcjonowano metodą sączenia molekularnego na kolumnach żelowych wypełnionych złożem:

- Sephadex G50 fine (1,6 × 60 cm) (Pharmacia)
- Sephadex CL-6B (0,7 × 90 cm) (Sigma)

Eluentem w przypadku degradowanego polisacharydu był 1 % kwas octowy. Prędkość przepływu wynosiła 24 ml/h. Objętość zbieranych frakcji - 1,2 ml (40 kropel/probówkę).

Egzopolisacharyd *O. cytisi* rozdzielano na kolumnie wypełnionej Sephadexem CL-6B. Eluent w tym wypadku stanowił 1M NaOH. Frakcje zbierano po 40 kropli/probówkę - 1,2 ml, szybkość przepływu wynosiła 12,5 ml/h. Solwentem w przypadku *O. lupini* była woda z 0,7% Na₂SO₄. Frakcje zbierano również po 1,2 ml, szybkość przepływu wynosiła 8,5 ml/h. Detekcję wycieku z kolumny prowadzono przy użyciu detektora refraktometrycznego 156 Refractive Index Detector (Beckman). Profile elucji rejestrowano przy pomocy integratora C-R6A Chromatopac (Shimadzu).

III.2.10.4 Chromatografia gazowa i spektrometria mas (GC-MS)

Chromatografia gazowo-cieczowa w połączeniu ze spektrometrią mas jest jedną z najbardziej użytecznych technik w badaniach strukturalnych bakteryjnych endotoksyn. Pozwala uzyskać informacje o składzie makrocząsteczek i jest dobrym wstępem do dalszych badań z zastosowaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego.

Oznaczenia chromatograficzne próbek prowadzone były na chromatografie gazowym Agilent Technologies (7890A) sprzężonym z selektywnym detektorem mas

(5975C XL EI / CI). Chromatograf był wyposażony w kolumnę kapilarną HP-5 MS (30 m × 0,25 mm). Stosowano hel jako gaz nośny.

Program temperaturowy do analizy octanów alditoli i kwasów tłuszczowych był następujący: 150°C przez 5 minut, liniowy wzrost do 310°C (5°C/min), temperatura końcowa 310°C przez 10 min.

Analizę częściowo metylowanych octanów alditoli prowadzono w następujących warunkach: 70°C przez 2 min, wzrost do 150°C (50°C/min), wzrost do 310°C (3°C/min).

III.2.10.5 Spektrometria MALDI-TOF

Spektrometria mas czasu przelotu z jonizacją przez desorpcję laserową w asyście matrycy (MALDI-TOF) wykonana była z wykorzystaniem aparatu Voyager-Elite (PE Biosystems).

Celem zwiększenia lotności, preparaty glukanów przeznaczone do analizy poddano metylacji. Próbkę rozpuszczano w mieszaninie chloroform/metanol (2:1, v/v).

Analizowane preparaty po rozpuszczeniu mieszano z matrycą: 50 % roztwór (v/v) kwasu gentyzynowego (DHB) w acetonitrylu i pozostawiano do wyschnięcia. Próbkę desorbowano z matrycy za pomocą lasera azotowego (λ 337 nm). Stosowano napięcie ekstrakcyjne 20 kV. Otrzymane spektra stanowią uśrednione wyniki z 256 impulsów lasera.

III.2.10.6 Spektroskopia NMR

Widma 1D i 2D NMR rejestrowano przy użyciu aparatu Varian Unity plus 500 z zastosowaniem standardowego oprogramowania. Wykonano widma ^1H NMR oraz widma dwuwymiarowe: COSY, TOCSY, NOESY, ^1H , ^{13}C HMQC, i ^1H , ^{13}C HMBC. Spektra skalowano wobec wzorca wewnętrznego - acetonu ($\delta_{\text{H}} = 2,225$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 31,45$ ppm) lub wg. sygnałów resztkowych protonów DMSO- d_6 . Widma glukanowe rejestrowano przy użyciu aparatu Bruker 300 w temp. 40°C oraz 65°C (w przypadku widma HMBC). Stosowano standardowe oprogramowanie.

Jako rozpuszczalnika w przypadku polisacharydów *O. cytisi* i *O. lupini* użyto D_2O . W przypadku preparatu egzopolisacharydu *O. cytisi*, jako rozpuszczalnika użyto 0,5M NaOH ze względu na słabą rozpuszczalność w D_2O . Natomiast w przypadku egzopolisacharydu *O. lupini* preparat zawieszono w D_2O . Preparat

peryplazmatycznych glukanów *O. cytisi* rozpuszczono w DMSO- d_6 , natomiast *O. lupini* w D_2O .

III.2.10.7 Analiza FT-IR preparatów egzopolisacharydowych *O. lupini*

Widma IR z egzopolisacharydu były rejestrowane za pomocą spektrometru Thermo Nicolet FTIR Scientific 8700A. Pomiary prowadzono w zakresie 4000-500 cm^{-1} .

III.3 Badanie właściwości sorpcyjnych egzopolisacharydu *O. lupini*

III.3.1 Badanie zahamowania wzrostu *O. lupini* na metalach ciężkich

Badanie przeprowadzono na zmodyfikowanym podłożu 79CA z dodatkiem glicerolu, bez K_2HPO_4 oraz dodatkiem soli metali ciężkich:

- Cd^{+2} Siarczan kadmowy ($3CdSO_4 \times 8H_2O$)
- Pb^{+2} Octan ołowiu ($Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$)

Hodowla prowadzona była dwuetapowo z napowietrzaniem przez wytrząsanie w 28°C. Inokulum hodowano przez 48h natomiast właściwą hodowlę przez 96h.

III.3.2 Właściwości sorpcyjne EPS *O. lupini* wobec jonów Cd^{2+} i Pb^{2+}

Do 1 ml wodnego roztworu soli dodawano po 5 ml 0,6M SDS, 1ml 1M H_2SO_4 oraz 1 ml roztworu ditizonu. Wytrząsano i mierzono absorbancję przy odpowiednim, wcześniej ustalonym (przy stężeniu 0,5 mg/100ml) dla danego metalu maksimum absorbancji. Dodatkowo dla każdej soli wykonano krzywą kalibracyjną w zakresie 0,005 - 14 mg/100ml.

Adsorpcję jonów Pb^{+2} i Cd^{+2} przez egzopolisacharyd określano przy stężeniach od 0,1 do 14 mg jonu metalu/100 ml roztworu. W tym celu do worków dializacyjnych dodano roztwór EPS (5mg EPS/5ml wody). Zamknięte worki umieszczano w zlewkach zawierających roztwory metali w odpowiednich stężeniach. Następnie mierzono ilość pozostałych jonów pobierając po 0,2 ml roztworu z każdej zlewki, dodając 1 ml Tritonu, 0,3 ml kwasu oraz 1,5 ml ditizonu. Absorbancję mierzono przy wcześniej ustalonej maksymalnej dla kadmu i ołowiu długości fali. W przypadku kadmu absorbancję mierzono przy długości fal 542 nm, natomiast dla ołowiu przy 553 nm. Pomiary prowadzono w odniesieniu do próby kontrolnej nie zawierającej soli metalu ciężkiego.

III.3.3 Wpływ pH środowiska na sorpcję jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd *O. lupini*

Wpływ pH na właściwości sorpcyjne egzopolisacharydu *O. lupini* określono w zakresie pH 2-8. W tym celu w zlewkach zawierających roztwór odpowiedniego metalu w stężeniu 6 mg/100ml umieszczono worki dializacyjne z roztworem EPS (5mg EPS/5ml wody). Po 18 godz. mierzono absorbancję pobierając po 0,2 ml roztworu metalu z każdej zlewki, dodając 1 ml Tritonu, 0,3 ml kwasu oraz 1,5 ml ditizonu (patrz III.3.2.). Absorbancję mierzono przy ustalonej maksymalnej dla danego metalu długości fali (542 i 553 nm odpowiednio dla jonów Pb^{+2} i Cd^{+2}).

III.3.4 Kinetyka wiązania jonów kadmu i ołowiu przez EPS *O. lupini*

Kinetykę wiązania jonów metali wykonano przy pH obojętnym. Analogicznie w zlewkach zawierających roztwór odpowiedniego metalu w stężeniu 6 mg/100ml umieszczono worki dializacyjne z roztworem EPS (5mg EPS/5ml wody). Pomiarów wykonywano przez pierwsze 6 godzin trwania eksperymentu, co godzinę a następnie ostatni pomiar wykonano po 24h.

IV WYNIKI

IV.1 LIPOPOLISACHARYDY

IV.1.1 Otrzymanie preparatów lipopolisacharydowych

Szczepy bakteryjne namnażano w płynnym podłożu 79CA z dodatkiem bursztynianu sodu (podstawowe źródło węgla). Hodowla była napowietrzana przez intensywne wytrząsanie. Właściwą hodowlę prowadzono w dwulitrowych kolbach zawierających 900 ml pożywki. Inokulum namnażano przez 2 dni w 100 ml pożywki, natomiast hodowla właściwa prowadzona była przez 3 dni. Bakterie odwirowano, zewnątrzkomórkowe polisacharydy odmyto, a otrzymaną masę komórkową poddano delipidacji w celu usunięcia wolnych lipidów błonowych (wg. procedury opisanej w rozdziale III.2.3). Procedura ta pozwoliła na równoległe odseparowanie peryplazmatycznych glukanów. Izolacja LPS została przeprowadzona przy użyciu klasycznej metody w układzie fenol/woda (Westphal i Jann 1965, Johnson i Perry 1976). Dla zwiększenia wydajności procesu delipidowana masa bakteryjna została poddana wstępnemu trawieniu enzymami: proteinazą K, RNazą i DNazą. Po usunięciu fenolu (dializa) preparaty zostały doczyszczone przez ultrawierowanie. Łączna uzyskana ilość mokrej masy bakteryjnej w przypadku *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T to 215 g, natomiast w przypadku *O. lupini* LUP21^T otrzymano 227 g mokrej masy. Wydajność ekstrakcji dla poszczególnych frakcji zestawiono w tabeli 8. W przypadku obu szczepów największa część materiału po ekstrakcji znalazła się w fazie wodnej. Podczas prowadzenia ekstrakcji LPS z *O. lupini* LUP21^T nie uzyskano międzyfazy, natomiast w przypadku *O. cytisi* ESC1^T ilość surowego LPS w międzyfazie była znaczna i przewyższała jego ilość w fazie fenolowej.

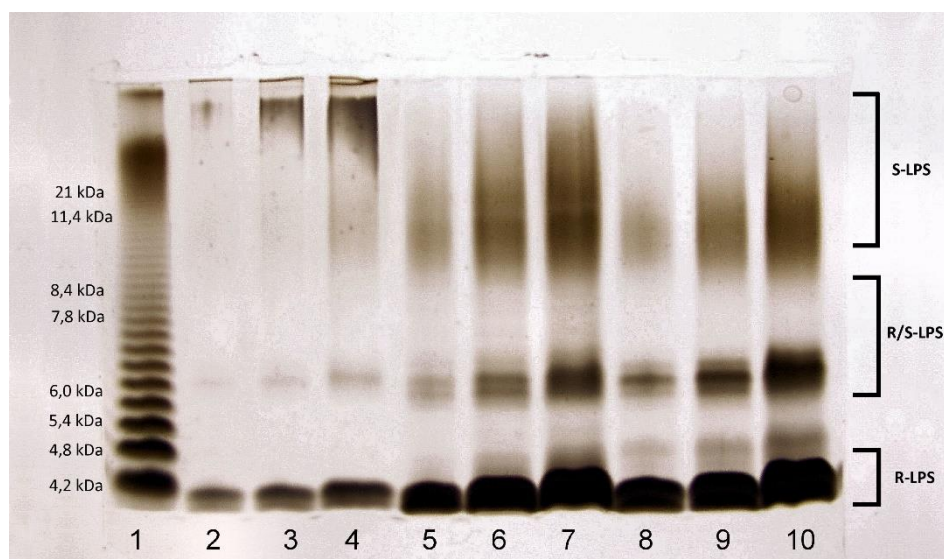
Tabela 8. Wydajność ekstrakcji lipopolisacharydów *Ochrobactrum cytisi* i *O. lupini*.

Wynik ekstrakcji Mokra masa bakteryjna	Surowy preparat LPS [mg]			Wydajność ekstrakcji [%]		
	FW	FF	MF	FW	FF	MF
<i>O. cytisi</i> 215 g	2757	798	1853	13	4	9
<i>O. lupini</i> 227 g	2798	1147,3	brak	12	5	0

IV.1.2 Analiza elektroforetyczna LPS *O. cytisi* i *O. lupini*

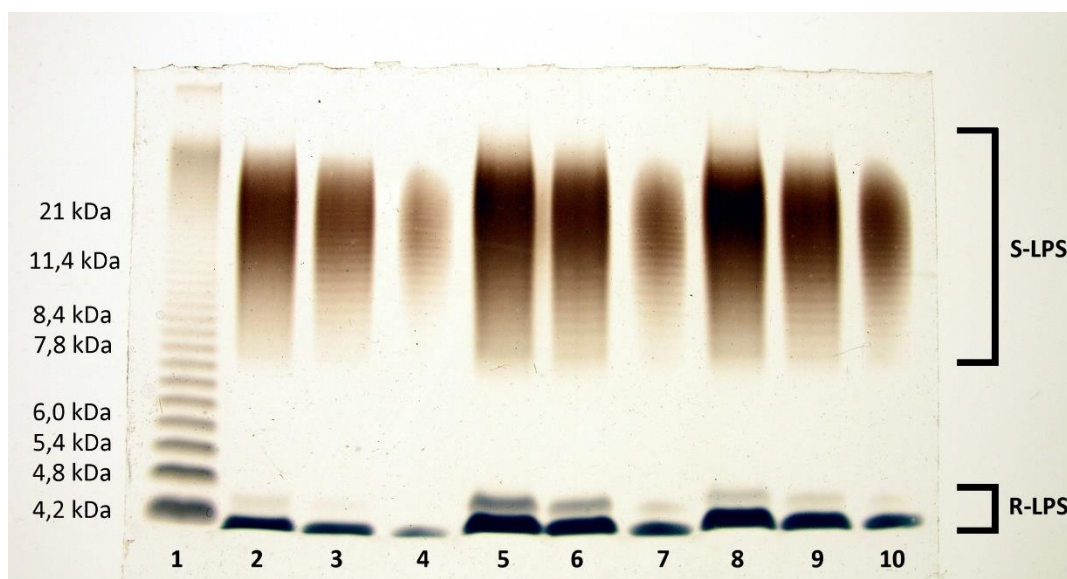
Jedną z najpowszechniej stosowanych technik do rozdziału i analizy preparatów lipopolisacharydowych jest elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS. Metoda ta pozwala na dokonanie analizy porównawczej, wyznaczenie przybliżonego ciężaru cząsteczkowego oraz określenie heterogenności preparatów lipopolisacharydowych pozyskanych z różnych mikroorganizmów. Zwykle w takich analizach preparatami wzorcowymi są dobrze poznane lipopolisacharydy *Salmonella enterica* lub *Escherichia coli*.

Analiza PAGE-SDS preparatów LPS *O. cytisi* ESC1^T wykazała, że są to materiały wysoce heterogenne dla których można wyróżnić co najmniej 3 grupy prążków o wyraźnie różnym ciężarze cząsteczkowym (**Ryc. 30**). Prążki najszybciej migrujące reprezentują frakcję najlżejszą o przybliżonej masie 4,2-4,6 kDa. Odpowiadają one szorstkim formom lipopolisacharydu. Powyżej w obszarze odpowiadającym prążkom o masie ok. 7,8 kDa lokują się prążki frakcji S/R czyli formy pośrednie zawierające krótkie fragmenty łańcucha O-swoistego. Najwolniej w żelu migrują frakcje LPS typu S czyli tak zwany gładki lipopolisacharyd. Ich przybliżone masy zawierają się w granicach od ok 9 do 30 kDa. Pomimo tak dużej różnorodności preparatu można stwierdzić wyraźną przewagę lipopolisacharydu **typu szorstkiego** w badanym preparacie LPS *O. cytisi*.



Ryc. 30. Rozdział elektroforetyczny (PAGE-SDS) preparatów LPS *O. cytisi* ESC1^T; Ścieżki oznaczono kolejno cyframi od 1 do 10: **1.** *Salmonella* Typhimurium S (Sigma L-6511) - preparat referencyjny **2-4.** *Ochrobactrum cytisi* faza wodna (FW) osad uzyskany po ultrawiirowaniu (2, 5, 10 µg) **5-7.** *O. cytisi* faza fenolowa osad uzyskany po ultrawiirowaniu (2, 5, 10 µg), **8-10.** *O. cytisi* międzyfaza (MF) osad uzyskany po ultrawiirowaniu (2, 5, 10 µg).

Rozdziały elektroforetyczne PAGE-SDS lipopolisacharydu *O. lupini* LUP 21^T wskazują na obecność znacznych ilości gładkich form LPS (S-LPS). Ta obserwacja pozwala wnioskować o znacznej odmienności w strukturach lipopolisacharydów występujących u obu badanych szczepów *Ochrobactrum*. Elektroforegram preparatów lipopolisacharydowych *O. lupini* LUP21^T uwidoczniał intensywnie wybarwiający się prążki odpowiadające cząsteczkom LPS o masach w zakresie od 8 do 26 kDa. Dodatkowo widoczne są prążki o przybliżonej masie 4,0-4,8 kDa (tzw. R-LPS, zawierający tylko lipid A oraz oligosacharyd rdzeniowy) (Ryc. 31).



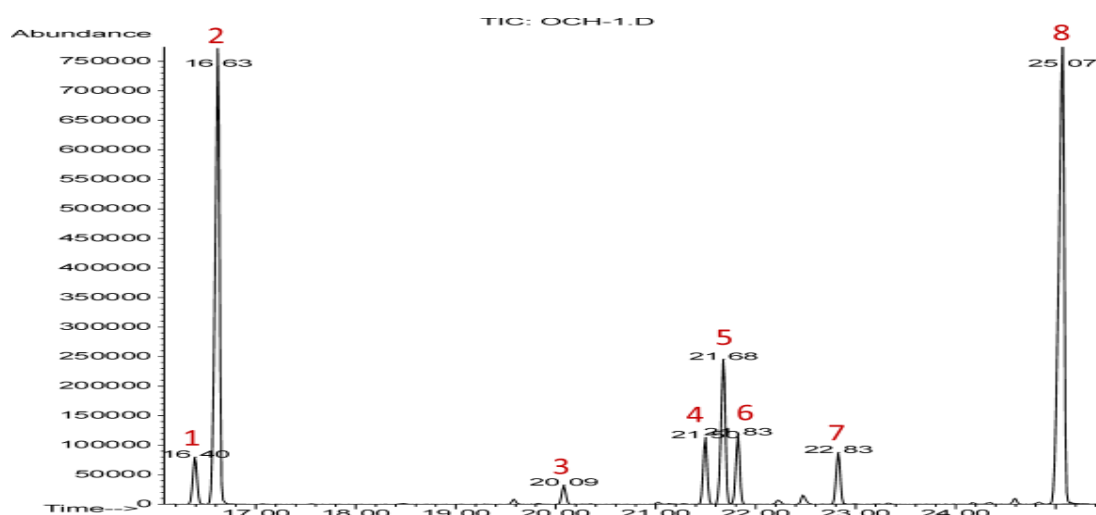
Ryc. 31. Rozdział elektroforetyczny (PAGE-SDS) preparatów LPS wyizolowanych z *O. lupini* LUP21^T. Cyfry oznaczają kolejno: 1. *Salmonella* Typhimurium S (Sigma L-6511, 2 µg) - preparat referencyjny 2-4. *O. lupini* faza wodna osad uzyskany po ultrawiirowaniu (2, 5, 10 µg) 5-7. *O. lupini* FF supernatant z ultrawiirowania (2, 5, 10 µg) 8-10. *O. lupini* faza fenolowa osad uzyskany po ultrawiirowaniu (2, 5, 10 µg).

IV.1.3 Analiza chemiczna lipopolisacharydów *O. cytisi* i *O. lupini*

Podczas wstępnych badań strukturalnych endotoksyn bardzo użyteczne są techniki oparte na połączeniu chromatografii gazowo-cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Dostarczają one kluczowych informacji, które bardzo ułatwiają analizę widm uzyskanych z zastosowaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego. W celu wykorzystania techniki GC-MS niezbędne jest takie przygotowanie badanych preparatów endotoksyn, aby uzyskać lotne pochodne kwasów tłuszczowych i węglowodanów.

IV.1.3.1 Skład węglowodanowy preparatów lipopolisacharydowych *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T

Analizy składników cukrowych lipopolisacharydów wykonano po uprzednim przeprowadzeniu ich w formy octanów alditoli i aminoalditoli (**Rozdział III.2.8.1**). Derywatyizacja niezbędna była ze względu na liczne grupy polarne występujące w węglowodanach, które sprawiają, że nie są one substancjami lotnymi. Modyfikacji zostały poddane grupy hydroksylowe, aminowe, karboksylowe i aldehydowe. Derywatyzowane składniki preparatów lipopolisacharydowych rozdzielano na chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem MS. Rejestrowane składniki były identyfikowane na podstawie ich czasów retencji oraz ich widm mas. Wyniki analizy cukrów/aminocukrów dla *O. cytisi* ESC1^T zebrano w **tabeli 9** i przedstawiono na **rycynie 32**. Ilość poszczególnych składników została określona na podstawie obliczeń metodą wzorca wewnętrznego, którym był inozytol.



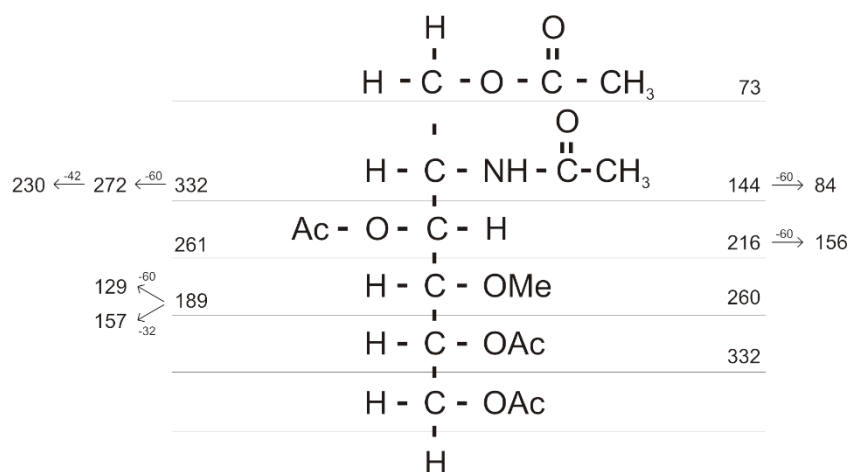
Ryc. 32. Chromatogram GC-MS mieszaniny octanów alditoli otrzymanych z LPS *O. cytisi* ESC1^T. Poszczególnym czasom retencji odpowiadają kolejno octany alditoli powstałe z: 1. ramnozy 2. fukozy 3. 2-amino-6-deoksyheksozy 4. mannozy 5. glukozy 6. galaktozy 7. aminocukru 8. *N*-acetylo-galaktozaminy.

Tabela 9. Skład węglowodanowy preparatów LPS szczepu *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T.

Składnik cukrowy	Czas retencji odpowiedniego octanu alditolu [min]	Ilość [μg/mg]
Ramnoza	13.688	3,92
Fukoza	13.884	41,5
Mannoza	18.513	4,82
Glukoza	18.688	17,7

Galaktoza	18.822	6,48
4-metylogalaktozamina	19.742	0,72
<i>N</i> -acetylo-D-glukozamina	21.390	0,43
<i>N</i>-acetylo-D-galaktozamina	21.813	18,87

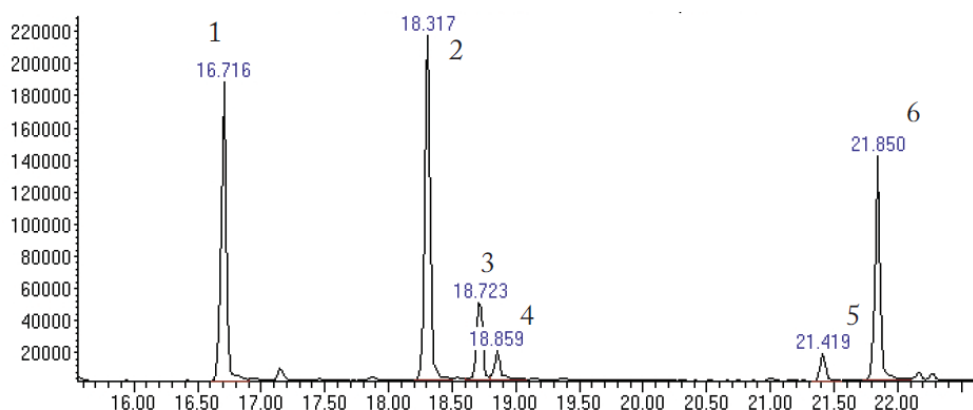
W preparacie LPS *O. cytisi* ESC1^T dominującym składnikiem wśród cukrów obojętnych jest fukoza. Stwierdzono obecność dwóch 6-deoksycukrów takich jak fukoza i ramnoza. Fukoza jest obecna w ilości przewyższającej ponad dwukrotnie ilość glukozy. Drugim pod względem ilości składnikiem preparatu jest *N*-acetylo-D-galaktozamina. Pozycję grupy metylowej w badanym metylocukrze określono na podstawie analizy widma mas odpowiedniego octanu alditolu.



Ryc. 33. Schemat fragmentacji 4-*O*-metylogalaktozaminy.

Analiza składu węglowodanowego preparatu *O. lupini* LUP21^T wykazała, że w największej ilości, występuje galaktozamina. Nie stwierdzono natomiast obecności fukozy. Drugi, co do ilości składnik lipopolisacharydu to prawdopodobnie heptuloza (**Tabela 10**, dokładnej analizy tego składnika dokonano przy okazji badań nad frakcją dgPS *O. lupini* LUP21^T). Największe ilości powyższych składników wykryte zostały w supernatancie uzyskanym po ultrawiirowaniu fazy wodnej z ekstrakcji fenol-woda. Dodatkowo w preparacie zidentyfikowano następujące cukry obojętne: mannozę (Man), glukozę (Glc) i galaktozę (Gal). Mannoza obecna była jedynie w supernatancie fazy fenolowej, natomiast pozostałe cukry obojętne występowały w zróżnicowanych ilościach we wszystkich izolowanych frakcjach. Lipopolisacharyd zawierał również galaktozaminę (GalN) i 2,3-diamino-2,3-dideoksy-glukozę (GlcN3N). Ten ostatni cukier wykryto wyłącznie we frakcji lipidu A.

Abundance



Time→

Ryc. 34. Chromatogram analizy GC-MS cukrów w formie octanów alditoli i aminoalditoli izolowanych z LPS *O. lupini* LUP21^T. Kolejnymi cyframi oznaczono piki octanów alditoli następujących cukrów: **1.** Heptuloza **2.** Inozytol (wzorzec wewnętrzny) **3.** Glukoza **4.** Galaktoza **5.** Glukozamina **6.** Galaktozamina.

Tabela 10. Skład węglowodanowy preparatów LPS szczepu *Ochrobactrum lupini* LUP21^T.

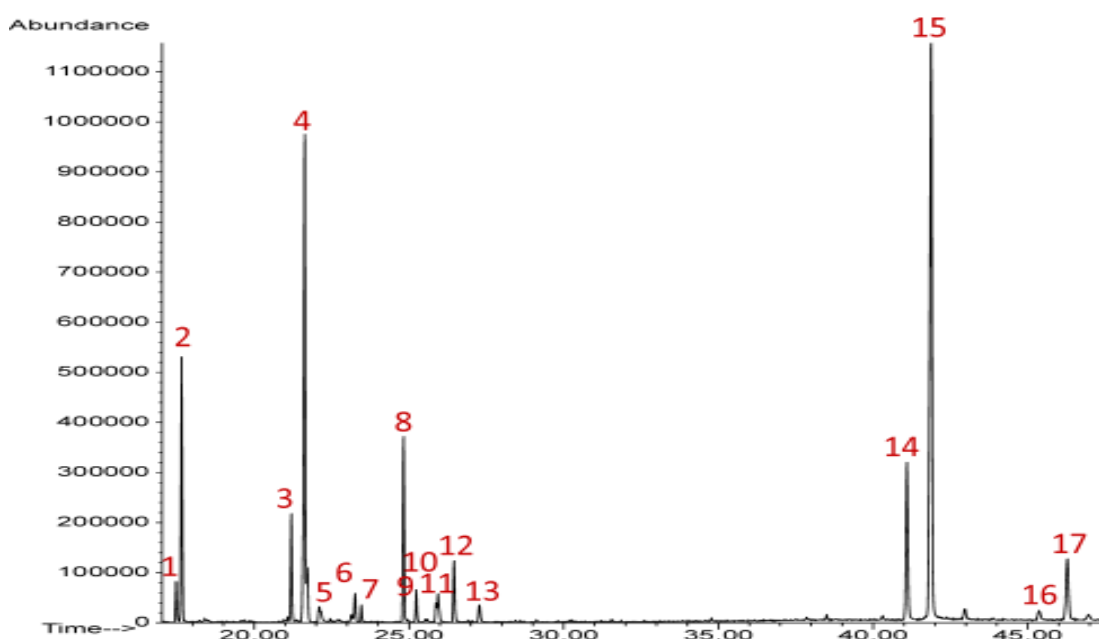
CUKIER	FRAKCJA			
	FF osad	FF supernatant	FW osad	FW supernatant
Heptuloza	15,1	12,55	15,329	18,83
Mannoza (Man)	nd	6,16	nd	nd
Glukoza (Glc)	Ślady	10,12	5,04	17,50
Galaktoza (Gal)	Ślady	Ślady	1,87	Ślady
Galaktozamina (GalN)	13,80	13,65	13,60	15,03
Glukozamina (GlcN)	Ślady	4,67	Ślady	3,99

nd- nie stwierdzono (not detected)

W celu określenia stereokonfiguracji poszczególnych składników cukrowych przeprowadzono je w R-(-)-2-butyłowe pochodne (wg. procedury opisanej w rozdziale **III.2.8.2**). Po przeprowadzeniu trimetylosililacji butylowych glikozydów preparaty poddano analizie metodą GC-MS. Równoległe według tej samej procedury przygotowywano preparaty wzorcowe. Stwierdzono, że w badanym preparacie *O. cytisi* zarówno fukoza jak i galaktozamina posiadają konfigurację D. Według tego samego schematu wykonane zostały oznaczenia dla szczepu *O. lupini*. Pozwoliło to stwierdzić, że również w tym przypadku zidentyfikowane składniki występują w konfiguracji D.

IV.1.3.2 Analiza kwasów tłuszczowych w lipopolisacharydach *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T

W celu uwolnienia kwasów tłuszczowych preparaty LPS poddano metanolizie według procedury opisanej w rozdziale III.2.9. Długotrwała metanoliza pozwoliła na uwolnienie estrowo oraz amidowo związanych kwasów tłuszczowych. Dodatkowo przeprowadzono konwersję polarnych grup hydroksylowych w niepolarne trimetylosililowe. Otrzymane TMS pochodne metylowane estry kwasów tłuszczowych analizowano metodą GC-MS. Jako wzorca wewnętrznego użyto kwasu heptadekanowego (17:0). Wyniki analizy LPS *O. cytisi* ESC1^T obrazuje chromatogram przedstawiony na rycinie 35.



Ryc. 35. Chromatogram GC-MS mieszaniny estrów metylowanych kwasów tłuszczowych izolowanych z lipopolisacharydu *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T. Kolejnymi liczbami oznaczono piki estrów metylowanych kwasów tłuszczowych oraz TMSi pochodnych estrów metylowych hydroksykwasów: 1. heksadekanowego (16:0), 2. 3-hidroksytetradekanowego (3OH-14:0), 3. oktadecenowego (18:1), 4. 3-hidroksyheksadekanowego (3OH-16:0), 5. śladowe ilości EDTA - zanieczyszczenie, 6. nonadekanowego (19:0), 7. 3-hidroksyheptadekanowego (3OH-17:0), 8. pochodnej powstałej z kwasu 18:1, 9. 3-hidroksyoktadekanowego (3OH-18:0), 10. pochodnej powstałej z kwasu 19:1, 11. pochodnej powstałej z kwasu 19:1, 12. izomeru 9:1, 13. izomeru 19:1, 14. 27-ketooktakozanowego (27oxo-28:0), 15. 28-hidroksynonakozanowego (28OH-29:0), 16. 29-ketotriakontanowego (29oxo-30:0), 17. 30-hidroksyhentriakontanowego (30OH-31:0).

Identyfikacji kwasów tłuszczowych dokonano na podstawie analizy ich czasów retencji oraz ich wzoru fragmentacji w spektrometrze mas. Poszczególne kwasy rozpoznane zostały na podstawie obecności charakterystycznych jonów.

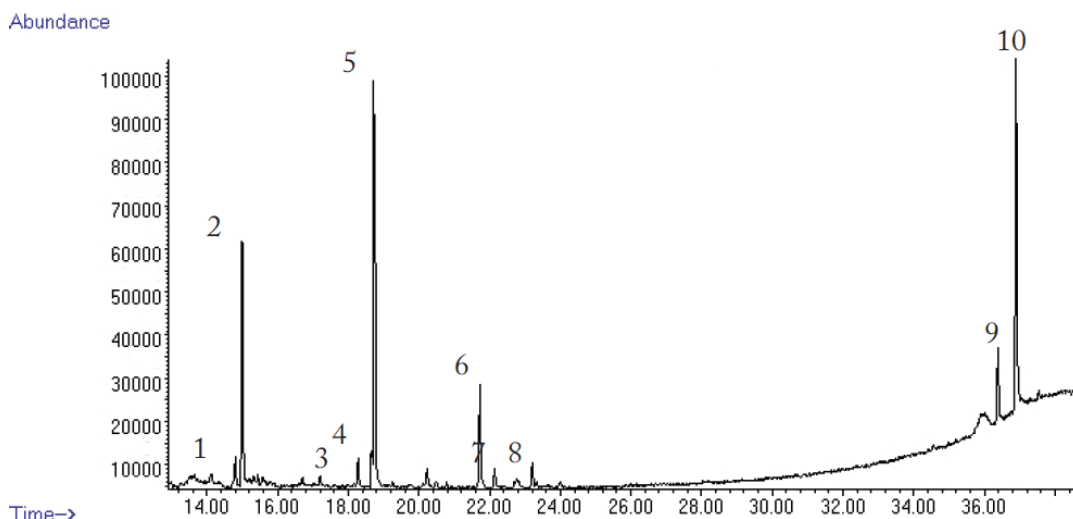
Dla kwasów nasyconych i jednonienasyconych stwierdza się obecność intensywnych jonów m/e 74 i 87 oraz jonów pozwalających na określenie długości łańcucha tj.: $[M]^+$, $[M-31]^+$, $[M-32]^+$, $[M-74]^+$ i $[M-116]^+$. Dla TMSi pochodnych 3-hydroksykwasów charakterystyczne są jony o m/e 175 oraz $[M-15]^+$ powstający się w wyniku eliminacji grupy metylowej z trimetylosililowej.

W lipopolisacharydzie *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T stwierdzono obecność czterech typów kwasów tłuszczowych. Pierwsza grupa to kwasy nasycone, wśród których najsilniejszy jest sygnał pochodzący od kwasu oktadekanowego. Pozostałe nasycone kwasy tłuszczowe tj. kwas heksadekanowy, dokozanowy oraz tetrakozanowy występowały w niewielkich ilościach. Drugą grupą są kwasy nienasycone. Stanowią one najmniej liczną grupę. Wśród nich stwierdzono obecność kwasu 18:1 oraz 19:1. Do trzeciej grupy należą 3-hydroksykwas, wśród których wyróżniono m.in. kwas 3-hydroksyheksadekanowy występujący w ilości kilkukrotnie przewyższającej inne kwasy tłuszczowe. Pozostałe zidentyfikowane 3-hydroksykwas to: 3OH-14:0, 3OH-17:0 i 3OH-18:0. Ostatnią grupę stanowią długołańcuchowe (ω -1) hydroksykwas. Jednym z nich jest kwas 27-hydroksyoktadekanowy. Jest to składnik kwasowy najczęściej występujący w preparacie LPS *O. cytisi* ESC1^T. Występuje on powszechnie w lipopolisacharydach ryzobiów. Oznaczone ilości poszczególnych kwasów tłuszczowych zostały zestawione w tabeli 11.

Tabela 11. Zawartość kwasów tłuszczowych w preparacie LPS *O. cytisi* ESC1^T.

L.P.	Kwas tłuszczowy	Czas retencji [min]	Ilość [μg/mg LPS]
1.	3OH-14:0	14,94	6,03
2.	3OH-16:0	18,68	11,12
3.	3OH-18:0	22,11	Ślady
4.	27OH-28:0	41,88	19,67
5.	29OH-30:0	46,28	2,42
6.	27oxo-28:0	41,10	4,78
7.	16:0	14,82	0,2
8.	18:0	16,02	3,51
9.	22:0	36.650	Ślady
10.	24:0	38.15	Ślady

Skład kwasów tłuszczowych w preparacie lipopolisacharydu *Ochrobactrum lupini* LUP21^T został określony w analogiczny sposób. Stwierdzono występowanie czterech grup kwasów. Zaliczają się tutaj 3-hidroksykwasy (np. 3-hidroksytetradekanowy, 3-hidroksyheksadekanowy), długołańcuchowe (ω -1) hydroksykwasy (np. 27OH-oktakozaanowy), kwasy nasycone (np. oktadekanowy) oraz nienasycone (np. oktadekadienowy) (**Ryc. 36**).



Ryc. 36. Chromatogram GC-MS mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych izolowanych z lipopolisacharydu *O. lupini* LUP21^T (faza wodna). Kolejne liczby oznaczają piki estrów metylowanych kwasów tłuszczowych i TMSi pochodnych estrów metylowych hydroksykwasów: **1.** heksadekanowy (16:0) **2.** 3-hidroksytetradekanowy (3OH-14:0) **3.** oktadecenowy (18:1) **4.** oktadekanowy (18:0) **5.** 3-hidroksyheksadekanowy (3OH-16:0) **6.** Pochodna powstała z kwasu oktadekanoowego (18:1) **7.** 3-hidroksyoktadekanowy (3OH-18:0) **8.** Nonadecenowy (19:1) **9.** 27-ketooktakozaanowy (27oxo-28:0) **10.** 27-hidroksyoktakozaanowy (27OH-28:0).

W preparacie *O. lupini* LUP21^T wyraźnie dominowały dwa składniki identyczne jak w przypadku *O. cytisi*. Są to kwasy: 3-hidroksyheksadekanowy oraz 27-hidroksyoktakozaanowy. Ilości poszczególnych kwasów podane zostały w **tabeli 12**. Wykazano równocześnie, że spośród wszystkich podstawników acylowych jedynie 3- hydroksykwasy są związane amidowo.

Tabela 12. Zawartość kwasów tłuszczowych w preparatach LPS *O. lupini* LUP21^T.
 t_R – czas retencji na kolumnie HP-5MS patrz Materiały i Metody

Kwasy tłuszczowe	Frakcja							
	FF osad		FF supernatant		FW osad		FW supernatant	
	μg/mg	t_R	μg/mg	t_R	μg/mg	t_R	μg/mg	t_R
<u>3-OH 14:0</u>	6.71	14.995	1.41	14.983	2.00	14.996	3.69	14.995
<u>3OH 16:0</u>	6.58	18.726	1.31	18.726	2.10	18.726	4.43	18.732
3OH 18:0	0.93	22.188	-	-	0.35	22.135	0.19	22.137
3OH 22:0	1.11	26.05	-	-	-	-	-	-
<u>27OH 28:0</u>	5.66	36,88	0.16	36.91	2.83	36.88	1.41	36.896
16:0	0.51	14.796	0.49	14.775	0.38	14.796	1.52	14.795
18:0	0.12	18.643	-	-	0.34	18.658	0.78	18.654
<u>19:0</u>	2.10	17.187	0.34	17.187	0.99	17.202	3.62	17.208
20:0	-	-	-	-	0.46	19.023	0.60	19.017
21:0	1.10	20.764	-	-	0.41	20.764	0.53	20.768
22:0	1.26	28.105	-	-	-	-	-	-
18:2	-	-	3.86	16.876	-	-	-	-

IV.1.4.1 Analiza strukturalna polisacharydu O-swoistego *O. cytisi* ESC1^T

Preparat degradowanego polisacharydu (dgPS) uzyskany został przy pomocy łagodnej kwaśnej hydrolizy (1% kwas octowy). Hydroliza ta prawie wyłącznie powoduje pękanie wiązań ketozydowych pomiędzy resztami cukrowymi (w tym wypadku resztami Kdo) w lipopolisacharydzie. Powstałe frakcje węglowodanowe (tzw. degradowany polisacharyd) oddzielane są od lipidu A przy zastosowaniu ekstrakcji w układzie dwufazowym (**Rozdział III.2.4**).

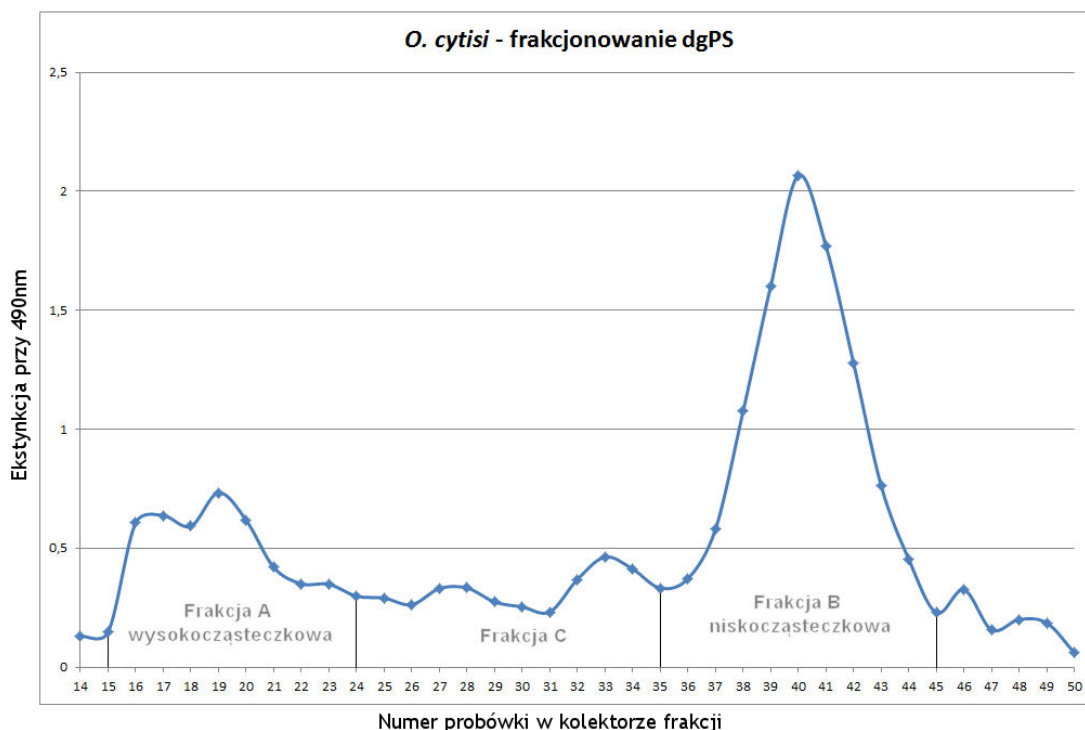
Do uwolnienia lipidu A od frakcji polisacharydowej użyto 82 mg LPS *O. cytisi* ESC1^T. W wyniku hydrolizy uzyskano 19 mg lipidu A oraz około 60 mg dgPS.

Otrzymany dgPS rozdzielono na kolumnie wypełnionej sitem molekularnym Sephadex G50 fine. Jako eluent zastosowano 1% roztwór kwasu octowego w wodzie. Na podstawie wykreślonego profilu elucji wyodrębniono trzy frakcje oligosacharydowe. Pierwsza frakcja oznaczona na **rycinie 37** jako frakcja A zawierała

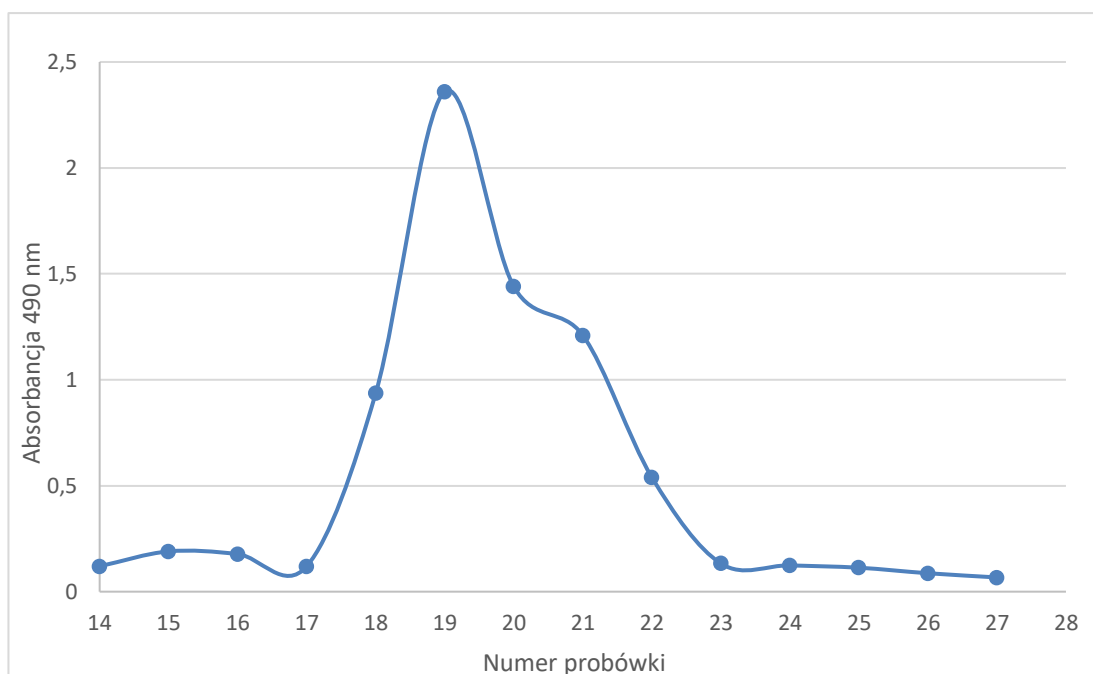
polisacharydy, a frakcja C jest frakcją zawierającą oligosacharydy o pośrednim profilu elucji. Najwięcej materiału znaleziono we B – stanowią ją oligosacharydy o niskiej masie cząsteczkowej (**Ryc. 37**).

Ze względu na prawdopodobne zanieczyszczenie solami frakcji niskocząsteczkowej poddano ją dodatkowemu rozdzielaniu. W tym przypadku frakcjonowanie przeprowadzono przy zastosowaniu kolumny BioGel P2 fine z zastosowaniem węgla amonowego jako solwentu (**Ryc. 38**). Jednocześnie w analogicznych warunkach przeprowadzona została kalibracja kolumny z użyciem standardów o znanych masach cząsteczkowych. Na podstawie wyznaczonej krzywej kalibracyjnej określono, że masa badanego oligocukru wynosi około 1800 Da. Można, więc przypuszczać, że składa on się z 10 monomerów (heksos).

Masa poszczególnych uzyskanych frakcji degradowanego polisacharydu wyniosła: frakcja A - 17,45 mg, frakcja C- 5,8 mg i frakcja B- 20,8 mg. Do analiz strukturalnych wykorzystana została frakcja wysokocząsteczkowa stanowiąca antygen O-swoisty.



Ryc. 37. Profil elucji degradowanego polisacharydu *O. cytisi* ESC1^T uzyskany na kolumnie Sephadex G50 fine przy zastosowaniu 1% kw. octowego jako eluentu.

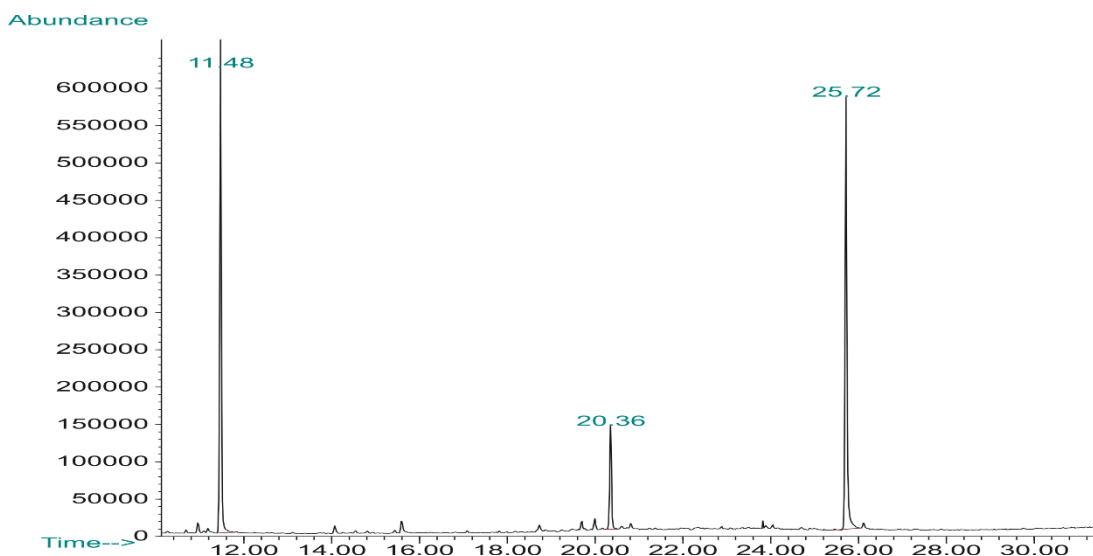


Ryc. 38. Profil elucji frakcji niskocząsteczkowej degradowanego polisacharydu *O. citisi* ESC1^T po rozdziale na kolumnie BioGel P2 fine.

W wyodrębnionej frakcji polisacharydu *O*-swoistego stwierdzono obecność galaktozaminy i fukozy. Dodatkowo zidentyfikowany został pik substancji, której widmo mas jest takie jak dla octanu 2-amino-2-deoksy-heksositolu metylowanego w pozycji C-4. Jego ilość oszacowana została na 10% względem galaktozaminy.

W celu określenia typu wiązań glikozydowych pomiędzy poszczególnymi jednostkami cukrowymi w polimerach i oligomerach cukrowych wykorzystuje się analizę metylacyjną (lub etylacyjną). W jej wyniku następuje metylacja wolnych grup hydroksylowych cukrów przy jednoczesnym zachowaniu nienaruszonych wiązań glikozydowych. Otrzymane per-*O*-metylowane oligosacharydy pod wpływem hydrolizy w wyniku rozerwania wiązań glikozydowych przekształcane są kolejno w częściowo zmetylowane monosacharydy. W następstwie redukcji i acetylacji otrzymujemy zmetylowane octany alditoli. Podczas interpretacji widm GC-MS jesteśmy w stanie określić pozycję wiązań glikozydowych pomiędzy poszczególnymi monomerami w oligosacharydach degradowanego polisacharydu.

Ze względu na obecność *O*-metylowanych pochodnych w preparacie *O*-PS *O. citisi* ESC1^T zamiast analizy metylacyjnej przeprowadzona została analiza etylacyjna.



Ryc. 39. Chromatogram GC preparatu polisacharydowego LPS *O. cytisi* ESC1^T frakcji A wysokocząsteczkowej poddanej analizie etylacyjnej i konwertowanej w peretylowane octany amino/alditoli.

Chromatogram peretylowanych octanów alditoli frakcji wysokocząsteczkowej przedstawiono na **rycinie 39**. Piki pochodnych cukrowych pojawiły się na nim między 11 a 26 minutą.

Stwierdzono że zarówno fukoza jak i galaktozamina są podstawione w pozycji C-3 (**Tabela 13**). Zaobserwowano obecność niewielkich ilości fukozy podstawionej w pozycji C-3 przez 4-OMe-heksozaminę oraz podstawionej w trzech pozycjach (C-3,4 i 6) heksozaminy.

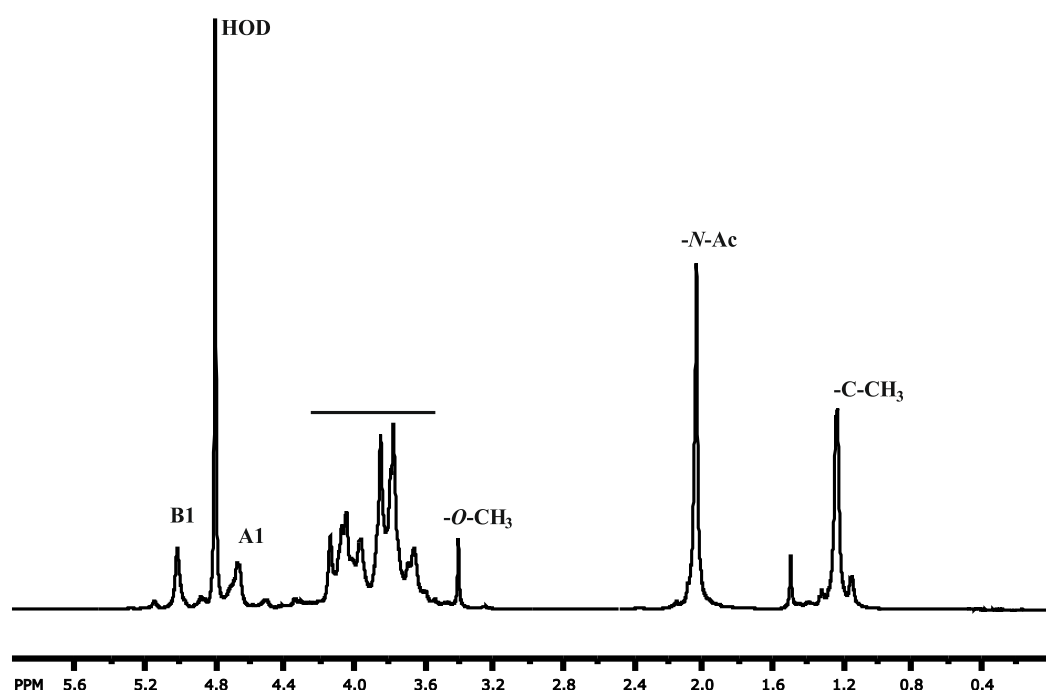
Tabela 13. Główne składniki zidentyfikowane w preparacie peretylowanych octanów alditoli otrzymanego z frakcji wysokocząsteczkowej degradowanego polisacharydu *O. cytisi* ESC1^T.

Lp.	Zidentyfikowany związek	Czas retencji [min]	Główne jony	Sposób powiązania cukrów w polimerze
1.	1,3,5- <i>O</i> -Ac ₃ -2,4 - <i>O</i> -Et ₂ -6-deoksyheksitol (fukcitol)	11,48	90, 136, , 143, 264, 271	→3)Fucp(1→
2.	1,3,5- <i>O</i> -Ac ₃ -4,6- <i>O</i> -Et ₂ -2-amino-2-deoksyheksitol (galaktozaminitol)	20,38	75, 87, 173, 185, 301,	→3)GalpNAc(1→

Do określenia struktury polisacharydu *O*-swoistego *O. cytisi* ESC1^T wykorzystane zostały wyniki pomiarów uzyskane metodami dwuwymiarowej spektroskopii NMR obejmującej analizy ¹H-¹H COSY, TOCSY, NOESY, oraz ¹H-¹³C HMQC i HMBC.

Analizę frakcji polisacharydowej z wykorzystaniem technik spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) rozpoczęto od jednowymiarowego widma protonowego, na którym wyodrębniono 4 grupy sygnałów (**Ryc. 40**):

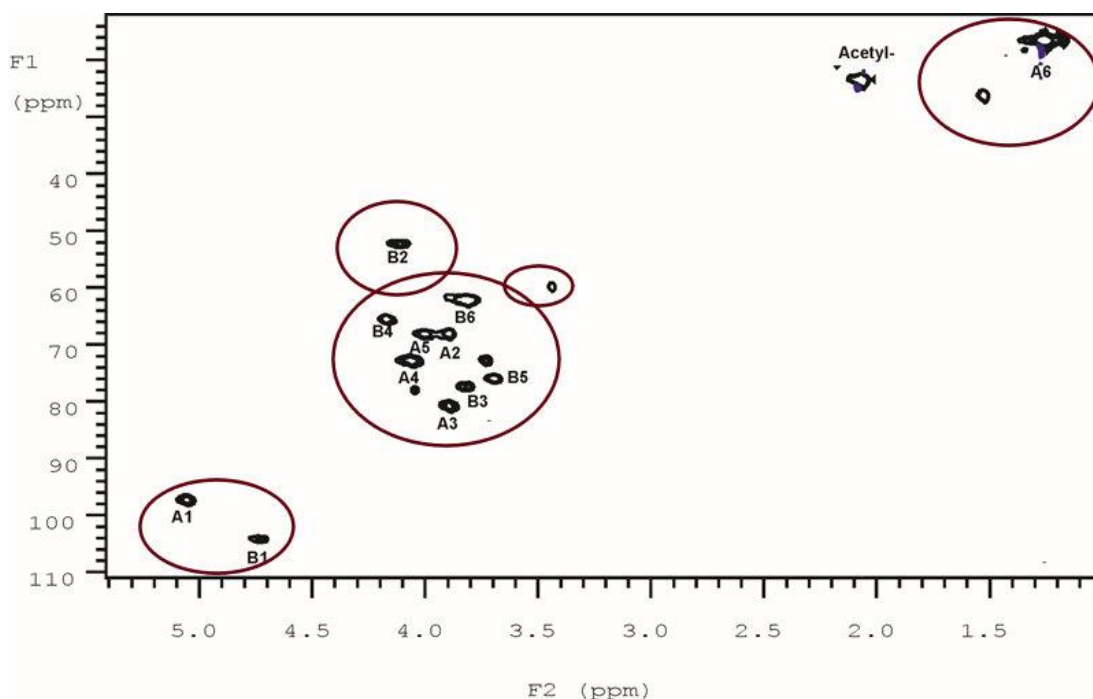
- Sygnały pochodzące od protonów anomerycznych
- Sygnały pochodzące od protonów tzw. szkieletowych
- Sygnały pochodzący od grup metylowych *O*-metylo-*N*-acetylo-galaktozaminy
- Sygnał pochodzący od grupy metylowej fukozy



Ryc. 40. Widmo ^1H -NMR OPS *O. cytisi* ESC1^T z zaznaczonymi sygnałami protonów anomerycznych, -O-CH₃, -N-Ac, -C-CH₃ i protonami związanymi bezpośrednio z atomami węgla tworzącymi pierścienie cukrowe.

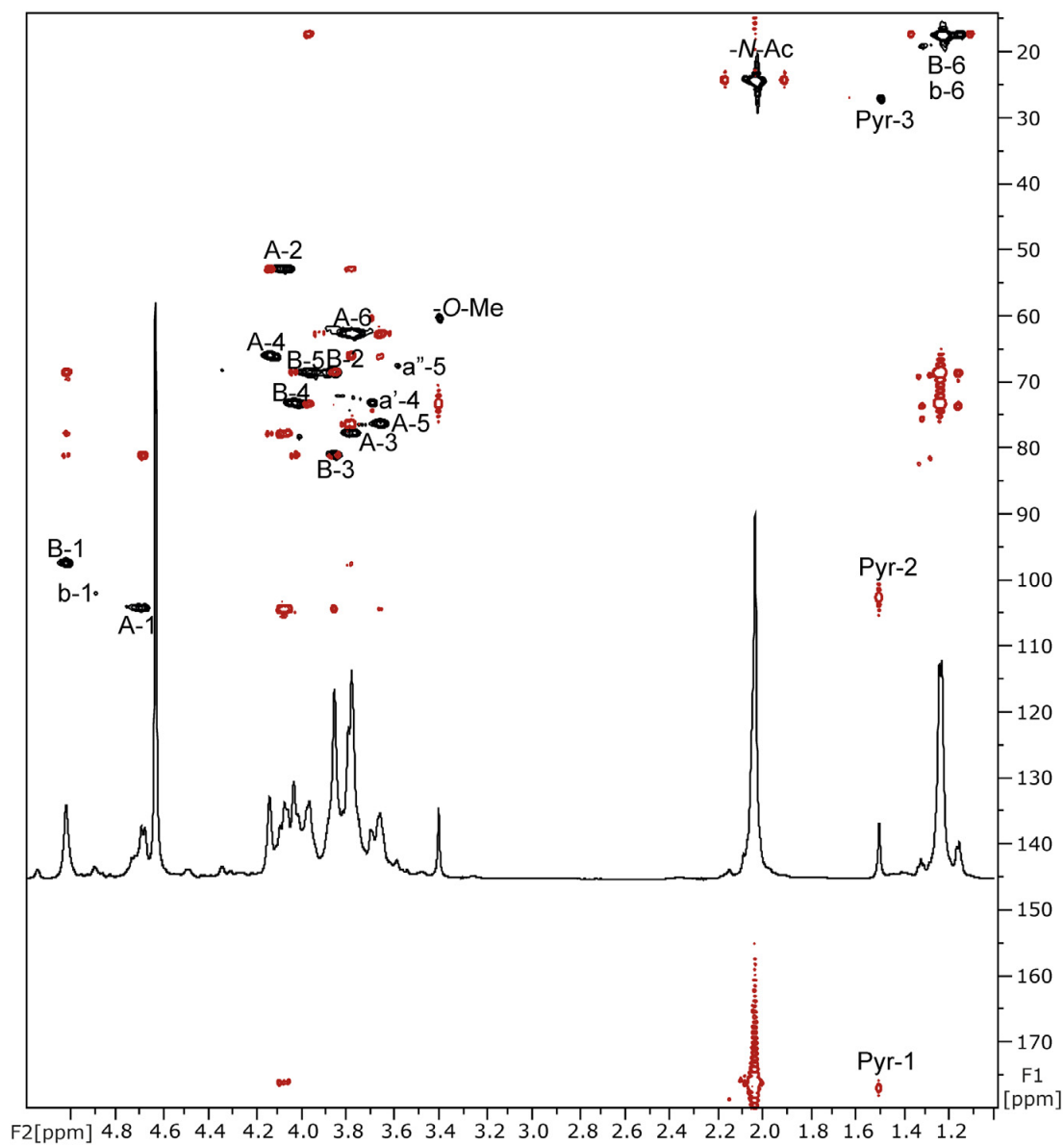
Kolejnym etapem była analiza widma dwuwymiarowego - HMQC (**Ryc. 41**), w wyniku, której wyodrębnione zostały sygnały pochodzące od:

- atomów anomerycznych (C i H)
- tzw. pozostałych szkieletowych węgli i protonów
- C-2 galaktozaminy
- grupy metylowej galaktozaminy (*O*-Me-Gal)
- grupy metylowej fukozy



Ryc. 41. Widmo HMQC preparatu OPS *O. cytisi* ESC1^T.

Przesunięcia chemiczne dla protonów i atomów węgla OPS *O. cytisi* ESC1^T zostały zebrane w **tabeli 14**. Na widmach HMQC OPS w zakresie δ_c 97,1-103,9 widoczne były sygnały dla atomów anomerycznych. Sygnał pochodzący od węgla niosącego azot zlokalizowany był przy δ_c 52,28, natomiast atomy węgla w pierścieniach cukrów miały przesunięcia chemiczne w zakresie δ_c 62,1-80,5. Wartość przesunięcia chemicznego dla grup C-metylowanych (C-6, 6-deoksyheksozy) wynosiła 16,6 ppm. Sygnał pochodzący od grupy O-metylowej miał δ_c 59,78, grup *N*-acetylowej (-CH₃) δ_c 23,6 oraz grup acetamido δ_c 176,2. Dodatkowo zaobserwowano obecność sygnałów charakterystycznych dla reszt pirogronowych przy przesunięciach chemicznych o wartościach δ_c 26,4 (-CH₃), 102,5 (grupa hemiacetalowa) oraz 177,0 (grupa -COOH). Dane uzyskane na podstawie ¹³C NMR wskazują, że wszystkie podstawniki cukrowe występują w formie piranoz.



Ryc. 42. Fragment widma HMQC (oznaczonego na czarno) oraz widma HMBC (oznaczonego na czerwono) preparatu polisacharydu otrzymanego z LPS *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T. Pyr – reszty pirogronowe.

Tabela 14. Wartości przesunięć chemicznych [δ , ppm] oraz stałych sprzężeń [$J_{C1,H1}$, Hz] dla poszczególnych atomów H i C w polisacharydzie O-swoistym *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T.

Reszty cukrowe	$J_{C1,H1}$	H1 ($J_{H1/H2}$) C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6; H6, H6' C6	O-Methyl [-O-CH ₃]	2-N-Acetyl [-C=O]	2-N-Acetyl [-CH ₃]
A	162,1	4,692 (8,8)	4,081	3,789	4,140	3,661	3,787; 3,787		2,037	176,18
→3)-β-D-GalNAc-(1→		103,91	52,28	<u>77,23</u>	65,37	75,81	62,07		23,57	
B	170,0	5,026 (3,8)	3,863	3,860	4,037	3,968	1,232			
→3)-α-D-Fuc-(1→		97,13	67,88	<u>80,52</u>	72,72	67,99	16,64			
b	170,5	4,899 (3,7)	3,878	4,090	4,022	3,944	1,231			
→3)-α-D-Fuc-(1→		101,69	68,84	<u>80,26</u>	77,84	68,80	16,64			
a'	165,7	4,736 (8,4)	4,057	4,078	3,701	3,880	3,810; 3,810	3,405	2,037	176,18
→3)-β-D-GalNAc4OMe-(1→		103,81	53,45	<u>79,99</u>	72,68	73,77	62,09	59,78	23,57	
a'' ↓ ↓	164,4	4,751 (8,4)	4,125	3,849	4,347	3,590	3,946; 4,070		2,037	176,18
4 6		103,80	52,17	<u>77,53</u>	67,74	67,06	66,40		23,57	
→3)-β-D-GalNAc-(1→										
Pyr		-	-	1,499						
R-pirogronian		177,02	102,50	26,36						

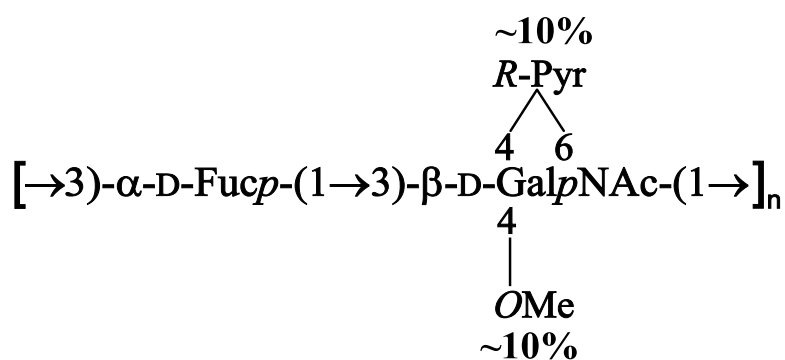
Analiza korelacji pomiędzy sygnałami występującymi w widmach ^1H - ^1H COSY, TOCSY i NOESY pozwoliła wyodrębnić dwie grupy spinowe sygnałów. Pierwsza grupa oznaczona na **rycinie 42** literą **A** pochodzi od reszt D - GalpNAc. Druga grupa opisana jako **B** oznacza natomiast sygnały pochodzące od reszt D-Fucp. Przesunięcia chemiczne dla H-1, H-2 oraz wartości stałej $J_{\text{C1,H1}}$ (162,1 Hz) dla D - GalpNAc wskazują na fakt, iż cukier ten występuje w konfiguracji β . Natomiast silne oddziaływania nOe między protonami H-1, H-5 i C-5 oraz stosunkowo wysoka wartość stałej $J_{\text{C1,H1}}$ (170,0 Hz) dla D-Fucp dowodzi, że ma ona α -konfigurację.

Obecność aminocukrów została potwierdzona poprzez korelację (na widmie HMQC) pomiędzy wodorem AH-2 (δ_{H} 4,08) z odpowiadającym mu węglem niosącym azot (δ_{C} 52,3) oraz grupą karbonylową δ_{C} 176,2 (zaobserwowaną na widmie HMBC). Przesunięcie chemiczne sygnałów C-3 obu reszt cukrowych w dół pola (w porównaniu z wartościami δ_{C} dla niepodstawionych reszt D-GalpNAc i D-Fucp) wskazało na udział tych atomów w tworzeniu wiązań glikozydowych.

Sekwencja cukrów w polimerze OPS została ustalona poprzez analizę widm NOESY i HMBC. Silne oddziaływania typu nOe zaobserwowano pomiędzy protonem AH-1 (δ_{H} 4,69) i BH-3 (δ_{H} 3,86) jak również pomiędzy protonem BH-1 (δ_{H} 5,03) i AH-3 (δ_{H} 3,79). Dodatkowo na widmie HMBC pojawiły się silne sygnały oddziaływań poprzez wiązanie glikozydowe pomiędzy protonem BH-1 (δ_{H} 5,03) i węglem AC-3 (δ_{C} 77,2) oraz pomiędzy protonem AH-1 (δ_{H} 4,69) i węglem BC-3 (δ_{C} 80,5). Powyższe dane wskazują że O-specyficzny polisacharyd *O. cytisi* zawiera dwucukrową powtarzającą się podjednostkę zawierającą resztę α -D-fukozy i β -D-galaktozaminy, które to cukry połączone są za pomocą wiązań (1 $\rightarrow$ 3)-glikozydowych. Ponadto stwierdzono obecność dwóch dodatkowych systemów spinowych dla D-GalpNAc. Pierwszy (oznaczony jako **a'**) został przyporządkowany do 4-O-metylowanej D-GalpNAc natomiast drugi (**a''**) do D-GalpNAc udekorowanej podstawnikiem pirogronowym. Obecność O-metylowego podstawnika w pozycji C-4 reszty D-GalpNAc została potwierdzona poprzez korelację pomiędzy protonami O-metyłowymi i H-4 z D-GalpNAc (system spinowy **a'**) w widmie NOESY (δ_{H} 3,41/3,70). Dodatkowo protony H-4 i H-6 D-GalpNAc (system **a''**) wykazały korelację z węglem z centrum chiralnego (węgiel C-2) podstawnika pirogronowego (widmo HMBC). Te oddziaływania wskazały, że pozycje C-4 i C-6 niektórych D-GalpNAc są podstawione resztami kwasu pirogronowego. Przesunięcie chemiczne grupy metylowej pirogronianu (δ_{C} 26,4) wskazało, że centrum chiralne pirogronianu

(węgiel C-2) wykazuje konfigurację R. Reszty pirogronowe z konfiguracją S mają aksjalnie (osiowo) położone grupy metylowe i dają sygnały o δ_c 17 ppm.

Na widmie ^1H NMR zaobserwowano kilka nakładających się sygnałów anomerycznych odpowiadających D-GalpNAc. Na widmie DQF-COSY obszar pomiędzy 4,65 – 4,75 ppm (F2) i 3,95-4,15 ppm (F1) zawierał przynajmniej pięć grup sygnałów, które powstały w wyniku oddziaływań korelacyjnych pomiędzy H-1 i H-2 D-GalpNAc. Wśród nich sygnał AH-1/AH-2 były najbardziej intensywny. Taka ilość sygnałów może wskazywać, że reszty D-GalpNAc zostały podstawione przez grupy pirogronowe i metylowe w przypadkowy sposób. Ponadto wszystkie protony anomeryczne D-GalpNAc wykazały korelacje typu nOe z H-3 pochodzącym od α -D-Fucp (system spinowy **b**), jak również wszystkie anomeryczne protony pochodzące z α -D-Fucp (systemy spinowe **B** i **b**) oddziaływały poprzez wiązania glikozydowe z C-3 pochodzącym od β -D-GalpNAc. W związku z tym należy sądzić, że wysokocząsteczkowa frakcja dgPS *O. cytisi* ESC1^T zawierała tylko jeden polimer reprezentujący polisacharyd O-specyficzny, który ma strukturę przedstawioną na **rycinie 43**:



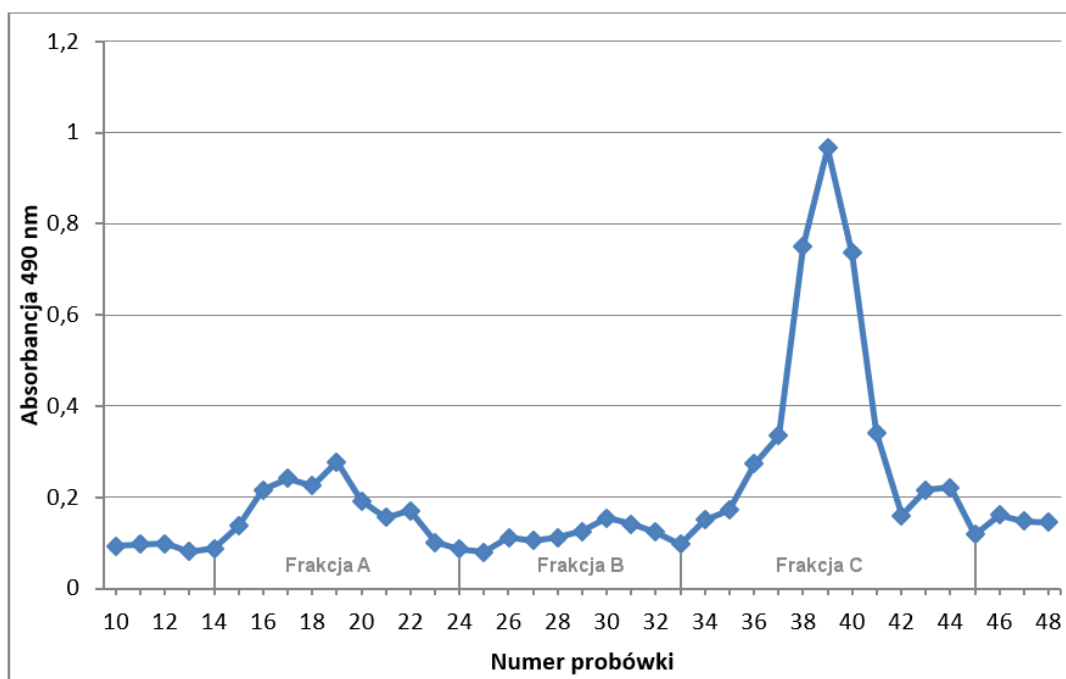
Ryc. 43. Proponowana struktura chemiczna powtarzającej się podjednostki łańcucha polisacharydowego antygeny *O. cytisi* ESC1^T.

Integracja odpowiednich sygnałów na widmie ^1H -NMR wykazała, że reszty D-GalpNAc podstawione resztą O-metylową stanowią około 10% wszystkich cząsteczek D-GalpNAc i że reszta pirogronowa podstawia również około 10 % D-GalpNAc. Określony w powyższy sposób stopień podstawienia resztami pirogronowymi może być zaniżony, ponieważ część tych podstawników pirogronowych mogła zostać usunięta podczas hydrolizy LPSu (przy użyciu 1% kwasu octowego).

IV.1.4.2 Analiza strukturalna polisacharydu O-swoistego *O. lupini* LUP21^T

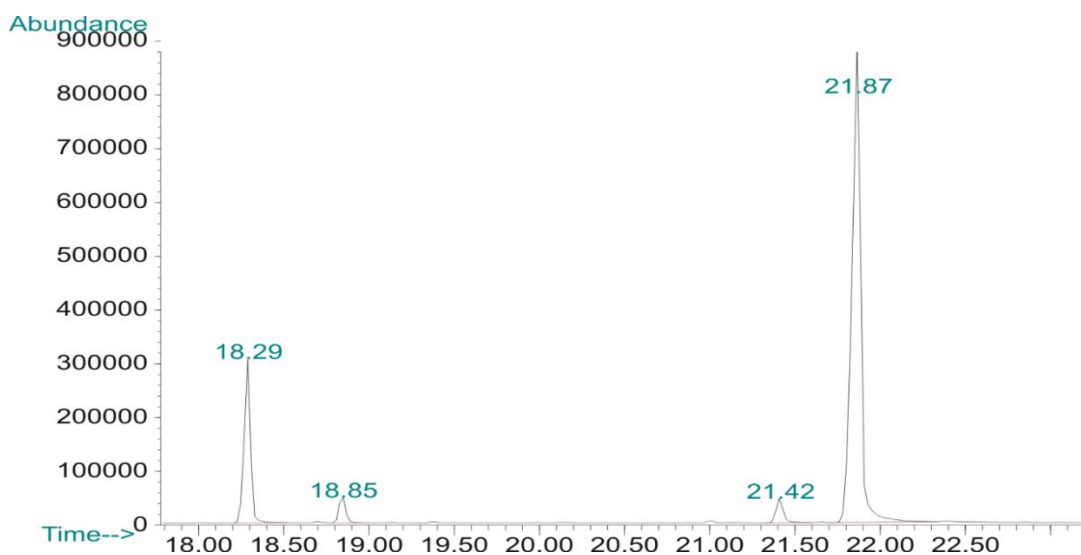
Otrzymany w wyniku łagodnej kwaśnej hydrolizy (200 mg osadu z ultrawierowania preparatu LPS *O. lupini* LUP21^T z fazy fenolowej) degradowany polisacharyd frakcjonowano na kolumnie wypełnionej złożem Sephadex G50 fine. Na podstawie wykreślonego profilu elucji wyodrębniono dwie frakcje główne (A i C), które dzieliła frakcja trzecia (B) występująca w bardzo małej ilości (**Ryc. 44**). Frakcja oznaczona jako A zawiera sacharydy wysokocząsteczkowe, natomiast frakcja C – niskocząsteczkowe.

Uzyskany profil elucji jest dość nietypowy, ponieważ pik frakcji wysokocząsteczkowej był znacznie niższy niż frakcji niskocząsteczkowej. W analizie SDS-PAGE (**Ryc. 31, str 103**) stwierdzono, że w tym preparacie dominuje frakcja gładka LPS i dlatego można było się spodziewać, że frakcja wysokocząsteczkowa będzie reprezentowana najobficiej. Wysoki pik frakcji o niskiej masie cząsteczkowej może świadczyć o postępującej, podczas łagodnej kwaśnej hydrolizy, degradacji polisacharydu O-swoistego. Wszystkie frakcje zebrano i zliofilizowano. Otrzymano kolejno: 56,8 mg frakcji A, 9,3 mg frakcji B oraz 51,88 mg frakcji C. Porównywalne ilości materiału z frakcji A i C w konfrontacji z wynikami oznaczeń kolorymetrycznych mogą wskazywać, że we frakcji A dominują związki dające słabą barwę w reakcji Dubois'a [Dubois i wsp. 1956].

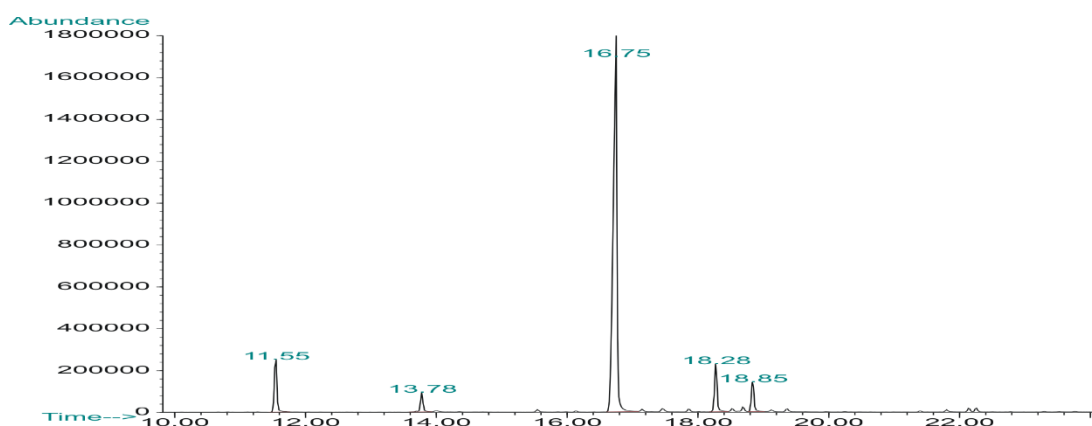


Ryc. 44. Profil elucji degradowanego polisacharydu *O. lupini* LUP21^T po rozdzieleniu na kolumnie Sephadex G50 fine przy zastosowaniu 1% kw. octowego jako eluentu.

Wszystkie frakcje przeanalizowano w kierunku ustalenia składu cukrowego. W tym celu materiały hydrolizowano przy użyciu 2M TFA w temperaturze 100°C przez 4 godziny. Otrzymane monocukry przeprowadzono w octany alditoli i analizowano przy użyciu GC-MS (**Ryc. 45 i 46**).



Ryc. 45. Chromatogram GC octanów alditoli uzyskanych z frakcji A (wysokocząsteczkowej) *O. lupini* LUP21^T. Związek o czasie retencji 18.29 min to pik inozytolu – wzorca wewnętrznego.

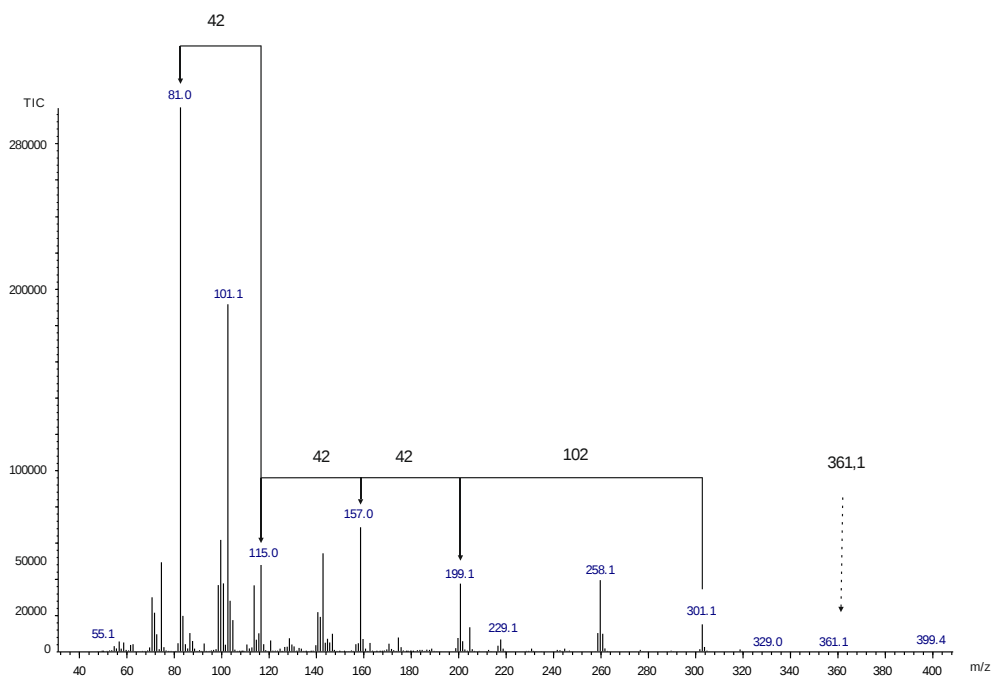


Ryc. 46. Chromatogram GC octanów alditoli uzyskanych z frakcji C (niskocząsteczkowej) *O. lupini* LUP21^T. Związek o czasie retencji 18.28 min to pik inozytolu – wzorca wewnętrznego.

Przeprowadzone analizy widm mas pozwoliły stwierdzić, że głównym składnikiem frakcji wysokocząsteczkowej jest **galaktozamina** natomiast niskocząsteczkowej – **heptuloza**. Na obecności tetraoctanu 2,7-anhydroheptulozy w preparacie octanów alditoli otrzymanych z frakcji C jednoznacznie wskazuje widmo mas (**Ryc. 47**) związku opuszczającego kolumnę chromatograficzną w 16,75 minucie analizy (**Ryc. 46**). Jon molekularny jest bardzo słabo reprezentowany na spektrum, ale

już kolejne jony powstające przez sekwencyjną eliminację z niego cząsteczek kwasu octowego (60 Da), kwasu octowego i bezwodnika octowego (102 Da), i trójkrotnie ketenu (42 Da) są dobrze widoczne. Widmo to, na podstawie automatycznego przeszukania bazy danych (NIST 0.8 MS Library), zostało wstępnie zaklasyfikowane właśnie, jako tetraoctan D-glukoheptulozy. Brak śladów redukcji oraz czas retencji (mniejszy niż czasy retencji określone dla octanów heksitoli) pozwala wnosić, że cukier jest w formie anhydro.

Ilości zidentyfikowanych składników we frakcjach A i C została zamieszczona w tabeli 15.



Ryc. 47. Widmo mas octanu „alditolu” uzyskane ze związku o czasie retencji 16,75 (Ryc. 46). Preparat octanów alditoli otrzymano z frakcji C dgPS *O. lupini* LUP 21^T.

Tabela 15. Główne składniki zidentyfikowane w preparatach degradowanego polisacharydu *O. lupini* LUP21^T otrzymanych w wyniku rozdziału na kolumnie Sephadex G50 fine. Ilość składników obliczono przy użyciu metody wzorca wewnętrznego – inozytolu.

Frakcja	L.p.	Pochodna	Czas retencji [min]	Główne jony na widmie	Ilość [μ/mg]
Frakcja A - wysokocząsteczko- wa	1	Glukozy (Glc)	18,852	73, 85, 97, 103, 110, 115, 127, 128, 139, 140, 145, 157, 170, 187, 217, 259, 289	3,793
	2	Glukozaminy (GlcN)	21,416	73, 84, 102, 114, 115, 126, 128, 139, 144, 156, 259, 318	3,71

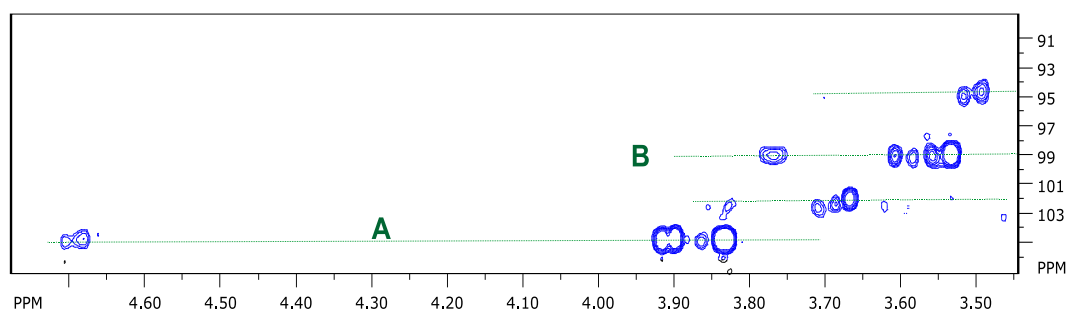
	3	Galaktozaminy (GalN)	21,873	84, 96, 102, 114, 115, 126, 138, 139, 144, 151, 156, 168, 170, 193, 198, 216, 240, 258, 300, 318	87,8
Frakcja C - niskocząsteczkowa	1	--	11.55	79, 94, 109, 110 , 121, 122, 123 , 140, 165, 169, 182, 224	23,79
	2	--	13.78	73, 85, 98, 103, 115, 116, 127, 128, 145, 157, 158, 175, 187, 200, 217	8,23
	3	Heptulozy	16.75	73, 81 , 98, 101 , 112, 115, 141, 157, 199, 258, 301	143,96
	4	Galaktozy	18.85	73, 85, 86, 97, 103, 110, 115, 116, 127, 128, 139, 145, 153, 157, 170, 187, 217, 258, 289	13,81

Informacji o ułożeniu atomów cząsteczki heptulozy dostarczyły analizy 1D i 2D NMR. Preparat frakcji niskocząsteczkowej (C) dgPS LPS *O. lupini* LUP21^T, po wstępnym podstawieniu labilnych protonów deuterem, rozpuszczono w ciężkiej wodzie (99,98% D₂O) i umieszczono w polu magnetycznym spektrometru Varian Unity plus 500. Wyniki analiz ilustrują ryciny **49** i **48**. O przynależności związków obecnych w tym preparacie do grupy ketoz świadczy obecność sygnałów pochodzących od czwartorzędowych atomów węgla na widmie HMBC. Sygnały te zostały przyporządkowane atomom węgla w pozycji C-2 w rozpatrywanych węglowodanach (**Tabela 16A**). Na podstawie otrzymanych widm (głównie na podstawie widma HMBC (**Ryc. 48**)) można także wnosić, że preparat zawiera co najmniej cztery składniki/związki powstałe w trakcie uwalniania (przy użyciu 1% kwasu octowego) omawianego cukru z LPS. Dwa z nich to składniki dominujące w preparacie. Sygnały korelacyjne dla dwóch kolejnych, zidentyfikowane w rejonie anomerycznym, zaznaczono liniami przerywanymi na widmie HMBC (**Ryc. 48**). Główne składniki oznaczono jako układy spinowe **A** i **B**. Wartości przesunięć chemicznych tych wyodrębnionych układów zebrano w **tabeli 16A**. Wartości protonowych przesunięć chemicznych układu spinowego **A** są praktycznie identyczne z podanymi w bazie SDBS [Spectral Database for Organic Compounds; <https://sdb.sdb.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, date of access)) dla 2,7-anhydro-D-*altro*-heptulopiranozy. Na układ piranozowy pierścienia heptulozy wskazują korelacje AH6/AC2 i AH6'/AC2,

a dowód na wiązanie 2,7-anhydro to korelacja **AH7/AC2** (wszystkie na widmie heterokorelacyjnym dalekiego zasięgu, HMBC). Związek/układ spinowy **B** ma protonowe i węglowe przesunięcia chemiczne zbliżone (oprócz węgla anomerycznego) do sedoheptulozy opisanej przez Bock'a i wsp. [1994] w pracy poświęconej LPS *V. cholerae* H11 (non-01). Korelacja **BH5/BC2** świadczy o pierścieniu furanozowym, zaś brak oddziaływania nOe między protonami **BH1** i **BH3** wskazuje na anomer α (w przeciwnym wypadku bliskość przestrzenna protonów H1 i H3 sprawia, że pojawia się sygnał oddziaływania dipolarnego). Uwolniona w trakcie łagodnej kwaśnej hydrolizy sedoheptuloza w wyniku mutarotacji powinna być w roztworze wodnym (tutaj D₂O) zarówno w konfiguracji anomerycznej α jak i β . Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że w badanym układzie dominuje anomer α . Ze względu na niewielką ilość pozostałych form związku w tym prawdopodobnie i drugiego anomeru (sygnały o niewielkiej intensywności) pozostałe układy spinowe zostały pominięte w analizie. Należy także nadmienić, że we frakcji niskocząsteczkowej nie wykryto di- tri- i wyższych oligosacharydów. Ten wniosek znalazł potwierdzenie w analizie metylacyjnej całego LPS LUP21^T. W produktach metylacji wykryto jedynie w pełni metylowaną pochodną heptulozy (danych nie zamieszczono).

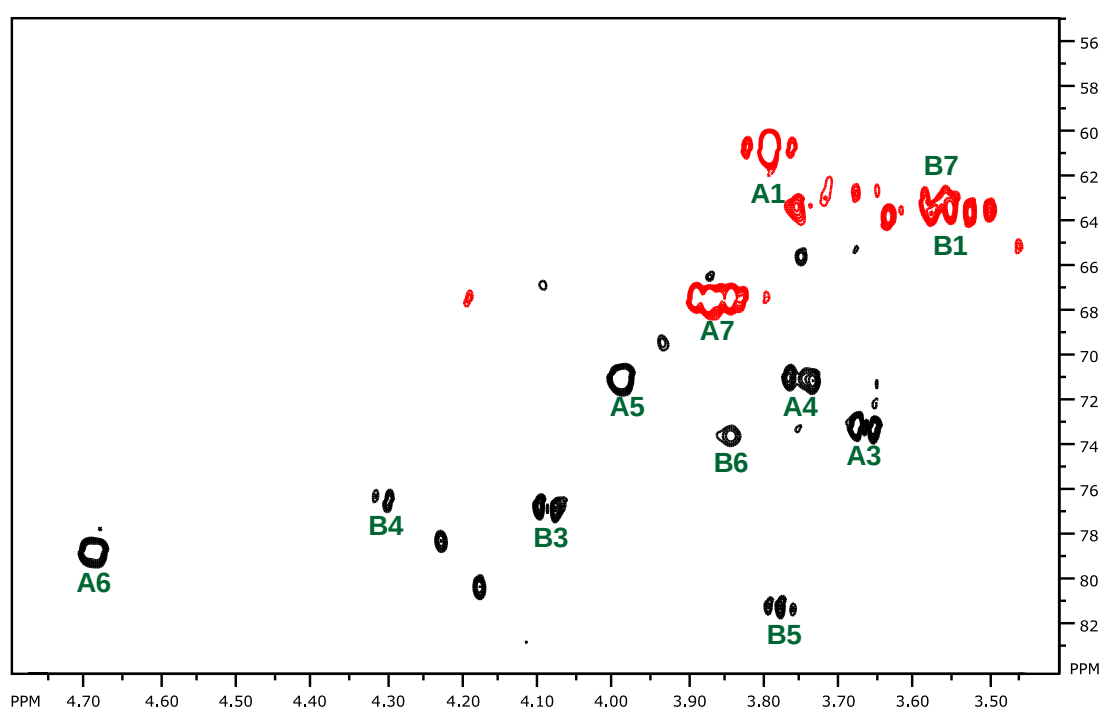
Tabela 16A. Protonowe i węglowe przesunięcia chemiczne (ppm) dla wybranych związków zawartych we frakcji C. Frakcja C została otrzymana w wyniku chromatograficznego rozdzielania (GPC) degradowanego polisacharydu uzyskanego z LPS *O. lupini* LUP21^T.

Pozycja Atom	1	2	3	4	5	6	7
	Układ spinowy A						
H	3,850	-----	3,668	3,761	4,002	4,687	3,905; 3,873
C	60,60	104,72	73,21	70,99	71,05	78,81	67,36
	Układ spinowy B						
H	3,590; 3,520	-----	4,087	4,299	3,761	3,843	3,770; 3,592
C	63,61	98,93	77,00	76,52	81,40	73,70	63,35



Ryc. 48. Fragment (obszar anomerycznych przesunięć węglowych) widma HMBC preparatu frakcji C dgPS *O. lupini* LUP21^T. Pełny opis wybranych układów spinowych (A i B) zawiera **Tabela 16A**.

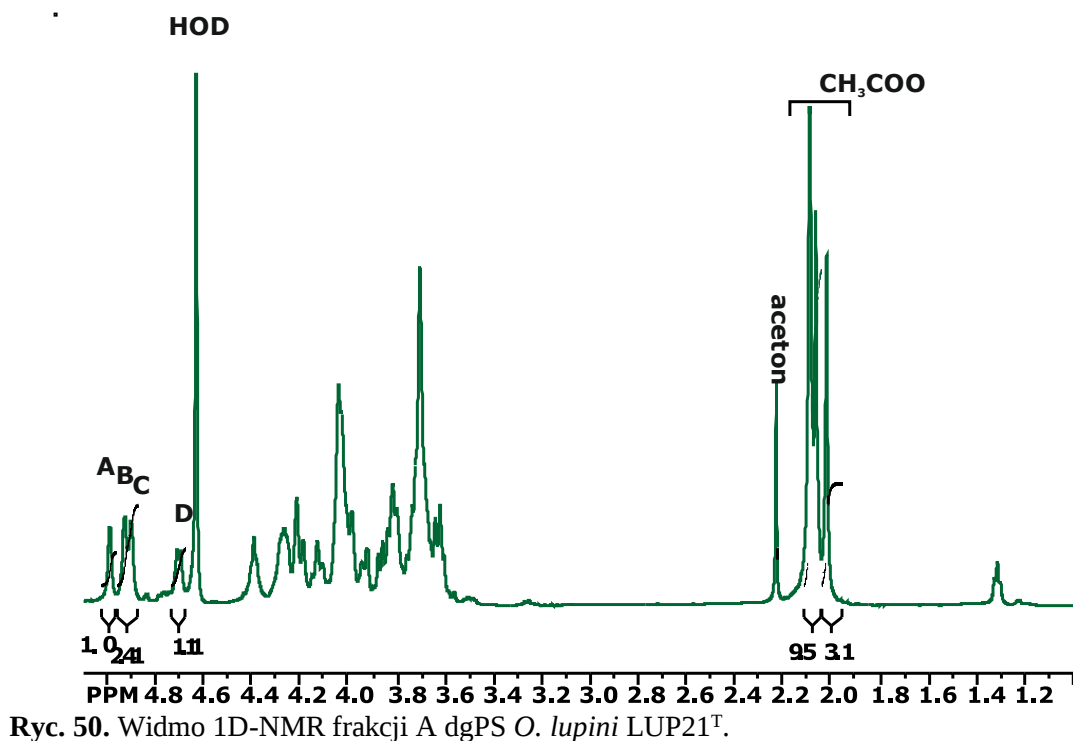
Podsumowując powyższe analizy należy stwierdzić, że łańcuch O-swoisty LPS *O. lupini* LUP21^T jest podstawiony cząsteczkami α lub β sedoheptulozy związanymi ketozydowo. Labilny charakter wiązań ketozydowych tłumaczy, dlaczego jest ona bardzo łatwo tracona w trakcie procedury uwalniania lipidu A z LPS LUP21^T.



Ryc. 49. Fragment widma HSQC preparatu frakcji C dgPS *O. lupini* LUP21^T. Pełny opis wybranych układów spinowych (A, B) zawiera **tabela 16A**.

Danych na temat struktury łańcucha O-swoistego LPS *O. lupini* LUP21^T dostacza analiza frakcji wysokocząsteczkowej dgPS(frakcji A). Jak już wspomniano powyżej w tej frakcji wykryto tylko galaktozaminę. Analiza metylacyjna tego preparatu pozwoliła ustalić, że GalN jest podstawiona w pozycjach C-2 lub C-6 (danych nie zamieszczono). Metodą chromatografii gazowej ustalono również, że GalN ma konfigurację absolutną D. Dysponując takimi wstępnymi informacjami

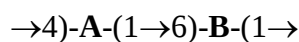
przystąpiono do analizy widm 1D i 2D NMR tego preparatu. Analiza rejonu anomerycznego (**Ryc. 50**) prowadzi do wniosku, że badany polimer zbudowany jest z czterech podjednostek cukrowych. Występują one w porównywalnych ilościach (na co wskazują wartości integracji kolejnych sygnałów anomerycznych (A:B:C:D - 1,00:2,41:1,11, **Ryc. 50**). Sygnały oznaczone literami A, B, C są szerokimi singletami zaś sygnał D to dublet. Tak więc monocukry A, B, C to α anomery, a D jest β anomerem. Potwierdzeniem powyższych wniosków są zmierzone wartości sprzężeń $J_{H1,H2}$ oraz $J_{C1,H1}$. Wartości te zestawiono w drugiej kolumnie **tabeli 16B**. Kolejnym dowodem na poprawność powyższego wnioskowania są sygnały korelacyjne obserwowane na widmie NOESY (wyniki zestawiono w **tabeli 16C**). W tym polimerze nie stwierdzono też obecności podstawników nie cukrowych za wyjątkiem reszt acetylowych podstawiających grupy aminowe GalN. Liczba i intensywność sygnałów pochodzących od grup acetylowych jest w idealnej zgodności z ilością i intensywnością sygnałów anomerycznych. Daje to podstawę do stwierdzenia, że polimer jest zbudowany nie z D-GalN tylko z D-GalNAc.



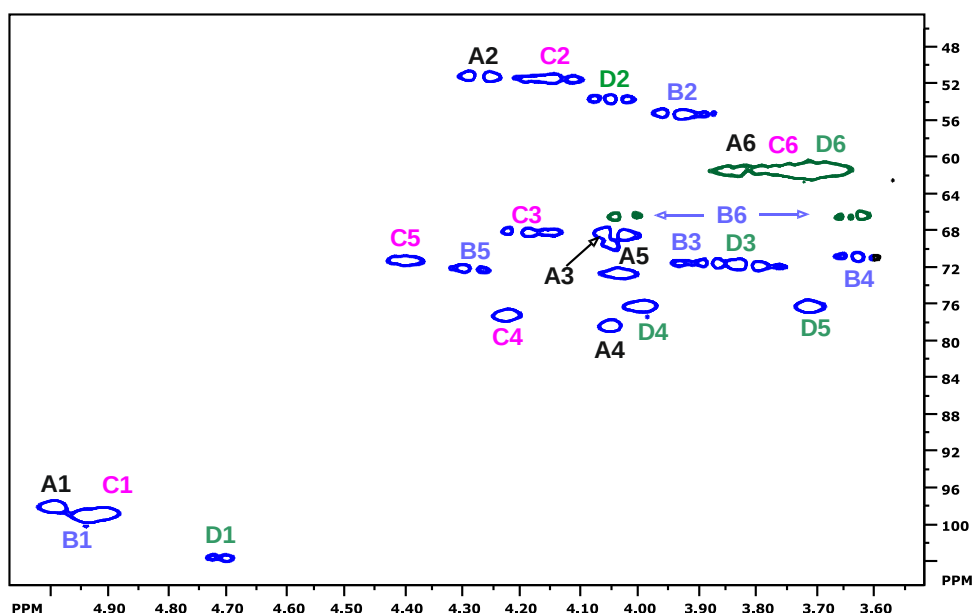
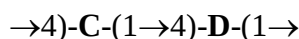
Ryc. 50. Widmo 1D-NMR frakcji A dgPS *O. lupini* LUP21^T.

Wykorzystując widma dwuwymiarowe ^1H - ^1H DQF-COSY, TOCSY, NOESY oraz widma heteronuklearne ^1H - ^{13}C HMQC, deptHSQC (**Ryc. 51**) i HMBC przypisano czterem układom spinowym (A, B, C, D) odpowiednie przesunięcia chemiczne zarówno protonowe jak i węglowe. Wyniki tych analiz zostały zestawione

w **tabeli 16B**. Analiza tych danych wskazuje, że α -D-GalNAc (**A**) jest podstawiona w pozycji C-4. Identycznie podstawiony jest monosacharyd **C** i **D** (odpowiednio: α -D-GalNAc i β -D-GalNAc). Natomiast przesunięcie chemiczne atomów węgla w pozycji **BC-6** jest o ok. 4,50 ppm większe niż ma to miejsce w przypadku α -D-GalNAc niepodstawionej, co jednoznacznie wskazuje na wiązanie typu (1→6). Kolejność podjednostek monocukrowych w polimerze została ustalona na podstawie korelacji dalekiego zasięgu (widmo HMBC) protonów anomerycznych. Zidentyfikowane oddziaływania zestawiono w **tabeli 16C**. Te, które wskazują na typ wiązań glikozydowych (oddziaływania wychodzące na zewnątrz systemów spinowych) zostały zaznaczone pogrubioną czcionką. Wyniki z **tabeli 16C** dowodzą, że podjednostka α -D-GalNAc (**A**) łączy się wiązaniem glikozydowym typu (1→6) z α -D-GalNAc (**B**), a ta z kolei z podjednostką α -D-GalNAc (**A**) wiązaniem typu (1→4) itd. Tak więc systemy spinowe **A** i **B** tworzą polimer, którego powtarzającą się podjednostką jest dwucukier o następującej strukturze:



Analogiczne rozumowanie prowadzi do ustalenia połączeń między podjednostkami **C** oraz **D**:



Ryc. 51. Fragment widma deptHSQC frakcji A dgPS *O. lupini* LUP21^T. Protonowe i węglowe przesunięcia chemiczne układów spinowych A, B, C, D zebrano w **Tabeli 16B**.

Tabela 16B. Protonowe i węglowe przesunięcia chemiczne (ppm) dla wybranych związków zawartych we frakcji A (wysokocząsteczkowej). Frakcja A została otrzymana w wyniku rozdziału chromatograficznego (GPC) degradowanego polisacharydu uzyskanego z LPS *O. lupini* LUP21^T.

System spinowy	$J_{C1,H1}$ $J_{H1,H2}$	H1 C1	H2 C2	H3 C3	H4 C4	H5 C5	H6/H6' C6	Ac-N-
A →4)α-D-GalNAc(1→	2,2 Hz	4,999	4,268	4,044	4,048	4,029	3,627/3,867	2,085
	173,6 Hz	98,13	51,06	68,19	78,28	72,55	61,48	22,79 175,28
B →6)α-D-GalNAc(1→	2,5 Hz	4,937	3,935	3,856	3,624	4,280	3,636/4,013	2,082
	174,8 Hz	99,37	55,03	71,51	70,71	72,16	66,10	22,79 175,00
C →4)α-D-GalNAc(1→	2,8 Hz	4,915	4,128	4,207	4,226	4,399	3,677/3,817	2,060
	172,8 Hz	98,91	51,33	68,03	77,06	71,09	61,22	23,00 175,43
D →4)α-D-GalNAc(1→	7,8 Hz	4,714	4,049	3,812	3,988	3,709	3,675/3,693	2,015
	163,2 Hz	103,85	53,61	71,73	76,10	76,17	61,59	23,18 176,26

Tabela 16C. Sygnały korelacyjne dla protonów anomerycznych z preparatu frakcji A zaobserwowane na widmach NOESY i HMBC.

System spinowy i proton anomeryczne	nOe	HMBC
AH1	AH2 BH6', BH6	AC3 AC5 BC6
BH1	BH2 AH4	BC3 BC5 AC4
CH1	CH2 DH4	CC3 CC5 DC4
DH1	DH3 DH5 CH4	DC3 DC5 CC4
Pogrubiono oddziaływania skalarne (HMBC) i dipolarne (nOe) wskazujące na rodzaj wiązań glikozydowych występujących w badanych polisacharydach.		

Zaprezentowane wyniki analizy frakcji wysokocząsteczkowej dgPS *O. lupini* LUP21^T jednoznacznie wskazują, że lipopolisacharydy tych bakterii mają dwa typy łańcuchów O-swoistych. W warunkach hodowli laboratoryjnej *O. lupini* LUP21^T syntetyzuje porównywalne ilości obu wariantów O-PL. O powyższym świadczy proporcja ilości składników jednego z polisacharydów (A + B) do ilości składników tworzących drugi polimer (C + D) wyliczona w oparciu o widmo 1D NMR (**Ryc. 50**). Wartość liczbową tej proporcji (A + B)/(C + D) wynosi 1/1. Jak stwierdzono powyżej, cząsteczki LPSu *O. lupini* LUP21^T zawierają sedoheptulozę. Jej ilość jest porównywalna i z ilością galaktozaminy (D-*altro*-heptuloza:GalN - ~1:1, **Tabela 10**). Taka ilość sedoheptulozy może wynikać z podstawienia jedną cząsteczką heptulozy

każdej GalN w polimerach łańcucha głównego O-antygeny. Inny wariant to podstawienie co drugiej cząsteczki GalN dwiema resztami sedoheptulozy. Dotychczas podjęte próby określenia lokalizacji sedoheptuloz w łańcuchach poligalaktozaminowych O-antygenów oparte na analizie metylacyjnej oraz analizie widm 1D i 2D NMR całego LPS nie przyniosły zadowalających rezultatów. Prace nad dokończeniem badań strukturalnych będą dalej prowadzone.

IV.2 ANALIZA PERYPLAZMATYCZNYCH GLUKANÓW SZCZEPÓW

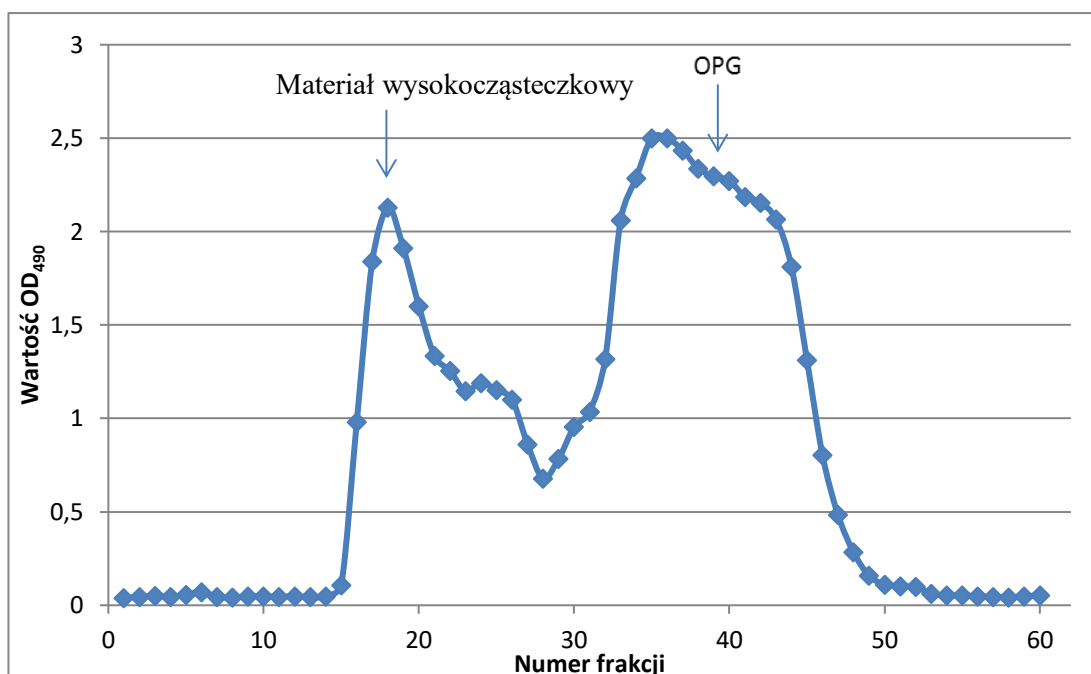
O. CYTISI I O. LUPINI

IV.2.1 Otrzymanie i oczyszczenie preparatów glukanowych

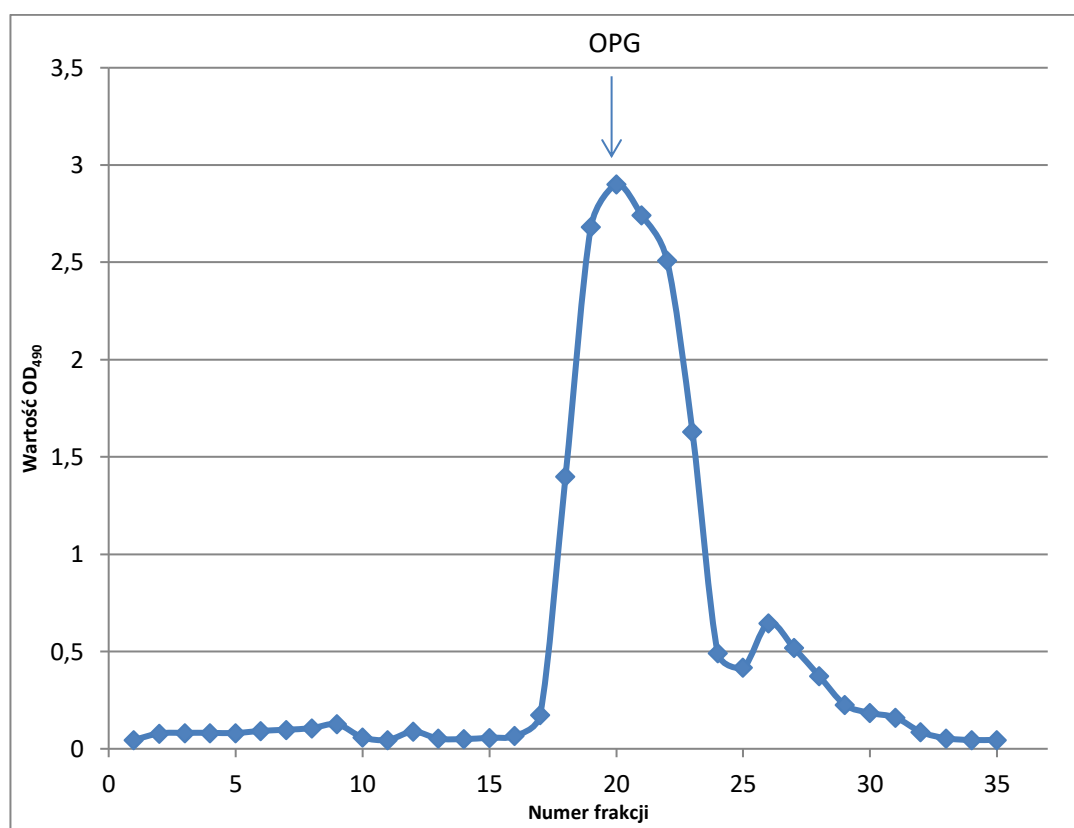
Glukany zostały uwolnione z przestrzeni peryplazmatycznej podczas delipidacji masy komórkowej metodą Bligh-Dyer [1959]. Otrzymane w powyższy sposób fazy wodne zawierały glukany, natomiast w fazach organicznych znalazły się fosfolipidy i inne związki o charakterze lipidowym. Preparaty glukanów frakcjonowano przy użyciu chromatografii żelowej na kolumnie wypełnionej Sephadexem G50 fine. Kolumnę przemywano wodnym roztworem octanu amonu (0,15 M, pH 7) z dodatkiem 7% propanolu-1. W wycieku z kolumny oznaczano zawartość składników cukrowych używając metody Dubois (**Ryc. 52 i 53**) [Dubois i wsp., 1956]. Zebrane frakcje poddano dializie wobec wody destylowanej, a następnie liofilizacji. Ilości uzyskanych materiałów zestawiono w **tabeli 17**.

Tabela 17. Ilość materiału glukanowego uzyskanego na drodze rozdziału i oczyszczania preparatu z fazy wodnej uzyskanej w trakcie delipidacji bakterii metodą Bligh-Dyer'a.

Szczep	Frakcja	Masa [mg]
<i>O. cytisi</i> ESC1 ^T	Glukan (OPG)	52,9
<i>O. lupini</i> LUP21 ^T	Glukan (OPG)	637,6



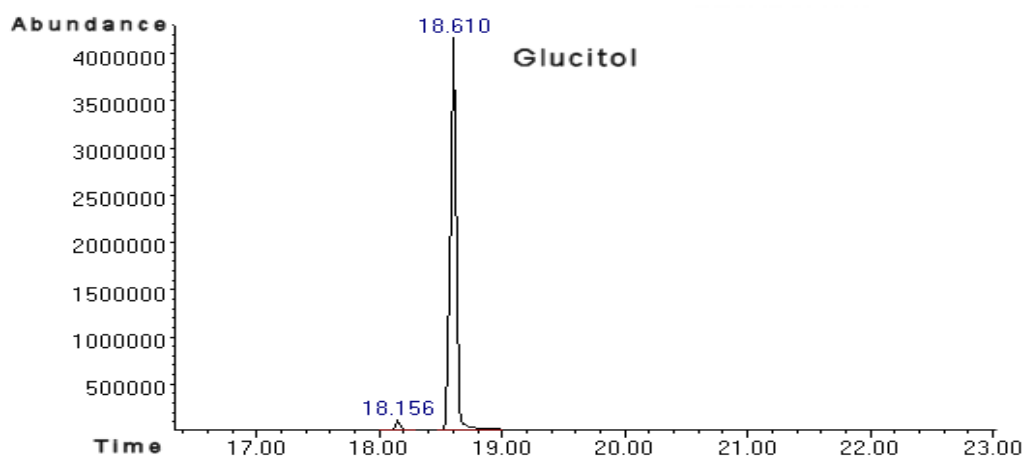
Ryc. 52. Profil elucji preparatu glukanowego *O. cytisi* ESC1^T rozdzielanego na kolumnie wypełnionej Sephadexem G50f. Solwent: 0,15M octan amonu w 7% propanolu. Probówki o numerach od 15 do 22 materiał wysokocząsteczkowy (prawdopodobnie szorstka frakcja LPS *O. cytisi* ESC1^T), probówki o numerach od 31 do 49 glukan (OPG). Do kolejnych probówek zbierano po 100 kropeł eluatu.



Ryc. 53. Profil elucji preparatu glukanowego *O. lupini* LUP21^T rozdzielanego na kolumnie wypełnionej Sephadexem G50 fine. Solwent 0,15M octan amonu, w 7% propanolu. OPG-frakcje zawierające glukan. Zbierano po 200 kropli eluatu do kolejnych probówek.

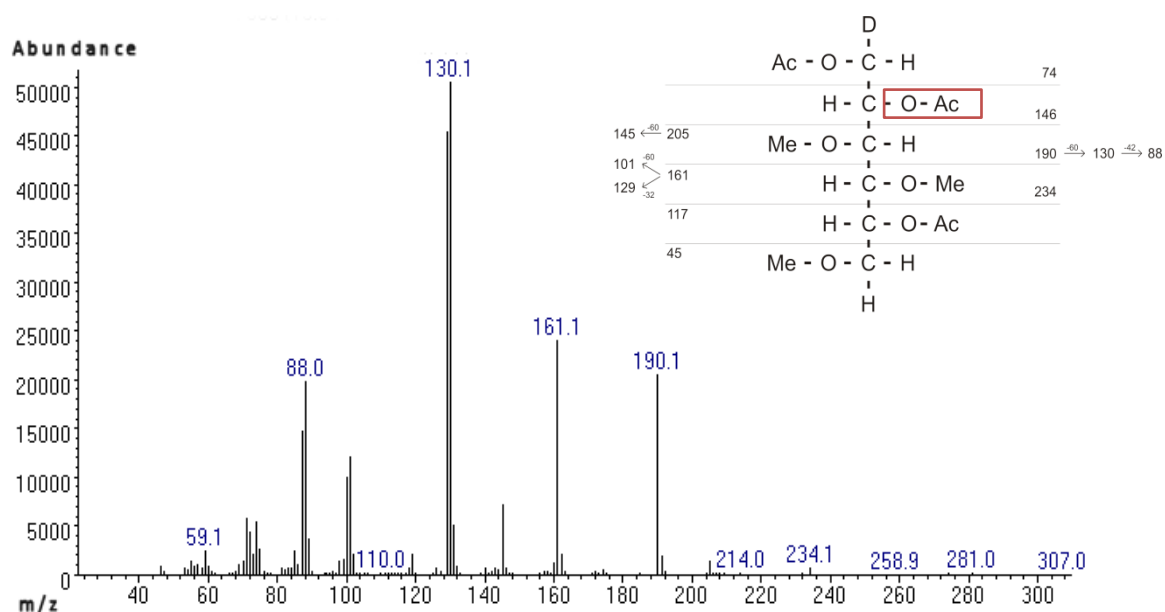
IV.2.2 Określenie składu cukrowego oraz wiązań w cząsteczkach glukanów

Otrzymane preparaty glukanowe poddano hydrolizie w 2 M TFA w 100°C przez 4 godziny, następnie redukcji borowodorkiem sodu i kolejno peracetylacji. Otrzymane octany alditoli analizowano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Próbkę analizowaną była w obecności wzorca wewnętrznego (inozytol). Oba chromatogramy zawierały pojedyncze piki o czasie retencji około 18,6 min. Stwierdzono, że w obu preparatach glukanowych jedynym składnikiem cukrowym jest glukoza (**Ryc. 54**).



Ryc. 54. Chromatogram gazowy octanów alditoli otrzymanych z preparatu glukanu *O. cytisi* ESC1^T. Związek o czasie retencji 18.156 min to pik wzorca wewnętrznego – inozytolu; natomiast 18.610 min to sygnał pochodzący od peracetylowanego glucitolu.

W celu ustalenia typu wiązań pomiędzy poszczególnymi monomerami w preparatach glukanowych wykonano analizę metylacyjną wg. procedury Hakomori [1964]. Otrzymane metylowane pochodne oligosacharydów hydrolizowano w 2M TFA, redukowano borodeuterkiem oraz acetylowano w celu zablokowania uwolnionych grup hydroksylowych. Preparaty analizowano metodą GC-MS. Oba chromatogramy zawierały pojedyncze piki o czasie retencji 13,56 min. Analizując ich widma mas stwierdzono, że sygnały te odpowiadają 1,2,5-O-Ac₃-3,4,6-O-Me₃-glucitolowi. Schemat fragmentacji na przykładzie preparatu uzyskanego z *O. cytisi* ESC1^T przedstawiono na **rycinie 55**.



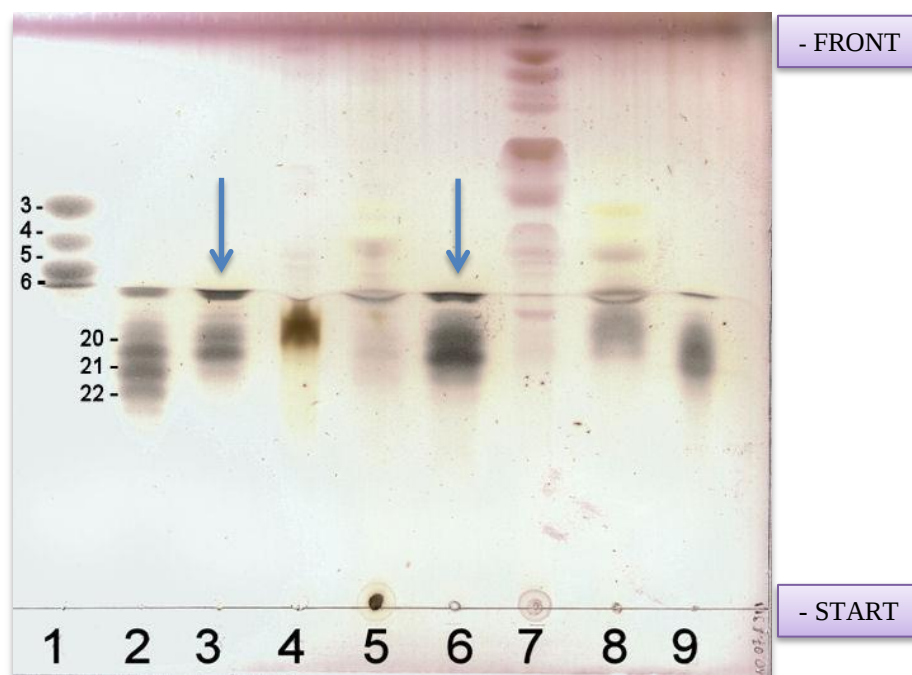
Ryc. 55. Preparat glukanowy z *O. cytisi* ESC1^T- widmo mas i schemat fragmentacji związku o czasie retencji 13,56 min. (1,2,5-O-Ac₃-3,4,6-O-Me₃-glucitolu). Czerwoną ramką zaznaczono pozycję wiązania glikozydowego.

Na obu widmach widoczne są jony pierwszorzędowe m/e 161, 190, 205 i 234. Jony te powstają poprzez rozerwanie wiązań pomiędzy węglami w cząsteczce glucitolu. Na przykład jony m/e 161 i 190 powstają w wyniku rozerwania wiązania pomiędzy C-3 i C-4. Widoczny na obu widmach najbardziej intensywny jon m/e 130 jest jonem drugorzędowym, powstałym z jonu m/e 190 w wyniku eliminacji kwasu octowego. Z jonu m/e 161 również poprzez eliminację kwasu octowego powstaje jon m/e 101. Jon m/e 129 to także jon drugorzędowy powstały z jonu m/e 161 po odłączeniu metanolu.

Reasumując, na podstawie analizy metylacyjnej stwierdzono, że grupa OH przy węglu C-2 jest miejscem przyłączenia kolejnej podjednostki cukrowej. Cząsteczki glukozy w oligomerze połączone są wyłącznie wiązaniami (1→2)glikozydowymi. Nie stwierdzono występowania w pełni metylowanych pochodnych glukozy, ani glukozy mogących być bocznymi odgałęzieniami głównego łańcucha glukanu. Może to sugerować, że cząsteczka glukanu jest cykliczna i nierozgałęziona.

IV.2.3 Analiza TLC preparatów glukanowych

Przeprowadzona analiza preparatów *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej wykazała obecność 5 frakcji oligocukrowych w obu badanych preparatach. Jako wzorców użyto preparatu Oligomix (Ice) będącego mieszaniną wzorcowych maltodekstryn zawierających od 3 do 6 reszt cukrowych oraz preparatu peryplazmatycznych glukanów wyizolowanych z *Mesorhizobium huakuii* 15243^T, który zawiera głównie glukany będące polimerami zbudowanymi z 20-22 reszt glukozy [Choma i Komaniecka, 2003]. W wyniku analizy oszacowana została ilość monomerów, które tworzą cząsteczki OPG *O. cytisi* i *O. lupini*. Wykazano że peryplazmatyczne glukany *Ochrobactrum* są oligomerami o zbliżonej liczbie glukozy w cząsteczce do glukanów *M. huakuii*. (Ryc. 56).



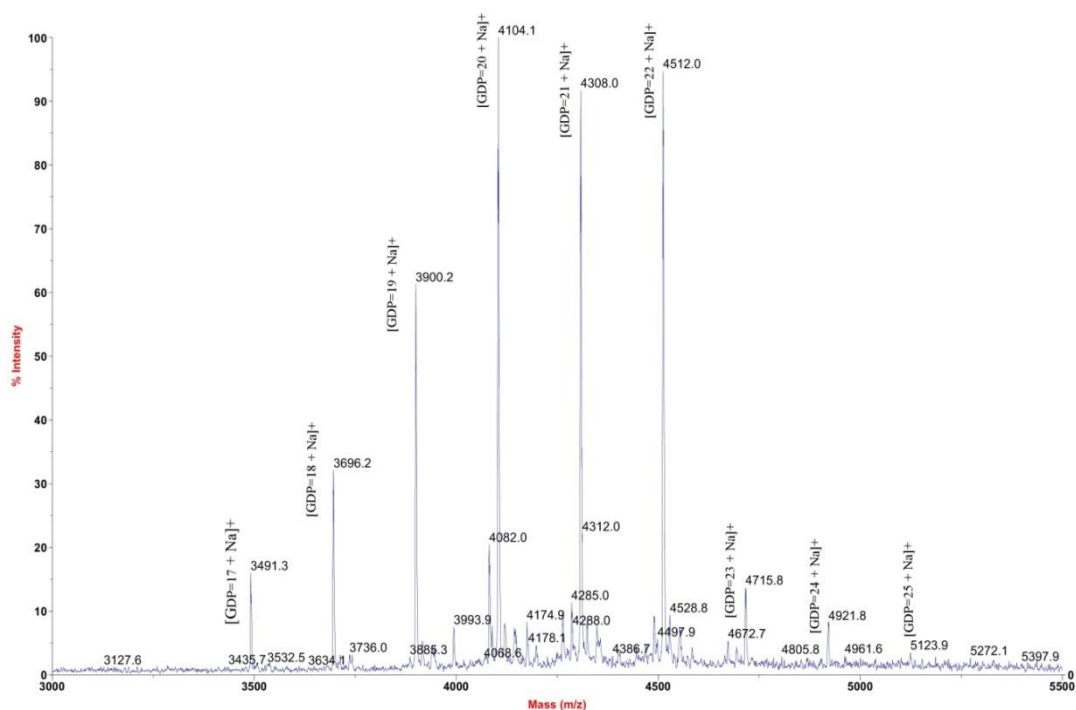
Ryc. 56. Chromatogram TLC wywołany metodą zwęglania przy użyciu stężonego H₂SO₄. **Ścieżka 1.** Preparat Oligomix - oligosacharydy wzorcowe, cyfry 3-6 oznaczają ilość reszt cukrowych poszczególnych maltodekstryn. **Ścieżka 2.** Preparat glukanów wyizolowany z *M. huakuii* 15243^T, cyfry 20, 21 i 22 oznaczają stopień polimeryzacji glukanu. **Ścieżka 3.** *O. cytisi* ESC1^T – glukan, naważka 2µg. **Ścieżka 4.** *O. cytisi* ESC1^T – frakcja wysokocząsteczkowa uzyskana z rozdzielu na kolumnie wypełnionej Sephadex G50f, 2 µg. **Ścieżka 5.** *O. cytisi* ESC1^T – frakcja niskocząsteczkowa z kolumny G50f, 2 µg. **Ścieżka 6.** *O. lupini* LUP21^T – glukan, 2 µg. **Ścieżka 7.** *O. lupini* LUP21^T – frakcja tzw wysokocząsteczkowa uzyskana z rozdzielu na kolumnie wypełnionej Sephadex G50f, 2 µg. **Ścieżka 8.** *O. lupini* LUP21^T – materiał niskoocząsteczkowy z kolumny G50f, 2 µg. **Ścieżka 9.** *O. lupini* LUP21^T – glukan O-deacylowany, 2 µg. Układ TLC zastosowany do rozdzielu oligosacharydów został opisany w Rozdziale III.2.11.2.

IV.2.4 Analiza MALDI-TOF preparatów glukanowych

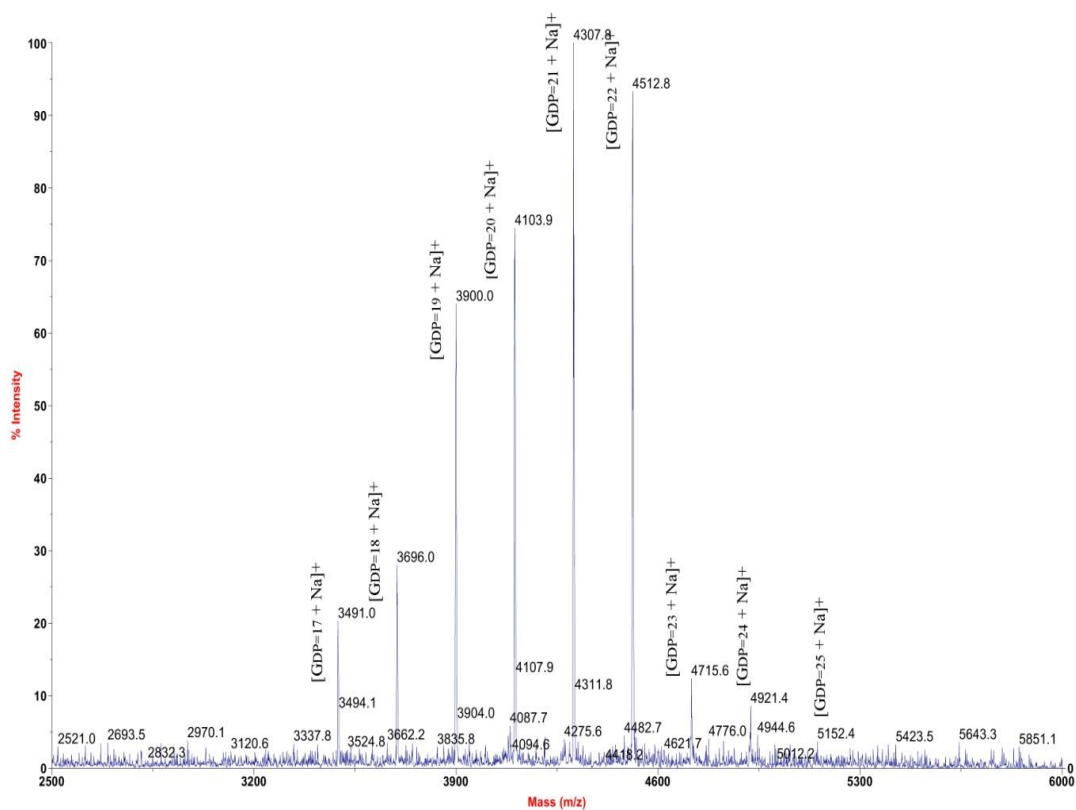
Spektrometria mas jest dogodną techniką analityczną umożliwiającą dokładny pomiar masy cząsteczkowej badanego preparatu. W wyniku analizy niezależnie od stosowanego spektrometru wyznaczony zostaje stosunek masy do ładunku (m/z). Jedną z częściej stosowanych konfiguracji spektrometrów mas jest połączenie źródła jonów MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*) i detektora czasu przelotu TOF (*Time-of-Flight*). Technika ta umożliwia bezpośrednią analizę składu populacji cząsteczek o dużych masach cząsteczkowych, takich jak mieszaniny białek, oligo- i polisacharydów. Technika ta pozwala również określić ilość podjednostek w polimerze.

W przypadku badanych preparatów glukanowych *Ochrobactrum* metoda ta pozwoliła określić wielkość pierścienia oligosacharydowego. Celem zwiększenia lotności, preparaty przeznaczone do analizy poddano metylacji. Sygnały na widmach mas rozłożone są równomiernie, a odległości pomiędzy nimi wynoszą 204 Da. W związku z tym kolejne cząsteczki metylowanego glukanu różnią się od siebie masą w pełni metylowanej podjednostki glukozowej.

Na widmie jonów dodatnich preparatu glukanowego *O. cytisi* ESC1^T można zaobserwować cały szereg jonów, z których najmniejszy ma wartość m/e 3491 i odpowiada cząsteczce zbudowanej z 17 reszt glukozy. Najintensywniejszy jest jon o wartości m/e 4104 odpowiadający pierścieniowi złożonemu z dwudziestu cząsteczek glukozy, a najcięższy to jon (m/e 5124) zbudowany jest z 25 reszt glukozy (**Ryc. 57**). Oprócz powyższych jonów widoczne są również jony o wartościach m/e równych 3696, 3900, 4308, 4512, 4715, 4921 odpowiadające jonom powstałym w wyniku przyłączenia Na⁺ do oligomerów glukanowych zawierających kolejno 18, 19, 21, 22, 23 i 24 glukoz.



Ryc. 57. Widmo jonów dodatnich metylowanego preparatu glukanu *O. cytisi* ESC1^T otrzymane techniką MALDI-TOF (GDP = stopień polimeryzacji glukozy).



Ryc. 58. Widmo jonów dodatnich preparatu metylowanego glukanu *O. lupini* LUP21^T otrzymane techniką MALDI-TOF (GDP= stopień polimeryzacji glukozy).

Z kolei na widmie jonów dodatnich otrzymanym z preparatu metylowanego *O. lupini* LUP21^T widoczne są sygnały znajdujące się w obszarze od m/e 3491 do 4921,4 (**Ryc. 58**). Jony o najmniejszej i największej wartości m/e analogicznie, jak u *O. cytisi* odpowiadają cząsteczkom zbudowanym z 17 i 24 reszt glukozy. Najintensywniejszy jest jon o wartości m/e 4307 odpowiadający 21 resztom glukozy. Dane opisujące badane preparaty glukanowe zebrano w **tabeli 18**.

Tabela 18. Wartości mas cząsteczkowych dla poszczególnych pierścieni glukanowych *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T. (preparaty poddane analizie były uprzednio metylowane)

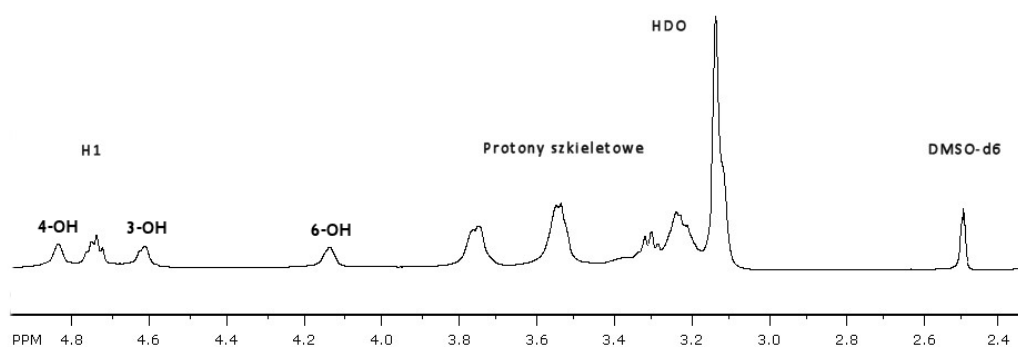
Szczep	Obserwowane jony $[M+Na]^+$ $[m/e]$	Masa jonu obliczona teoretycznie $[Da]$	Różnica [%]	Stopień polimeryzacji (dp)
<i>O. cytisi</i> ESC1 ^T	3491,3	3492,68531	0,40	17
	3696,2	3696,78508	0,16	18
	3900,2	3900,88485	0,18	19
	4104,1	4104,98462	0,22	20
	4308,0	4309,08439	0,25	21
	4512,0	4513,18416	0,26	22
	4715,8	4717,28393	0,31	23
	4921,8	4921,38370	-0,08	24
<i>O. lupini</i> LUP21 ^T	3491,0	3492,68531	0,48	17
	3696,0	3696,78508	0,21	18
	3900,0	3900,88485	0,23	19
	4103,9	4104,98462	0,26	20
	4307,8	4309,08439	0,30	21
	4512,8	4513,18416	0,09	22
	4715,6	4717,28393	0,36	23
	4921,4	4921,38370	0,00	24

Wyniki analiz glukanów metodą MALDI-TOF obu szczepów pokrywają się z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi metodą TLC. Interesujący jest fakt, że oba widma MALDI nie przedstawiają typowego rozkładu mas glukanów (jaki dla przykładu ma preparat OPG pozyskany z *Sinorhizobium meliloti*). Cząsteczek glukanu zbudowanych z więcej niż 22 reszty glukozy i kolejnych jest znacząco mniej. Może to świadczyć o tym, że tego typu struktury są tworzone sporadycznie przez *Ochrobactrum*.

IV.2.5 Analizy NMR peryplazmatycznych glukanów

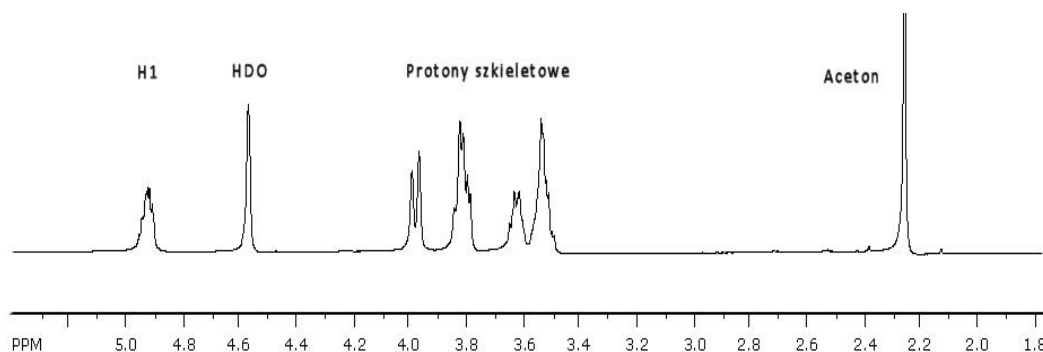
Określenie struktury peryplazmatycznych glukanów *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T przy wykorzystaniu danych NMR rozpoczęto od analizy widm jednowymiarowych. W celu przygotowania glukanów do analiz NMR preparat *O. cytisi* rozpuszczono w DMSO-d₆ natomiast preparat *O. lupini* w D₂O.

Na zarejestrowanym widmie ¹H-NMR *O. cytisi* w obszarze 4,73-4,76 ppm widoczne są sygnały pochodzące od anomerycznego protonu glukozy (H1). Wartości te są charakterystyczne dla protonów anomerycznych glukozy o konfiguracji β. Sygnały w obszarze 3,1-3,9 ppm pochodzą od protonów szkieletowych. Dodatkowo na widmie widoczne są sygnały pochodzące od grup hydroksylowych (**Ryc. 59**).



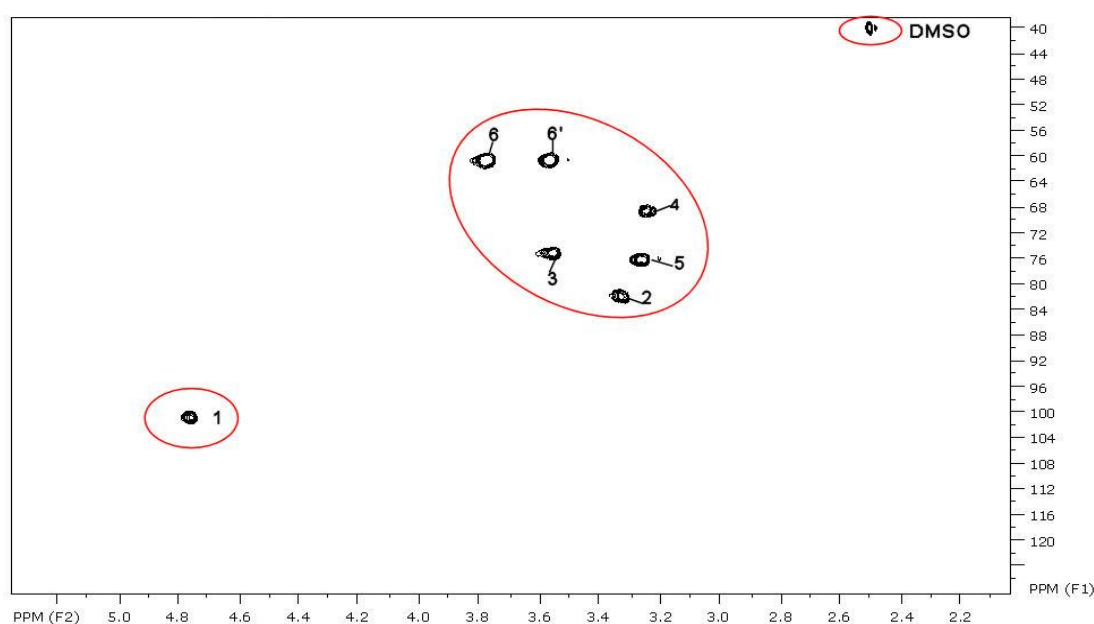
Ryc. 59. Widmo ¹H-NMR glukanu *O. cytisi* ESC1^T rozpuszczonego w DMSO-d₆.

Na zarejestrowanym widmie protonowym *O. lupini* LUP21^T (**Ryc. 60**) sygnał o δ 4,92 ppm odpowiada protonowi anomerycznemu glukozy. Takie przesunięcia mają protony anomeryczne glukozy o konfiguracji β. Sygnały w obszarze 3,5-4,0 ppm pochodzą od tzw. protonów szkieletowych. Nieobecność sygnałów w obszarze od 0-3,4 ppm świadczy o braku podstawników niecukrowych w cząsteczce glukanu. Na fakt, iż cząsteczka glukanu nie jest podstawiona wskazywały również wcześniej przedstawione wyniki (**Ryc. 56, 57, 58**).



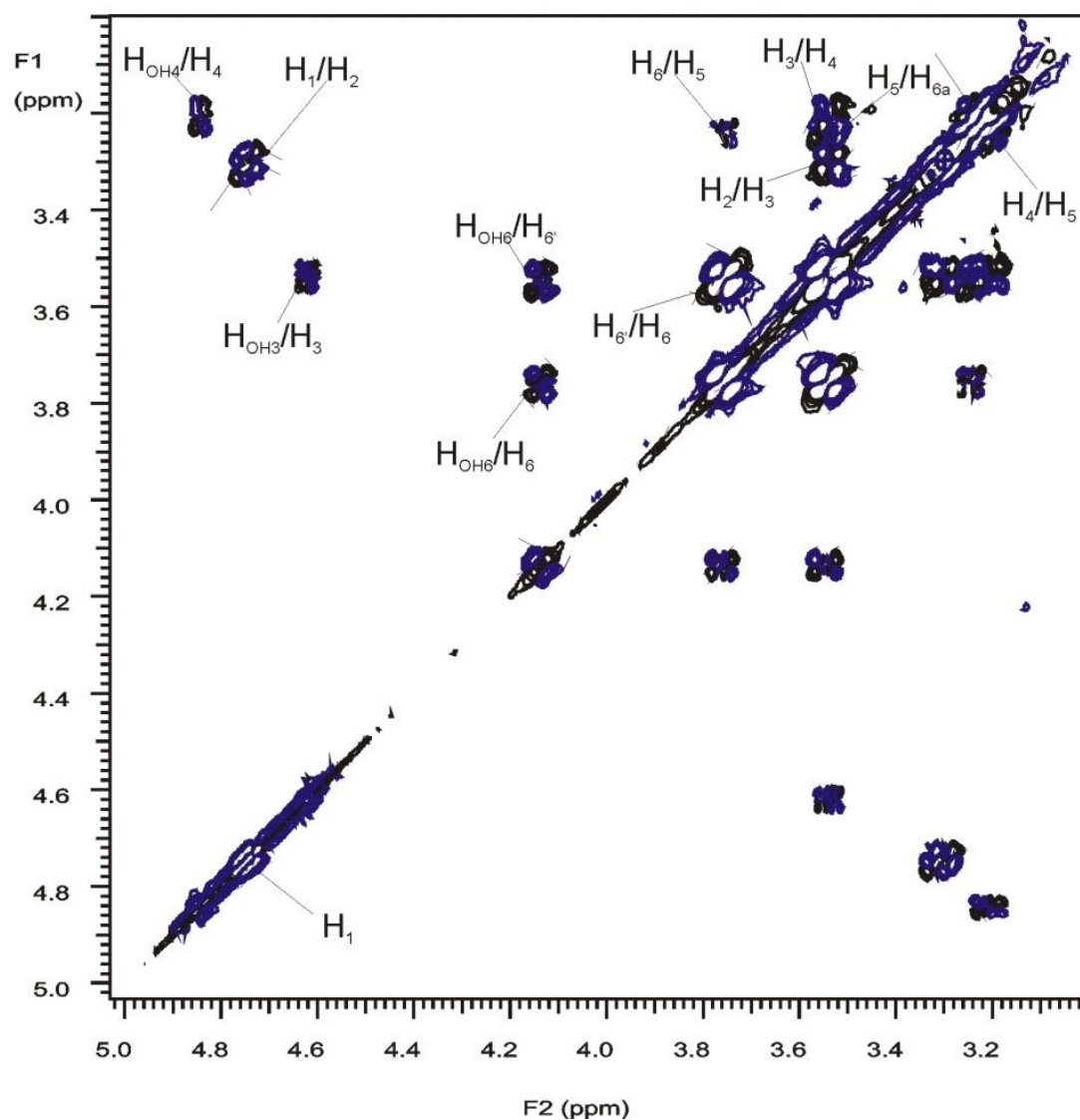
Ryc. 60. Widmo ¹H-NMR glukanu *O. lupini* LUP21^T rozpuszczonego w D₂O.

Analizę widm węglowych (1D ^{13}C NMR) rozpoczęto od obszaru anomerycznego gdzie obserwowano jedynie sygnały o wartościach w granicach 103.0 – 100.1 ppm. Takie wartości przesunięć chemicznych są charakterystyczne dla anomerów β [Usui i wsp., 1973]. Nie zaobserwowano sygnałów w obszarze 92-96 ppm, charakterystycznym dla C-1 redukujących reszt glukozy. Potwierdza to wcześniejsze wnioski, że glukan jest cząsteczką cykliczną. Na widmie HSQC *O. cytisi* ESC1^T zaznaczono obszary, w obrębie których występują sygnały protonów anomerycznych (1), szkieletowych (2 - 6') oraz pochodzące od wzorców (**Ryc. 61**). Brak sygnałów w obszarze poniżej 60 ppm świadczy o braku podstawników niecukrowych.

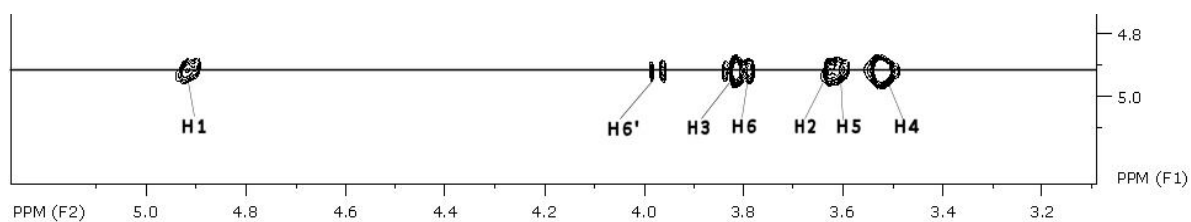


Ryc. 61. Widmo HSQC glukanu *O. cytisi* ESC1^T rozpuszczonego w DMSO- d_6 . Objasnienia w tekście.

Na dwuwymiarowym widmie DQF-COSY *O. cytisi* ESC1^T (**Ryc. 62**) odnaleziono kolejne sygnały korelacyjne dla atomów wodoru glukozy (1,2)-związanej. Odpowiednie wartości przesunięć chemicznych zebrane zostały w **tabeli 19**. Na widmie TOCSY *O. lupini* LUP21^T (**Ryc. 63**) zaznaczono układ sprzężeń odpowiadający protonom z cząsteczki glukozy.



Ryc. 62. Widmo DQF-COSY preparatu glukanowego *O. cytisi* ESC1^T rozpuszczonego w DMSO-*d*₆.



Ryc. 63. Fragment widma TOCSY peryplazmatycznego glukanu *O. lupini* LUP21^T. Linia ciągłą oznaczono układ spinowy tworzony przez protony glukozy (1,2)-związanej.

Tabela 19. Wartości przesunięć chemicznych protonów i atomów węgla dla reszt glukozy oraz stałych sprzężenia $J_{C1/H1}$ i $J_{H1/H2}$ z preparatów glukanowych *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T (n.d. – nie oznaczono).

Szczep	$J_{C1/H1}$ $J_{H1/H2}$	H-1 C-1	H-2 C-2	H-3 C-3	H-4 C-4	H-5 C-5	H-6 C-6	H-6' C-6
<i>O. cytisi</i>	165,5	4.762	3.248	3.555	3.243	3.256	3.778	3.5642
ESC1 ^T	7.2	100.766	<u>81.777</u>	74.954	68.286	76.028	60.314	60.314
<i>O. lupini</i>	n.d.	4.938	3.635	3.836	3.542	3.542	3.998	3.826
LUP21 ^T	7.2	102.639	<u>83.074</u>	76.481	69.743	77.278	61.774	61.774

Zaprezentowane wyniki potwierdzają wcześniejsze przypuszczenia o cyklicznej budowie glukanów izolowanych z przestrzeni peryplazmatycznej *Ochrobactrum*. Jednocześnie glukany te mają strukturę typową dla ryzobiów szybkorosnących, w których jednostki glukozy są połączone wyłącznie wiązaniami β -(1→2)-glikozydowymi.

IV.3 CHARAKTERYSTYKA EGZOPOLISACHARYDÓW *OCHROBACTRUM CYTISI* ESC1^T I *O. LUPINI* LUP21^T

IV.3.1 Otrzymanie i oczyszczenie preparatów egzopolisacharydowych

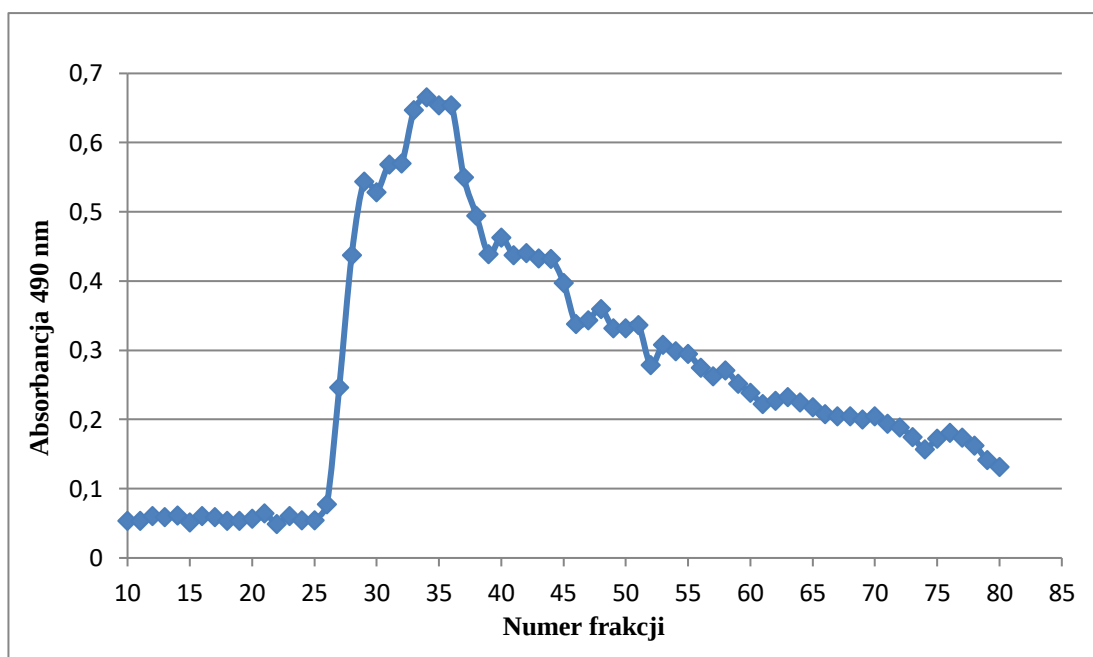
Hodowle szczepów prowadzono na podłożu 79CA, wzbogaconym bursztynianem sodu w temperaturze 28°C z napowietrzaniem przez intensywne wytrząsanie. Egzopolisacharydy izolowano z płynu pohodowlanego wytrącając je 75% etanolem. Zebrane preparaty po wysuszeniu (usunięcie etanolu) i ponownym rozpuszczeniu poddano wyczerpującej dializie wobec wody destylowanej, a następnie zliofilizowano. Ilości uzyskanego materiału zestawiono w **tabeli 20**.

Tabela 20. Ilości egzopolisacharydów uzyskanych z płynu pohodowlanego *Ochrobactrum*.

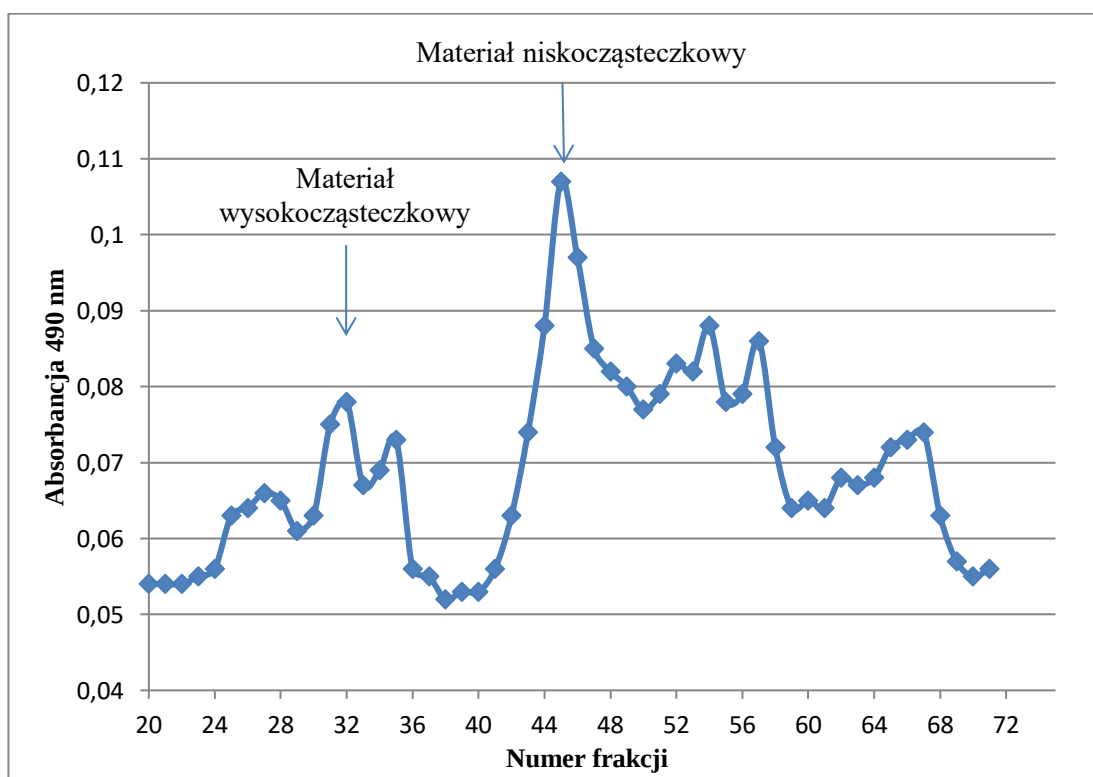
Szczep	Masa [mg]	Wydajność na litr [mg]
<i>O. cytisi</i> ESC1 ^T	222,0	111,0
<i>O. lupini</i> LUP21 ^T	702,8	175,7

Uzyskane preparaty egzopolisacharydów frakcjonowano przy użyciu chromatografii żelowej na kolumnie wypełnionej Sepharose CL-6B. Kolumnę przemywano wodą w przypadku szczepu analizy EPS *O. lupini* LUP21^T, a w przypadku EPS *O. cytisi* ESC1^T użyto 1M NaOH. Wyciek z kolumny monitorowano na zawartość składników cukrowych przy użyciu metody Dubois [Dubois i wsp., 1956]. Wykreślony profil elucji pozwolił stwierdzić, że EPS *O. lupini* zawiera tylko frakcję wysokocząsteczkową (**Ryc. 64**). Obliczono, że przybliżona masa egzopolisacharydu to 245 kDa.

Profil elucji preparatu egzopolisacharydowego *O. cytisi* ESC1^T wskazywał na obecność dwóch frakcji: wysoko- i niskocząsteczkowej (**Ryc. 65**). Przybliżona masa frakcji wysokocząsteczkowej egzopolisacharydu ESC1^T to 342,5 kDa (około 2212 cząsteczek, zaś frakcji niskocząsteczkowej to 46,5 kDa).



Ryc. 64. Profil elucji preparatu EPS *O. lupini* LUP21^T rozdzielanego na kolumnie wypełnionej Sephadexem CL-6B (0,7 × 90 cm). Solwent: woda. Frakcje zbierano po 40 kropeł, szybkość przepływu: 8,5 ml/godz. Naważka 20 mg.



Ryc. 65. Profil elucji preparatu EPS *O. cytisi* ESC1^T rozdzielanego na kolumnie wypełnionej Sephadexem CL-6B (0,7 × 90 cm). Solwent: 1M NaOH. Frakcje zbierano po 40 kropeł, szybkość przepływu: 12,5 ml/godz. Naważka 1,5 mg.

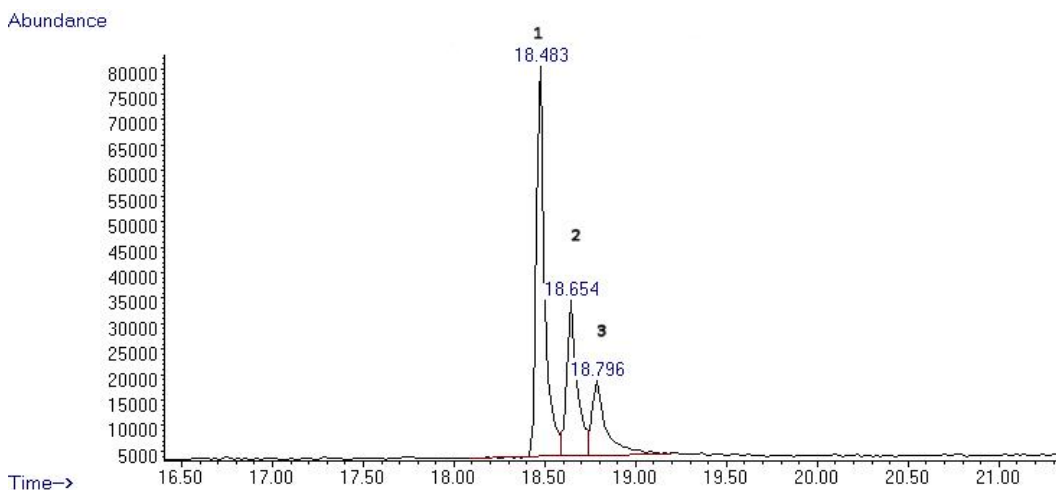
IV.3.2 Określenie składu cukrowego oraz wiązań w cząsteczkach egzopolisacharydów

Otrzymane preparaty egzopolisacharydowe poddano hydrolizie w 2 M TFA w 100°C przez 4 godziny, następnie redukcji borowodorkiem sodu i kolejno peracetylacji. Tak otrzymane octany alditoli analizowane były metodą chromatografii gazowej. Stwierdzono, że EPSy produkowane przez szczepy *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T zbudowane są z mannozy, glukozy i galaktozy. W preparatach nie wykryto obecności kwasów uronowych (**Tabela 21**).

Tabela 21. Skład węglowodanowy preparatów EPS *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T.

Szczep	Składnik	Mannoza	Glukoza	Galaktoza
<i>O. cytisi</i> ESC1 ^T	Czas retencji	18.389	18.565	18.714
	Względna zawartość [%]	78,7	8,3	13
<i>O. lupini</i> LUP21 ^T	Czas retencji	18.483	18.654	18.796
	Względna zawartość [%]	55,74	26,64	17,62

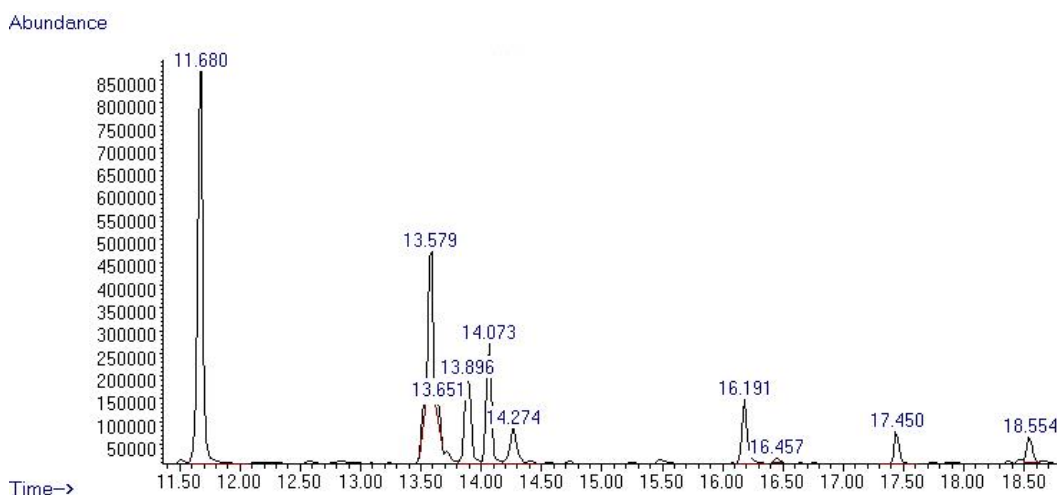
Dominującym składnikiem w obu preparatach jest mannoza (**Ryc. 66**).



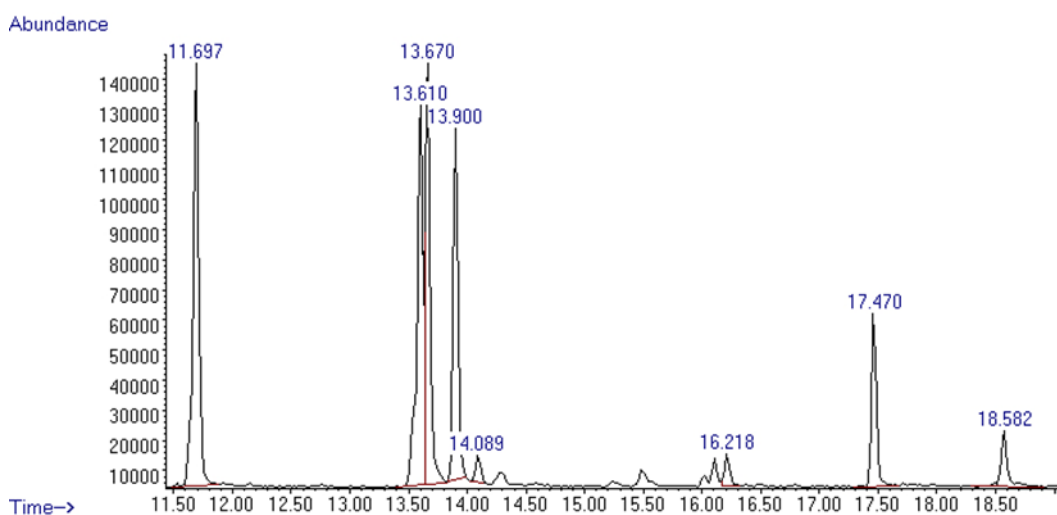
Ryc. 66. Chromatogram rozdziału octanów alditoli otrzymanych z preparatu EPS *O. lupini* LUP21^T. Cyfry oznaczają kolejno octany: 1. mannitolu, 2. galaktitolu, 3. glucitolu.

W celu ustalenia typu wiązań pomiędzy poszczególnymi monosacharydami w preparatach wykonano analizę metylacyjną (wg. procedury Hakomori, (1964)). Preparaty zmetylowano, poddano hydrolizie, a otrzymane monocukry zredukowano i acetylowano. Uzyskane preparaty analizowano metodą GC-MS. Analiza widm mas pozwoliła stwierdzić, jakiego typu wiązania występują w łańcuchach badanych polisacharydów. Wyniki analizy widm mas zostały zebrane w **tabeli 22 i 23**,

a chromatogramy preparatów permetylowanych octanów alditoli otrzymanych z EPSów *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T przedstawiono na **rycinach 67 i 68**.



Ryc. 67. Chromatogram GC preparatu EPS *O. cytisi* ESC1^T poddanego metylacji, całkowitej hydrolizie, redukcji i peracetylacji. Pik o czasie retencji 18.554 min. pochodzi od zanieczyszczenia (pochodne kwasu ftalowego).



Ryc. 68. Chromatogram GC preparatu EPS *O. lupini* LUP1^T poddanego metylacji, hydrolizie 2M TFA, redukcji i peracetylacji wg procedury Hakomori [1964].

Tabela 22. Główne składniki zidentyfikowane w preparacie metylowanych octanów alditoli otrzymanych z preparatów egzopolisacharydowych *O. cytisi* ESC1^T.

L.p.	Czas retencji [min.]	Główne jony [m/e]	Zidentyfikowany składnik	Typ wiązania	Względna zawartość %
1.	11.680	87, 101, 102, 118, 129, 130, 145, 161, 162, 205	1,5-O-Ac ₂ -2,3,4,6-O-Me ₄ -hexitol	hex(1→	39,1

2	13.579	87, 88, 98, 101, 129, 130, 145, 161, 190,	1,2,5- <i>O</i> -Ac ₃ -3,4,6- <i>O</i> -Me ₃ -heksitol	→2)hex(1→	2,0
3.	13.651	87, 101, 118, 129, 161, 234	1,3,5- <i>O</i> -Ac ₃ -2,4,6- <i>O</i> -Me ₃ -heksitol	→3)hex(1→	27,2
4.	13.896	87, 101, 118, 129, 161, , 234	1,3,5- <i>O</i> -Ac ₃ -2,4,6- <i>O</i> -Me ₃ -heksitol	→3)hex(1→	8,4
5.	14.073	87, 101, 118, 129, 161, 234	1,3,5- <i>O</i> -Ac ₃ -2,4,6- <i>O</i> -Me ₃ -heksitol	→3)hex(1→	5,3
6.	14.274	87, 99, 102, 118, 129, 162, 173, 189, 233	1,5,6- <i>O</i> -Ac ₃ -2,3,4-Me ₃ -heksitol	→6)hex(1→	5,1
7.	16.191	87, 88, 129, 130, 189, 190, 205, 206	1,2,5,6 - <i>O</i> -Ac ₄ -3,4- <i>O</i> -Me ₂ -heksitol	→2,6)hex(1→	13,0

Tabela 23. Główne składniki zidentyfikowane w preparacie metylowanych octanów alditoli otrzymanych z preparatów egzopolisacharydowych *O. lupini* LUP1^T.

L.p.	Czas retencji [min.]	Główne jony [m/e]	Zidentyfikowany składnik	Typ wiązania	Względna zawartość %
1.	11.721	101, 102, 118, 129, 145, 161, 162, 205	1,5- <i>O</i> -Ac ₂ -2,3,4,6- <i>O</i> -Me ₄ -heksitol	hex(1→	28,2
2.	13.609	88, 101, 129, 130, 145, 161, 190	1,2,5- <i>O</i> -Ac ₃ -3,4,6- <i>O</i> -Me ₃ -heksitol	→2)hex(1→	16,9
3.	13.672	101, 118, 129, 130, 161, 190, 234	1,3,5- <i>O</i> -Ac ₃ -2,4,6- <i>O</i> -Me ₃ -heksitol	→3)hex(1→	23,5
4.	13.931	102, 118, 129, 162, 173, 233	1,4,5,6- <i>O</i> -Ac ₄ -2,3- <i>O</i> -Me ₂ -heksitol	→4,6)hex(1→	19,1
5.	16.191	87, 88, 129, 130, 189, 190, 205, 206	1,2,5,6 - <i>O</i> -Ac ₄ -3,4- <i>O</i> -Me ₂ -heksitol	→2,6)hex(1→	8,7
6.	17.450	87, 97, 103, 118, 129, 139, 145	1,3,4,5,6- <i>O</i> -Ac ₅ -2- <i>O</i> -Me ₁ -heksitol	→3,4,6)hex(1→	2,0

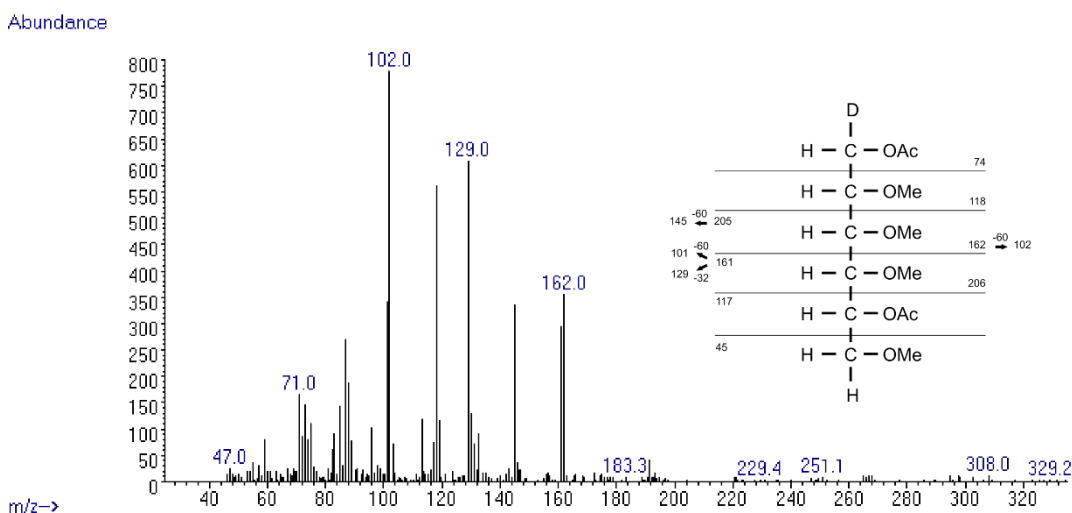
Na chromatogramach permetylowanych octanów alditoli otrzymanych z EPS *O. cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T zidentyfikowano piki odpowiadające terminalnej heksozie występującej w znacznych ilościach. Kolejny pik o czasie retencji około 13.610 min. reprezentuje 1,2,5-*O*-Ac₃-3,4,6-*O*-Me₃-heksitol, a następny o czasie retencji ~13.672 min. to 1,3,5-*O*-Ac₃-2,4,6-*O*-Me₃-heksitol. Związek o czasie retencji

13.931 min to pochodna heksozy podstawionej w miejscu 4,6 przez inne cukry lub za pomocą reszty kwasu pirogronowego.

Identyfikacji permetylowanych octanów alditolu dokonano w oparciu o widma mas. Względne proporcje poszczególnych składników zostały wyrażone w procentach. Należy zaznaczyć, że w analizie pominięto składniki których zawartość w preparatach nie sięgała 2%. Wyniki zostały przedstawione w tabelach: 22, 23.

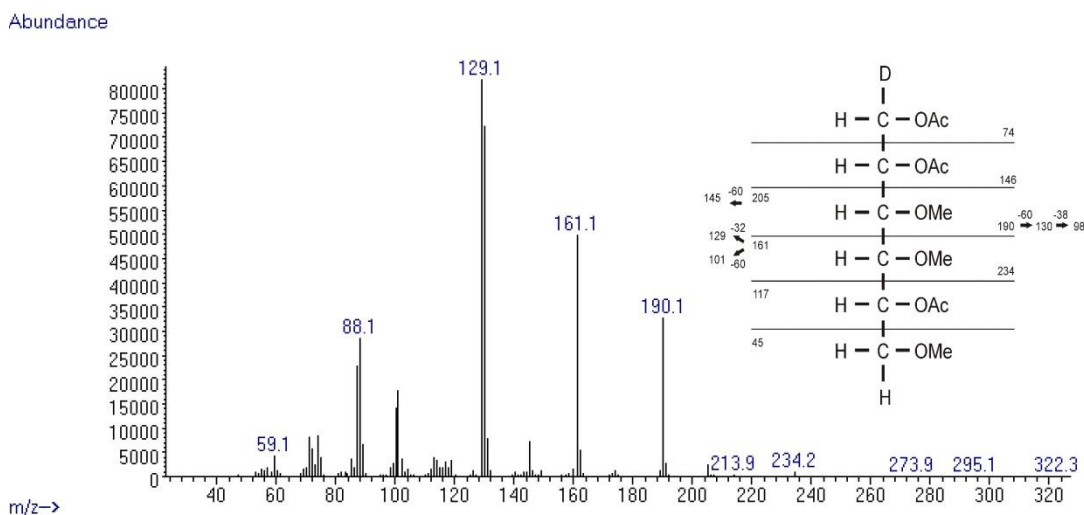
Dominującym miejscem fragmentacji związku o czasie retencji 11.721 min (chromatogram **Ryc. 68**, widmo mas **Ryc. 69**) jest wiązanie pomiędzy C-3 i C-4. Rozerwanie tego wiązania prowadzi do powstania jonów I-rzędowych m/e 161 i 162. Z nich z kolei powstają jony m/e 101, 102 i 129. Widoczne są również jony m/e 118 i 205 pochodzące z rozpadu wiązania C-2 i C-3 oraz powstające z nich jony m/e 86 i 145.

Podczas fragmentacji związku o czasie retencji 11.651 min. (chromatogram **Ryc. 67**) stwierdzono obecność analogicznych jonów I i II- rzędowych.



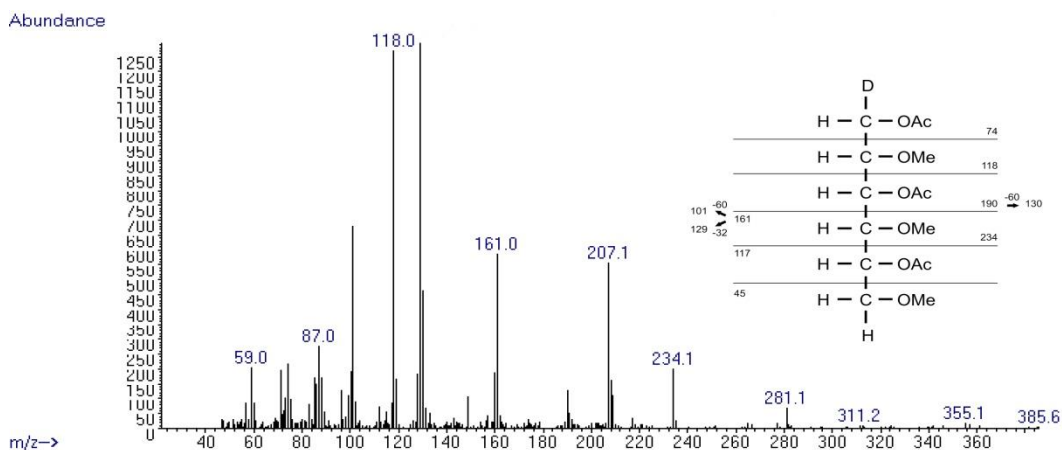
Ryc. 69. Widmo mas i schemat fragmentacji 1,5-O-Ac₂-2,3,4,6-O-Me₄-heksitolu *O. lupini* LUP1^T (t_R =11.721 min, GC chromatogram **Ryc. 68**).

Podstawowym miejscem fragmentacji związku o czasie retencji 13.579 min (chromatogram **Ryc. 67**) jest wiązanie pomiędzy C-3 i C-4. W wyniku jego rozerwania powstają jony I-rzędowe tj. m/e 190 i 161, z których kolejno poprzez eliminacje powstają jony m/e 130, 129, 101, 96 i 88 (**Ryc. 70**).



Ryc. 70. Widmo mas i schemat fragmentacji 1,2,5-*O*-Ac₃-3,4,6-*O*-Me₃-heksitolu otrzymanego z EPS *O. cytisi* ESC1^T w wyniku zastosowania procedury metylacji ($t_R=13.579$ min).

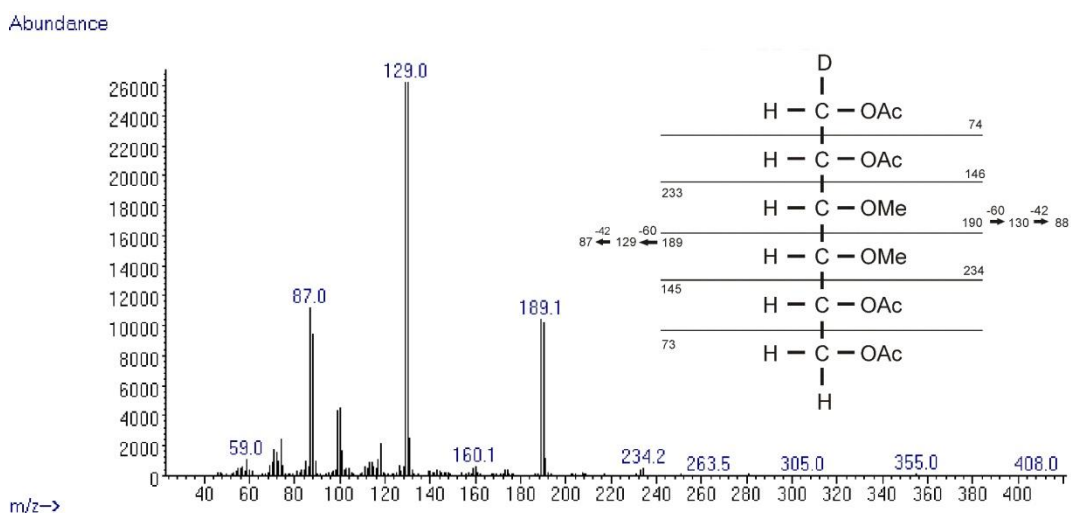
W preparacie permetylowanych octanów alditoli otrzymanych z EPS *O. lupini* LUP21^T w przypadku fragmentacji związku o czasie retencji 13.672 min stwierdzono występowanie jonów głównych m/e 161 i 234 powstałych po zerwaniu wiązania pomiędzy C-3 a C-4. Dominujący na widmie mas jest jon m/e 118 oraz jony m/e 101, 129 powstałe z odpowiednich jonów I- rzędowych (**Ryc. 71**).



Ryc. 71. Widmo mas i schemat fragmentacji 1,3,5-*O*-Ac₃-2,4,6-*O*-Me₃-heksitolu otrzymanego z EPS *O. lupini* LUP21^T w wyniku zastosowania procedury metylacji ($t_R=13.672$ min).

Na **rycinie 72** przedstawiono widmo mas i schemat fragmentacji związku otrzymanego z EPS *O. cytisi* ESC1^T w wyniku zastosowania procedury metylacji, który opuszczał kolumnę chromatograficzną po 16.191 min. Główne sygnały na widmie pochodzą od fragmentów powstałych w wyniku rozerwania wiązania w cząsteczce pomiędzy atomami węgla C-3 i C-4. W ten sposób powstają jony m/e 189 i 190. Z nich z kolei poprzez odłączenie cząsteczki kwasu octowego, a następnie eliminację

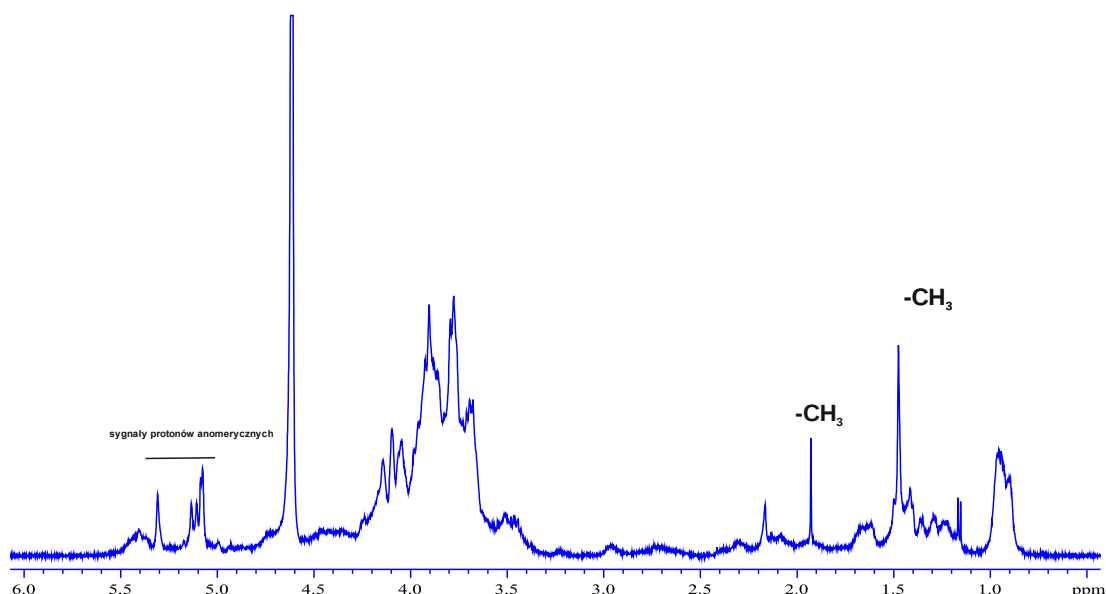
ketonu powstają jony odpowiednio m/e 129 i 87 oraz 130 i 88. Związek ten został zidentyfikowany, jako 1,2,5,6 -O-Ac₄-3,4- O-Me₂-heksitol.



Ryc. 72. Widmo mas i schemat fragmentacji 1,2,5,6-O-Ac₄-3,4-O-Me₂-heksitolu otrzymanego z EPS *O. cytisi* ESC1^T w wyniku zastosowania procedury metylacji (t_R =16.191 min.).

Należy zauważyć, że oba preparaty egzopolisacharydów miały zbliżony skład jakościowy i ilościowy. Ich główne składniki to mannoza, glukoza i galaktoza. Analiza metylacyjna wskazuje także na podobieństwa strukturalne tych polimerów. Różnice spowodowane są między innymi przez obecność cukrów podstawionych w pozycjach 4 i 6. Prawdopodobnie te podstawienia to efekt modyfikacji EPS prze reszty kwasu pirogronowego.

Egzopolisacharydy, jako cząsteczki o dużej masie cząsteczkowej, dające roztwory o znacznej lepkości są trudne do analizy przy użyciu metody magnetycznego rezonansu jądrowego. Takim materiałem okazały się preparaty EPS *Ochrobactrum cytisi* ESC1^T i *O. lupini* LUP21^T. Oba preparaty zawieszono w D₂O w stężeniu 1 mg/ml i analizowano wstępnie na spektrometrze Bruker 300 (Wydział Chemii UMCS, Lublin). Wyniki wskazują na ich duże podobieństwo. W celu lepszego scharakteryzowania wybrano egzopolisacharyd *O. lupini* LUP21^T. Preparat po oczyszczeniu na kolumnie ze złożem CL-6B w ilości 4 mg zawieszono w D₂O i analizowano przy użyciu spektrometru Varian Unity plus 500. Widmo ¹H-NMR przedstawia **Ryc. 73**. Rejon sygnałów pochodzących od anomerycznych protonów zawiera co najmniej cztery piki, zaś w rejonie charakterystycznym dla sygnałów od podstawników niecukrowych stwierdzono obecność piku protonów –grupy -CH₃ pirogronianu (δ ~1.48 ppm) oraz piku protonów -CH₃ reszty acetylowej (δ ~1,95 ppm).



Ryc. 73. Widmo 1D ^1H -NMR EPS *O. lupini* LUP21^T rozpuszczonego w D_2O .

Widma dwuwymiarowe okazały się nieczytelne, a więc nieprzydatne z punktu widzenia analizy strukturalnej EPS.

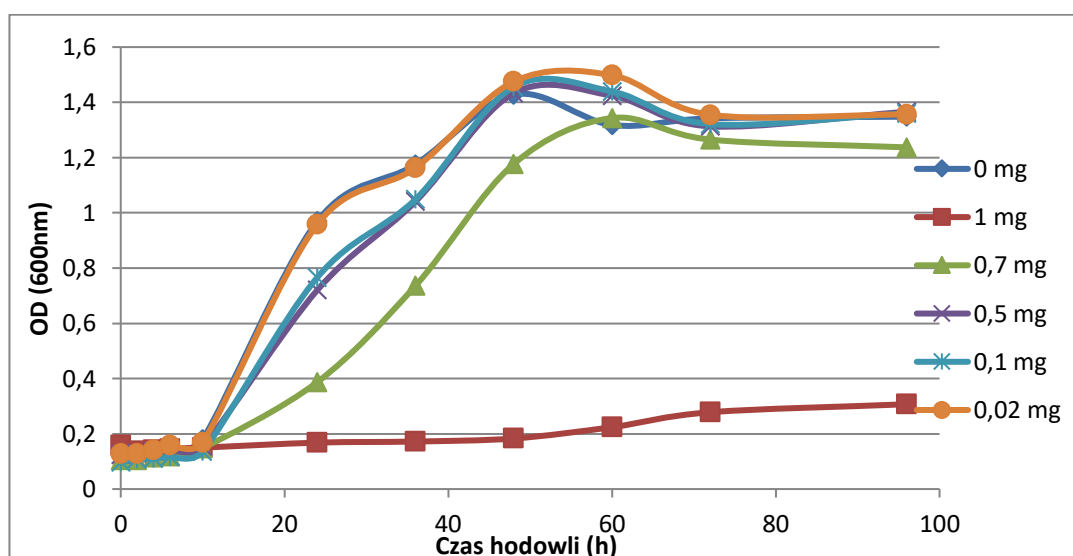
IV.3.3 Badanie właściwości sorpcyjnych egzopolisacharydu *O. lupini* LUP21^T

Metale ciężkie stanowią jeden z najważniejszych czynników ograniczających wzrost, aktywność oraz różnorodność gatunkową zarówno mikroorganizmów, jak i wielu roślin w środowisku. Drobnoustroje mogą zwiększać rozpuszczalność (tzw. mobilność), zmieniać stopień utlenienia oraz formę jonów metali poprzez produkcję i wydzielanie do otoczenia organicznych ligandów, wtórnych metabolitów oraz sideroforów zdolnych do wiązania metali, czy też ich desorpcji z gleby na drodze wymiany z innymi związkami/jonami. Mikroorganizmy te mogą przyczyniać się do akumulacji metali ciężkich przez ich sorpcję na egzopolisacharydach. Z tego względu rola ryzosfery i procesy w niej zachodzące, w kontekście bioremediacji metali ciężkich, zdają się być niezwykle istotne i interesujące.

W badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie skupiono się na określeniu zdolności EPS *Ochrobactrum lupini* LUP21^T do akumulacji metali ciężkich w różnych warunkach. Ten szczep został wybrany na model badawczy ze względu na produkcję dużych ilości egzopolisacharydu.

IV.3.4 Wzrost *O. lupini* LUP21^T na podłożach z dodatkiem soli metali ciężkich

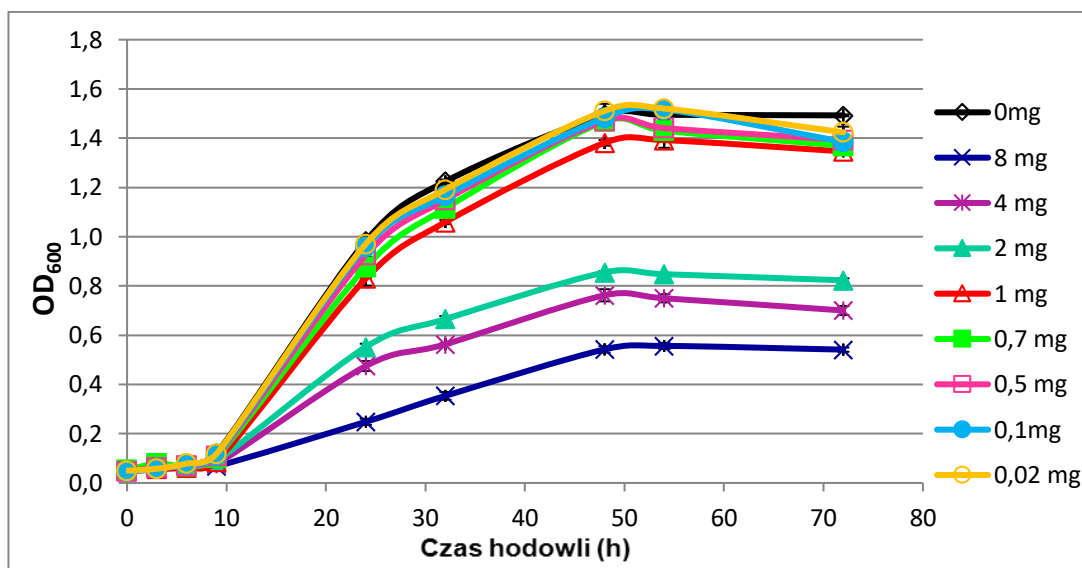
Prowadząc wstępne badania sprawdzono zdolność bakterii do wzrostu w podłożu suplementowanym solami metali ciężkich. Hodowla w obecności siarczanu kadmu (CdSO_4) prowadzona była początkowo przy stężeniach 0 (kontrola), 1, 4, 8, 10 i 12 mg soli na 100 ml pożywki. Badanie wykazało jednak, że kadm już przy stężeniu 1 mg/100 ml wyraźnie hamuje wzrost bakterii. Dlatego też sprawdzono wzrost bakterii przy niższych stężeniach, tj. w zakresie od 0,002 do 1 mg soli na 100 ml podłoża. Uzyskane wyniki przedstawiono na **rycinie 74**. Jony kadmu w stężeniu poniżej 1 mg soli na 100 ml pożywki nieznacznie wpływają na wzrost *O. lupini* LUP21^T. Tak więc stężenie CdSO_4 równe 1 mg/100 ml wydaje się być stężeniem granicznym po przekroczeniu którego szczep LUP21^T przestaje rosnąć.



Ryc. 74. Wpływ stężenia soli kadmu (CdSO_4) na wzrost *O. lupini* LUP21^T w zmodyfikowanym podłożu 79CA. Podane w legendzie wartości odnoszą się do ilości soli kadmu w 100 ml pożywki.

Hodowla z dodatkiem soli ołowiu ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) prowadzona była przy stężeniach 0-8 mg soli na 100 ml podłoża. Zaobserwowano, że octan ołowiu nawet w stężeniu 8 mg soli/100 ml pożywki nie hamował wzrostu bakterii. Stężenia octanu ołowiu w przedziale od 2 do 8 mg stopniowo obniżały efektywność podziałów komórkowych (**Ryc. 75**). Mimo to nie zaobserwowano znaczącej różnicy we wzroście bakterii bez dodatku soli ołowiu i z dodatkiem niewielkiej ilości soli (stężenia: 0,02-1 mg/100 ml pożywki). Wyniki te wskazują na dość małą wrażliwość *O. lupini* LUP21^T na ołów.

Logarytmiczny wzrost bakterii rozpoczynał się po 10 godzinach od inokulacji pożywki zarówno podczas inkubacji z kadmem jak i z ołowiem, zaś faza stacjonarna była osiągana przez hodowle po 60 godzinach inkubacji.



Ryc. 75. Wpływ stężenia $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ na wzrost *O. lupini* LUP21^T w zmodyfikowanym podłożu 79CA. Badania przeprowadzono przy stężeniach soli metalu od 0 do 8 mg/100 ml pożywki.

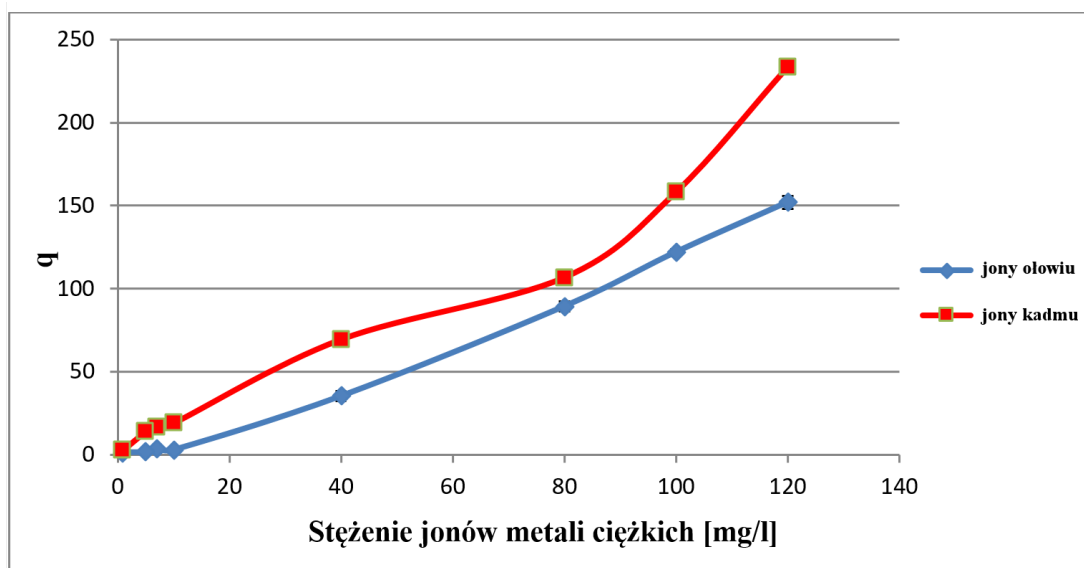
IV.3.4.1 Wpływ stężenia soli kadmu i ołowiu na zdolności sorpcyjne EPS

O. lupini LUP21^T

Zdolności sorpcyjne jonów Cd^{+2} i Pb^{+2} przez EPS izolowany z płynu pohodowlanego *O. lupini* LUP21^T badano przy uwzględnieniu szeregu parametrów. Były to: pH roztworu, stężenie początkowe soli oraz czasu prowadzenia procesu sorpcji. Badania sorpcji prowadzono określając ilości jonów metali przy użyciu metody kolorymetrycznej opartej na reakcji badanego jonu z 1,5-dimetylotiokarbazonem w środowisku wodnym zawierającym wysokie stężenie detergentu [Ruengsitagoon i wsp. 2010, Paradkar i Williams 1994].

Sorpcję jonów Pb^{+2} i Cd^{+2} przez egzopolisacharydu określano przy stężeniach 0,1-14 mg jonu metalu w 100 ml roztworu. W tym celu do worków dializacyjnych dodano roztwór EPS (5 mg EPS w 5 ml wody). Zamknięte worki umieszczano w zlewkach zawierających roztwory metali w odpowiednich stężeniach. Mierzono absorbancję próbki pobierając po 0,2 ml roztworu i przeprowadzając reakcję kolorymetryczną z ditionem. Pomiar powtarzano po 18 godzinach inkubacji. Ubytek jonów w roztworze był miarą właściwości sorpcyjnych EPS. W przypadku obu metali wyniki wskazywały

na tendencję rosnącą krzywej sorpcji [Ryc. 76]. Sorpcja rosła w przybliżeniu liniowo w zależności od stężenia jonów w roztworze i nawet przy stężeniu 120 mg/l nie osiągnęła plateau.



Ryc. 76. Wpływ stężenia jonów kadmu i ołowiu na właściwości sorpcyjne *O. lupini* LUP21^T. Gdzie: $q = V(C_i - C_f) / m$, V-objętość, C_i (mg/L)- stężenie początkowe, C_f (mg/L)- stężenie końcowe, m (g) – masa egzopolisacharydu (sorbentu).

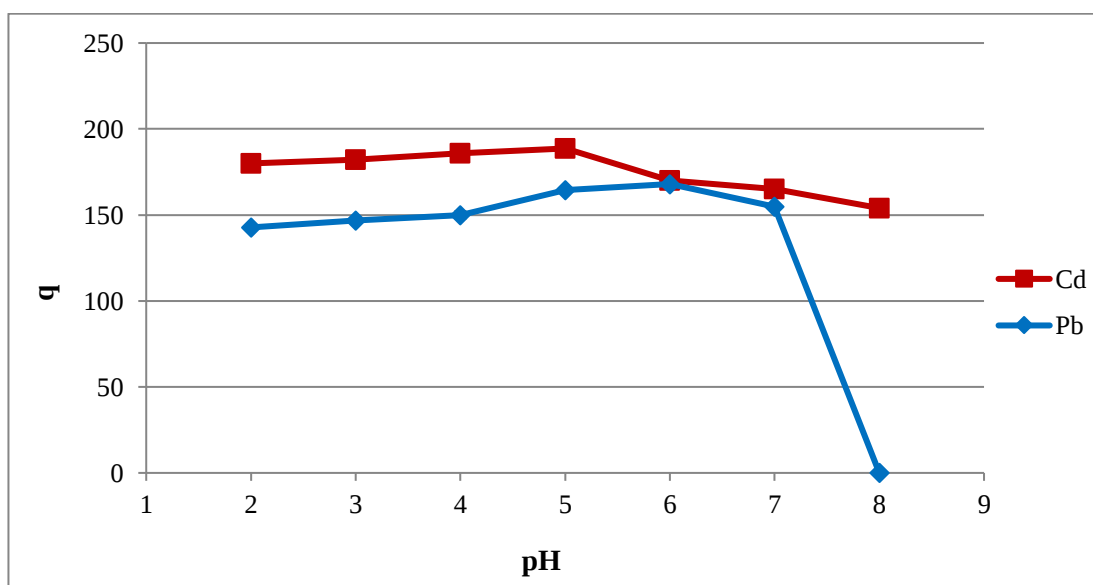
IV.3.4.2 Wpływ pH środowiska na sorpcje jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd *O. lupini* LUP21^T

Zdolności sorpcyjne materiałów organicznych są uzależnione od wielu czynników środowiskowych. Szczególną rolę w procesach sorpcji odgrywa pH roztworu. Najczęściej optymalne pH procesu sorpcji jonów metali ciężkich waha się w zakresie 4,0-6,0. Optymalna wartość pH jest zależna od rodzaju adsorbowanego metalu [Gala i Sanak –Rydlewska, 2010].

Zależność sorpcji od pH środowiska jest skutkiem występowania ładunku na powierzchni sorbentu. Jest on wynikiem występowania na powierzchni sorbentu różnych typów grup funkcyjnych tj. grupy karboksylowe, fenolowe, hydroksylowe czy amidowe, które oddziałują z jonami metali występującymi w roztworze. Ładunek ten może być dodatni w przypadku występowania zasadowych grup funkcyjnych. W takiej sytuacji sorpcja zachodzi zazwyczaj znacznie słabiej, gdyż kationy metalu są odpychane od dodatnio naładowanej powierzchni sorbentu. Przy pH zasadowym sorpcja się zwiększa, co jest spowodowane jonizacją grup kwasowych sorbentu.

W roztworze o wyższym pH występuje mniej jonów wodorowych konkurencyjnych dla jonów metali.

Po przeprowadzeniu szeregu doświadczeń stwierdzono, że zmiany stężenia jonów wodorowych (zmiany pH) w minimalnym stopniu wpływają na adsorpcję jonów Pb^{+2} i Cd^{+2} do egzopolisacharydu LUP21^T. W przypadku sorpcji Pb^{+2} stwierdzono, że maksimum adsorpcji przypadało na pH 6, zaś w przypadku sorpcji jonów kadmu najwyższe wartości sorpcyjne obserwowano przy pH 5 (**Ryc. 77**). W doświadczeniu prowadzonym przy pH 8 zaobserwowano wytrącanie się białego osadu wodorotlenku ołowiu II. Efekt wytrącania się nierozpuszczalnych wodorotlenków metali ciężkich zawęził zakres pomiarów sorpcji Pb^{+2} .

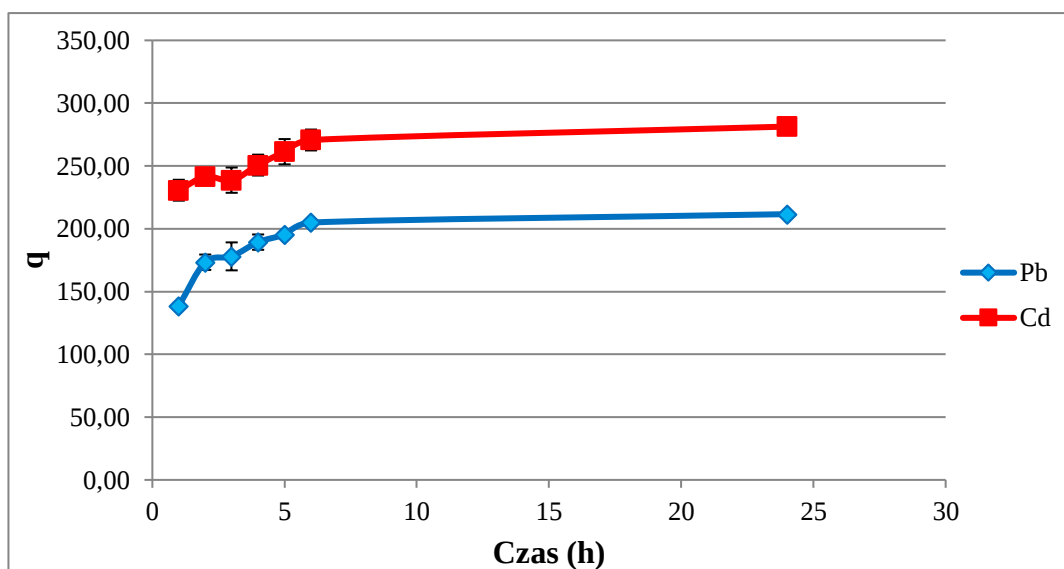


Ryc. 77. Wpływ pH środowiska na sorpcję jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd *O. lupini*. Gdzie: $q = V(C_i - C_f) / m$ V-objętość, C_i (mg/L)- stężenie początkowe, C_f (mg/L)- stężenie końcowe, a m (g) – masa egzopolisacharydu.

IV.3.4.3 Kinetyka wiązania jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd

O. lupini LUP21^T

Kolejne eksperymenty pozwoliły określić kinetykę wiązania jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd *O. lupini*. Oznaczenie wykonano przy pH 7 (obojętnym) i przy stężeniu $Pb(CH_3COO)_2$ jak i $CdSO_4$ równym 6 mg soli/100 ml. Stwierdzono, że wysycenie EPS jonami metali następuje w pierwszych 6 godzinach inkubacji (**Ryc. 78**). Po tym okresie ilość zaadsorbowanych jonów metali nie zmienia się znacząco wraz z upływem czasu.

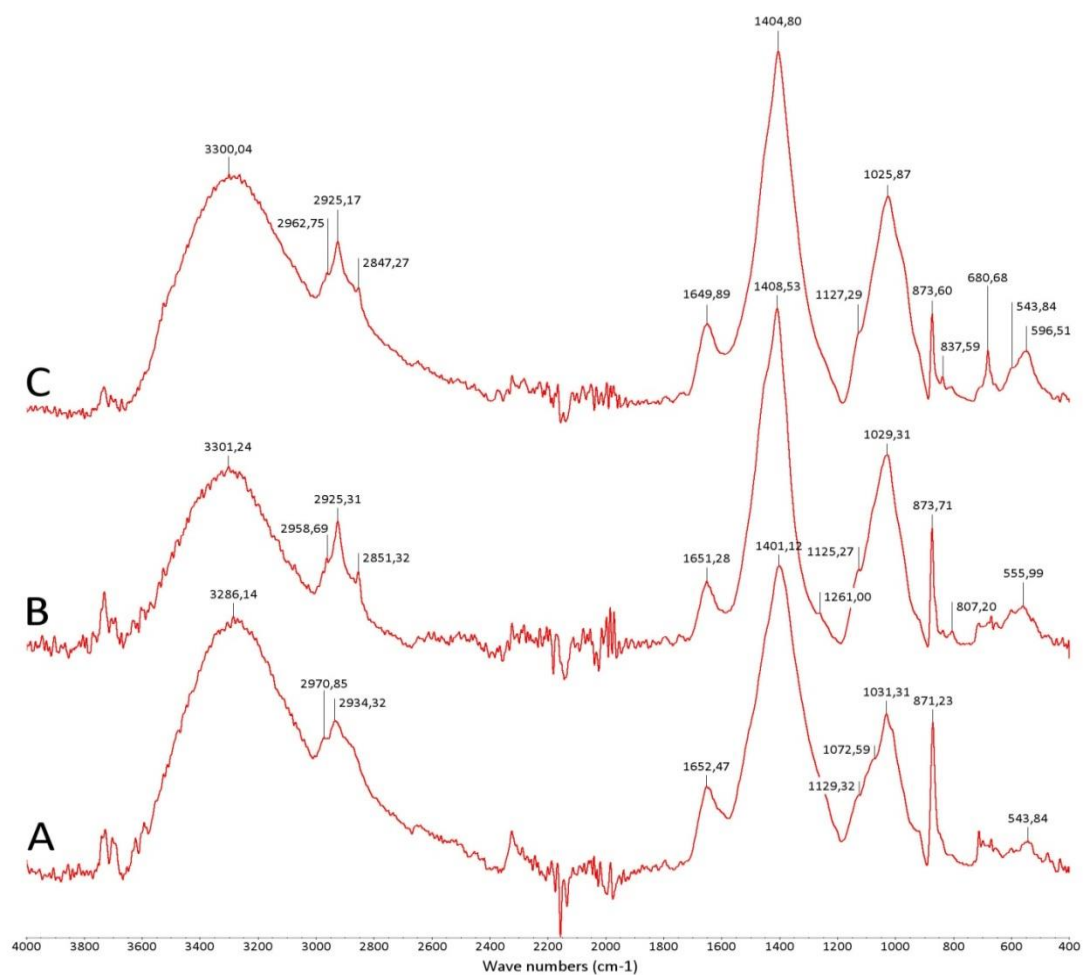


Ryc. 78. Kinetyka wiązania jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd *O. lupini*. Gdzie: $q = V(C_i - C_f)/m$, V -objętość, C_i (mg/L)- stężenie początkowe, C_f (mg/L)- stężenie końcowe, m (g) – masa egzopolisacharydu.

IV.3.4.4 Analiza FT-IR preparatów EPS *O. lupini*

W celu identyfikacji grup funkcyjnych, które są odpowiedzialne za adsorpcję jonów metali ciężkich do EPS wykonano szereg widm w podczerwieni (FTIR). Stwierdzono występowanie sygnałów w dwóch obszarach widm IR. Pierwsza grupa sygnałów charakterystyczna jest dla obszaru grup funkcyjnych. Są to sygnały w przedziale $4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Drugą grupą są sygnały mieszczące się w zakresie $1500\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ stanowiące obszar daktyloskopowy (tzw. *fingerprint*), charakterystyczny dla danych związków traktowanych jako całość.

W preparatach EPS z zaadsorbowanymi jonami metali stwierdzono niewielkie różnice w położeniu pasm absorpcji względem preparatu wolnego od metali (**Ryc. 79**). Po inkubacji EPS LUP21^T z octanem ołowiu zaobserwowano pojawienie się czterech dodatkowych słabych pasm absorpcji. Natomiast po inkubacji w roztworze zawierającym siarczan kadmu zaobserwowano trzy pasma absorpcji. Pasma te pojawiają się w zakresie sygnałów daktyloskopowych.



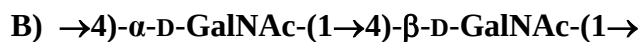
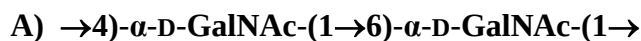
Ryc. 79. Widma FT-IR preparatów EPS *O. lupini* LUP21^T. A - EPS wysycony Pb⁺²; B - EPS wysycony Cd⁺², C – EPS wolny od soli metali ciężkich.

V DYSKUSJA

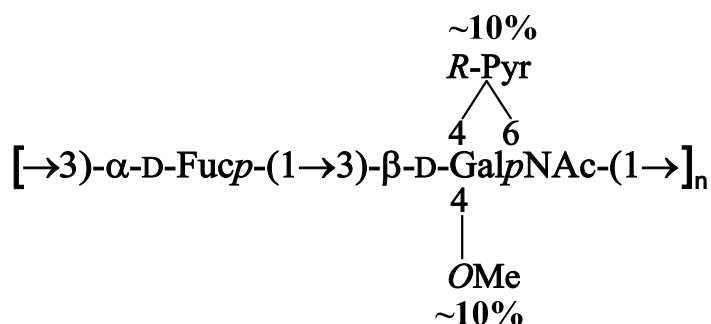
V.1 Lipopolisacharydy szczepów *Ochrobactrum cytisi* i *Ochrobactrum lupini*

Badane preparaty lipopolisacharydowe izolowano z bakterii *Ochrobactrum* używając klasycznej metody ekstrakcji w układzie fenol-woda. Oba preparaty zawierały znaczne ilości cząsteczek o dużej masie. Zauważono, że LPS *O. cytisi*, w przeciwieństwie do LPS *O. lupini*, oprócz form gładkiej i szorstkiej zawierał znaczącą ilość cząsteczek o pośredniej masie (formy S/R). W procesie ekstrakcji część materiału LPS *O. cytisi* (ok. 15%) pozostała w fazie fenolowej, część utworzyła międzyfazę (ok. 30%), a połowa przeszła do fazy wodnej. Takie zachowanie się preparatu może świadczyć o jego amfipatycznym charakterze. U *O. cytisi* ESC1^T charakter hydrofobowy LPS najprawdopodobniej wynika z obecności *N*-acetylowanej galaktozaminy i reszt metylowych w OPS tej bakterii [Pac i wsp., 2015], czego nie ma na przykład w LPS *P. trifolii* PETP02T [Zamłyńska i wsp., 2017]. Z dwóch badanych lipopolisacharydów zdecydowanie bardziej hydrofilowym okazał się preparat LPS *O. lupini* LUP21^T, który dzielił się między fazy fenolową i wodną w stosunku 71: 29. W tym przypadku za jego właściwości odpowiada bardzo duża zawartość *D*-*altro*-heptuloza. Cukier ten jest nietypowym składnikiem lipopolisacharydów. Zidentyfikowano go zaledwie w jednym przypadku *V. cholerae* H11 (non-O1) [Vinogradov i wsp., 1992, Bock i wsp., 1994]. W ostatnich latach odkryto, że fosforan sedoheptulozy (S-7-P) jest prekursorem w wielu reakcjach enzymatycznych prowadzonych przez mikroorganizmy w celu otrzymania aktywowanych form heptoz (NDP-heptoza) [Tang i wsp., 2018, Butty i wsp., 2008, Taylor i wsp., 2008]. Dotychczas uzyskane dane nie pozwalają na przedstawienie ostatecznej struktury OPS *O. lupini* LUP21^T, gdyż labilne wiązania tworzone przez sedoheptulozę uniemożliwiają otrzymanie nienaruszonej frakcji polisacharydu O-specyficznego poprzez łagodną hydrolizę LPS LUP21^T. Zawiodła także metoda analizy strukturalnej oparta o całkowitą deacylację LPS przy użyciu 4M KOH. Ta metoda jest z powodzeniem wykorzystywana przy deacylacji lipopolisacharydów, których lipid A to disacharyd glukozaminoglukozaminowy. O jej zastosowaniu w odniesieniu do preparatów LPS zawierających lipid A o szkielecie GlcN3N(1→6)GlcN3N donoszą nieliczni badacze (np. Zähringer i wsp., 2004). Analizując frakcję wysokocząsteczkową degradowanego polisacharydu uzyskaną w wyniku łagodnej kwaśnej

hydrolizy ustalono, że *O. lupini* LUP21^T produkuje co najmniej dwa rodzaje LPS. Mimo, że rdzeń obu polisacharydów O-swoistych jest homopolimerem *N*-acetylo-galaktozaminowym, to w każdym wypadku łańcuchy te mają inną strukturę wewnętrzną. Demonstrują to poniższe wzory:



Pełną sekwencję cukrową otrzymano analizując OPS *O. cytisi* ESC1^T. Uzyskane dane wskazują, że polisacharyd O-swoisty *O.cytisi* ESC1^T zawierał α -D-fukozę i β -D-galaktozaminę. Ta ostatnia była nietypowo udekorowana przez grupy R-pirogronowe i grupy metylowe. Podstawnik pirogronowy jest bardzo rzadko identyfikowany w preparatach LPS. Został znaleziony m.in. w antygenie O *Providencia alcalifaciens* serogrupy O19, ale w tym przypadku był przyłączony do reszty GlcpNAc i wykazywał konfigurację S. W O-polisacharydach różnych O-serogrup *Providencia* mogą występować także inne unikalne składniki. Niektóre z nich występują w formie stereoizomerów zarówno R jak i S. Reszty pirogronowe zostały znalezione także w innych enterobakteryjnych O-polisacharydach np. u *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris* oraz *P. penneri*. Reszty pirogronowe (reszty 4,6-O-(1-karboksy)-etylidenu) mające dwie absolutne konfiguracje R i S zostały zidentyfikowane w rdzeniu zewnętrznym LPS *Pseudomonas stutzeri* 0X1. Podstawniki pirogronowe są często spotykane w egzopolisacharydach szczególnie tych produkowanych przez ryzobia. Te reszty razem z kwasami uronowymi determinują właściwości kwasowe egzopolisacharydów ryzobiowych. Proponowany wzór powtarzającej się podjednostki tworzącej łańcuch O-swoisty LPS *O. cytisi* ESC1^T przedstawia poniższy wzór:



V.2 Peryplazmatyczne glukany *Ochrobactrum cytisi* i *Ochrobactrum lupini*

Peryplazmatyczne glukany wraz z innymi bakteryjnymi polisacharydami strukturalnymi pełnią istotną rolę w procesie powstawania efektywnej symbiozy. Ze względu na różnice strukturalne glukany podzielone zostały na cztery klasy. Wśród *Rhizobiales* najpowszechniej występującą grupą glukanów są oligosacharydy cykliczne mające wyłącznie wiązania typu β -(1 $\rightarrow$ 2). Wśród bradyryzobiów stwierdzono natomiast występowanie cyklicznych β -(1 $\rightarrow$ 3);(1 $\rightarrow$ 6) glukanów. Do pozostałych dwóch klas należą oligocukry cykliczne połączone wiązaniami β -(1 $\rightarrow$ 2) wraz z jednym wiązaniem typu α -(1 $\rightarrow$ 6) oraz cząsteczki liniowe z wiązaniem β -(1 $\rightarrow$ 2) [Lee i wsp., 2009].

Na podstawie badań przeprowadzonych na preparatach glukanowych *Ochrobactrum* stwierdzono że oba szczepy syntetyzują oligosacharydy, które możemy zaliczyć do cyklicznych β -(1 $\rightarrow$ 2)-glukanów (cyklosoforany). Przy pomocy analizy MALDI-TOF ustalono, że oba szczepy syntetyzują OPG o identycznym stopniu polimeryzacji wynoszącym od 17 do 25 reszt glukozy. Podobnej wielkości oligomery produkowane są także przez *Brucella abortus*, *Agrobacterium tumefaciens* oraz *Mesorhizobium huakuii* [Briones i wsp, 1997, Choma i Komaniecka, 2003]. Natomiast cykliczne glukany *Sinorhizobium meliloti* zawierają nawet do czterdziestu reszt glukozy w pierścieniu [Dylan i wsp., 1990]. Charakterystyczną cechą β -(1 $\rightarrow$ 2)-glukanów jest minimalna, wynosząca 17, liczba monomerów glukozy. Także w preparatach glukanowych *Ochrobactrum* nie wykryto oligomerów o DP poniżej 17 reszt glukozy. Najobficiej syntetyzowane są cząsteczki zbudowane z 20 i 21 monomerów. Wyróżniającą cechą badanych preparatów jest to, że cząsteczki większe niż 22 członowe występują w znacząco mniejszej ilości. U wcześniej badanych ryzobiów ilość monomerów nie zmniejszała się gwałtownie, lecz malała stopniowo. Uwidaczniał to zbliżony do rozkładu Gaussa wynik analiz glukanów metodą MALDI-TOF. Analiza glukanów z wykorzystaniem metod spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) pozwoliła jednoznacznie stwierdzić brak podstawników niecukrowych w cząsteczkach OPG *O. cytisi* i *O. lupini*. Cecha ta wyraźnie odróżnia glukany *Ochrobactrum* od glukanów *B. japonicum*, *S. meliloti*, *B. abortus* czy *A. tumefaciens* [Lee i wsp., 2009]. U tych bakterii glukany mogą być podstawione m.in. resztami fosfoglicerolu, kwasu bursztynowego czy też metylomalonianu. Brak podstawników niecukrowych jest natomiast charakterystyczny dla glukanu syntetyzowanego przez *M. huakuii* [Choma i Komaniecka, 2003].

V.3 Egzopolisacharydy szczepów *Ochrobactrum cytisi* i *Ochrobactrum lupini*

Podczas badań nad egzopolisacharydem *Ochrobactrum cytisi* i *O. lupini* wykazano, że u obu szczepów jest on zbudowany z mannozy, glukozy i galaktozy. W obu egzopolisacharydach cukry te występują w zbliżonych proporcjach (ok. 6:3:2). Zewnątrzkomórkowe polisacharydy ryzobiów zbudowane są zazwyczaj z glukozy, galaktozy, mannozy oraz kwasów glukuronowego i galakturonowego. Nie występuje w nich mannoza. W przypadku *Ochrobactrum* jej ilość jest natomiast największa. Jej obecność jest natomiast charakterystyczna dla egzopolisacharydów *Brucellaceae*. Przykładowo egzopolisacharyd *B. melitensis* składa się głównie z mannozy, zawiera również ślady galaktozy, glukozaminy i glukozy [Godefroid i wsp., 2010].

Pomimo podobieństwa składu cukrowego oraz pomimo bardzo zbliżonych widm ^1H – NMR zauważono, że wzory produktów metylacji różnią się znacząco. Różnice nie dotyczą otrzymanych pochodnych permetylowanych octanów alditoli, związków które wskazują rodzaj połączeń między mnocukrami, lecz ilość poszczególnych składników. Zastanawiająca jest bardzo duża ilość terminalnej heksozy, którą na podstawie czasu retencji zidentyfikowano, jako mannozę. Trudno powyższy fakt wytłumaczyć liczbą krótkich bocznych odgałęzień głównego łańcucha cukrowego, gdyż nie współgra ona z ilością dwupodstawionych reszt cukrowych. Ze względu na położenie głównego nacisku na badanie sorpcji metali ciężkich przez EPSy niewyjaśnione wątki analiz strukturalnych pozostawiono do rozstrzygnięcia w terminie późniejszym po wykonaniu dodatkowych badań.

Bakterie z rodzaju *Ochrobactrum* są od stosunkowo niedawna badane pod kątem ich aktywności w procesach biodegradacji i bioadsorpcji. Wyniki dotychczasowych badań wskazują na możliwość zastosowania tych bakterii w bioremediacji środowiska naturalnego. Większość badań z wykorzystaniem *Ochrobactrum* prowadzona była na gatunkach *O. anthropi*, *O. intermedium* i *O. tritici* [Ozdemir i wsp., 2003, Sultan i Hasnain, 2007]. Rzadkością natomiast były doniesienia o wynikach badania na gatunkach *O. cytisi* i *O. lupini* tj. na bakteriach symbiotycznych. Tego typu badania z wykorzystaniem bakterii brodawkowych, zasiedlających zróżnicowane środowiska, w tym mocno zanieczyszczone wydają się być szczególnie interesujące i perspektywicznie możliwe do praktycznego wykorzystania.

Jak wspomniano wyżej, w badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie skupiono się na określeniu zdolności EPS *Ochrobactrum lupini* LUP21^T do akumulacji metali ciężkich w różnych warunkach. Ten szczep został wybrany ze względu na produkcję

dużych ilości egzopolisacharydu. Badania nad sorpcją metali ciężkich rozpoczęto od sprawdzenia zdolności wzrostu szczepów *Ochrobactrum*. Okazało się, że szczep lepiej toleruje środowisko zanieczyszczone jonami ołowiu niż jonami kadmu.

Analizując egzopolisacharyd LUP21^T sprawdzono, jaki wpływ na sorpcję jonów metali ma pH roztworu. W przypadku adsorpcji Pb⁺² stwierdzono, że maksimum adsorpcji przypadało na pH 6, a w przypadku Cd⁺² na pH 5. Jednocześnie zauważono, że w przypadku sorpcji jonów obu metali ciężkich przez egzopolisacharyd *O. lupini* pH nie ma większego wpływu na ten proces. Dane dotyczące wpływu pH na zdolności sorpcyjne są dość zróżnicowane w literaturze. Wynika z nich, że proces sorpcji jest uzależniony nie tylko od pH środowiska, ale głównie od typu adsorbentu – w tym od grup funkcyjnych występujących na jego powierzchni a także od adsorbowanego metalu. Dla przykładu sorpcja jonów metali ciężkich przez egzopolisacharyd *O. anthropi* jest bardzo zróżnicowana dla różnych jonów. Największą wartość biosorpcji uzyskano przy pH 2,0 dla jonów Cr(VI), przy pH 8,0 dla Cd(II), i przy pH 3,0 dla jonów Cu (II). Wyniki te wydają się sugerować, że adsorpcja Cr (VI), Cd(II) i Cu(II) do biomasy *O. anthropi* jest zależna głównie od ładunku powierzchniowego [Ozdemir i wsp., 2003]. Optymalne pH dla adsorpcji Cd(II) przez egzopolisacharyd *Sphingomonas paucimobilis* wahało się w zakresie 5,0-6,0 [Tangaromsuk i wsp., 2002]. Natomiast w przypadku sorpcji Cr(VI) przez egzopolisacharyd *O. intermedium* SDCr-5 optymalna wartość pH wynosiła 7 [Sultan i Hasnain, 2007]. Wartości pH wpływa na rozpuszczalność metali oraz stan jonizacji grup funkcyjnych, takich jak grupy karboksylowe, fosforany i aminowe. Grupy te są silnymi akceptorami kationów.

Przy użyciu spektroskopii w podczerwieni próbowano ustalić, jakie grupy funkcyjne obecne w EPS *O. lupini* LUP21^T mogą być zaangażowane w proces sorpcji jonów metali. Analiza wyników pozwala stwierdzić, że w proces sorpcji są zaangażowane głównie grupy zawierające atomy tlenu. Są nimi grupy karboksylowe, karbonylowe i hydroksylowe. Pierwsze dwa to zwykle elementy podstawników niecukrowych, zaś ostatni to wolne grupy hydroksylowe cukrów. Podobne wyniki uzyskano dla wielu innych szczepów. Przykładowo analiza widm IR egzopolisacharydu *Lactobacillus plantarum* 70810 wykazała, że w proces sorpcji Pb(II) zaangażowane są grupy: -OH, -COO⁻, =C=O, i -NH₂ [Feng i wsp., 2012].

VI WNIOSKI

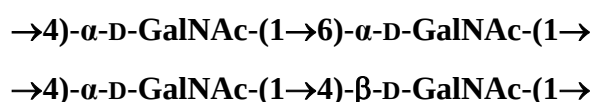
Ochrobactrum cytisi ESC1^T

1. Na podstawie elektroforegramów stwierdzono że lipopolisacharyd *O. cytisi* jest heterogenny. Rozdziały elektroforetyczne wskazują na obecność znacznych ilości szorstkich frakcji LPS.
2. W preparacie LPS zidentyfikowano następujące cukry: **α -D-fukoze**, **β -D-galaktozamine**, ramnozę, mannozę, glukozę, galaktozę, 4-metylogalaktozaminę oraz *N*-acetylo-D-glukozaminę.
3. Kwasy tłuszczowe zidentyfikowane w LPS to: 14:0(3-OH), **16:0(3-OH)**, 18:0(3 - OH), 16:0, **27-OH-28:0**.
4. Łańcuch O-swoisty LPS ESC1^T budują podjednostki, w skład, których wchodzi reszty α -D-fukozy i β -D-galaktozaminy połączone wiązaniami (1→3). Przypuszczalny wzór półstrukturalny to:

$$[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Fuc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GalNAc(1}\rightarrow)]_n$$
5. Analiza glukanu (OPG) wykazała że jest on zbudowany z monomerów glukozy połączonych wiązaniami $\beta(1\rightarrow 2)$ glikozydowymi
6. Jedna cząsteczka glukanu zawiera od 17 do 28 cząsteczek glukozy, przy czym najczęściej występują glukany zbudowane z 19-22 reszt glukozy.
7. Preparat egzopolisacharydu ze szczepu ESC1^T to polimer mannozy, glukozy oraz galaktozy (proporcje cukrów to odpowiednio: 6:3:2).

Ochrobactrum lupini LUP21^T

1. LPS LUP21^T to materiał heterogenny. Rozdziały elektroforetyczne wskazują na obecność znacznych ilości gładkich frakcji.
2. W preparacie LPS stwierdzono obecność następujących cukrów: **D-*altro*-heptulozy**, ***N*-acetylo-D-galaktozaminy**, glukozy, mannozy, galaktozy oraz *N*-acetylo-D-glukozaminy.
3. Kwasy tłuszczowe wykryte w lipopolisacharydzie to: 3-OH-14:0, **3-OH-16:0**, 3 - OH-18:0, **27-OH-28:0**. Występowały także niewielkie ilości innych kwasów.
4. Frakcja wysokocząsteczkowa O-swoista LPS składa się z: **D-*altro*-heptulozy** i ***N* - acetylo-D galaktozaminy**. Galaktozamina tworzy dwa typy polimerów:



Są one bogato dekorowane resztami D-*altro*-heptulozy.

5. Peryplazmatyczne glukany syntetyzowane przez *O. lupini* LUP21^T są zbudowane z monomerów glukozy połączonej wiązaniami $\beta(1\rightarrow2)$ glikozydowymi. Ilość glukoz przypadająca na jedną cząsteczkę glukanu waha się w granicach od 17 do 27, przy czym najczęściej występują glukany zbudowane z 19-22 reszt glukozy.
6. Preparat egzopolisacharydu to polimer mannozy, glukozy oraz galaktozy (proporcje cukrów to odpowiednio: 6:3:2).
7. Stężenia jonów kadmu wyższe niż 10 mg/l działają hamująco na wzrost bakterii *O. lupini* LUP21^T, natomiast w przypadku jonów ołowiu nawet stężenie 80 mg/l nie zahamowało całkowicie wzrostu tych mikroorganizmów.
8. Sprawdzono właściwości sorpcyjne EPS LUP21^T w stosunku do jonów kadmu (II) i ołowiu (II).

VII LITERATURA

1. **Aguilar J.M.M.**, Ashby A.M., Richards A.J.M., Loake G.J., Watson M.D., Shaw C.H. (1988) Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. J. Gen. Microbiol. 134, 2741–2746.
2. **Altabe S.**, Inon de Iannino N., Mendoza D., Ugalde R. (1994) New osmoregulated $\beta(1-3),(1-6)$ glucosyltransferase(s) in *Azospirillum brasilense*. J. Bacteriol. 176(16), 4890–4898.
3. **Altabe S.**, Talaga P., Wieruszeski J., Lippens G., Ugalde R., Bohin J.P. (1998) Periplasmic glucans of *Azospirillum brasilense*. Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century. Edytor: Elmerich C., Kondorosi A., Newton W., Kluwer Academic Publishers, p. 390.
4. **Amemura A.**, Harada T., Abe M., Higashi S., (1983) Structural studies of the acidic polysaccharide from *Rhizobium trifolii* 4S. Carbohydr. Res., 115, 165-174.
5. **Anderson M.S.**, Bulawa C.E., Raetz C.R.H. (1985) The biosynthesis of Gram-negative endotoxin. formation of lipid A precursors from UDP-GlcNAc in extracts of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 260, 15536–15541.
6. **Anderson M.S.**, Bull H.G., Galloway S.M., Kelly T.M., Mohan S., Radica K., Raetz C.R.H. (1993) UDP-*N*-acetylglucosamine acyltransferase of *Escherichia coli*. The first step of endotoxin biosynthesis is thermodynamically unfavorable. J. Biol. Chem., 268, 19858–19865.
7. **Anwar M.A.**, Choi S. (2014) Gram-negative marine bacteria: structural features of lipopolysaccharides and their relevance for economically important diseases. Marine Drugs, 12, 2485-2514.
8. **Apicella M.A.**, Griffiss J.M., Schneider H (1994) Isolation and characterization of lipopolysaccharides, lipooligosaccharides, and lipid A. Methods Enzymol. 235, 242-52.
9. **Armitage J.P.**, Gallagher A., Johnston A.W.B. (1988) Comparison of the chemotactic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* with and without the nodulation plasmid. Mol. Microbiol. 2, 743–748.
10. **Aucken H.M.**, Pitt T.L. (1993) Lipopolysaccharide profile typing as a technique for comparative typing of Gram-negative bacteria. J. Clinical Microbiol., 31, 1286-1289.
11. **Bahlawane C.**, Baumgarth B., Serrania J., Rüberg S., Becker A. (2008) Fine-tuning of galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* by differential WggR (ExpG)-, PhoB-, and MucR- dependent regulation of two promoters. J. Bacteriol. 190, 3456–3466.
12. **Barnett M. J.**, Kahn M. L. (2005) pSymA of *Sinorhizobium meliloti*: Nitrogen Fixation and More. w: Palacios R., Newton W. E.: Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms. Springer, 113-132.
13. **Barnett M.J.**, Fisher R.F. (2006) Global gene expression in the rhizobial–legume symbiosis. Symbiosis 42, 1–24.
14. **Bathe S.**, Achouak W., Hartmann A., Heulin T., Schlöter M., Lebuhn M. (2005) Genetic and phenotypic microdiversity of *Ochrobactrum* spp. FEMS Microbiol Ecol 56, 272–280.
15. **Becker A.**, Fraysse N., Sharypova L. (2005) Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. Mol. Plant Microbe In. 18, 899–905.
16. **Becker A.**, Kleickmann A., Keller M., Arnold W., Pühler A. (1993a) Identification and analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoAMONP* genes involved in exopolysaccharide

- biosynthesis and mapping of promoters located on the *exoHKLAMONP* fragment. Mol. Gen. Genet., 241, 367–379.
17. **Becker A.**, Kleickmann A., Küster H., Keller M., Arnold W., Pühler A. (1993b) Analysis of the *Rhizobium meliloti* genes *exoU*, *exoV*, *exoW*, *exoT* and *exoI* involved in exopolysaccharide biosynthesis and nodule invasion: *exoU* and *exoW* probably encode glucosyltransferases. Mol. Plant Microbe Interact., 6, 735–744.
 18. **Becker A.**, Küster H., Niehaus K., Pühler A. (1995) Extension of the *Rhizobium meliloti* succinoglycan biosynthesis gene cluster: identification of the *exsA* gene encoding an ABC transporter protein, and the *exsB* gene which probably codes for a regulator of succinoglycan biosynthesis. Mol. Gen. Genet. 249, 487–497.
 19. **Becker A.**, Ruberg S., Kuster H., Roxlau A.A., Keller M., Ivashina T., Cheng H. P., Walker G. C., Puhler A. (1997) The 34-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. J. Bacteriol. 179, 1375–1384.
 20. **Begum A.A.**, Leibovitch S., Migner P., Zhang F. (2001) Specific flavonoids induced *nod* gene expression and pre-activated *nod* genes of *Rhizobium leguminosarum* increased pea (*Pisum sativum* L.) and lentil (*Lens culinaris* L.) nodulation in controlled growth chamber environments. J. Exp. Bot. 52, 1537–1543.
 21. **Bertram-Drogatz P.A.**, Quester I., Becker A., Pühler A. (1998) The *Sinorhizobium meliloti* MucR protein, which is essential for the production of high-molecular-weight succinoglycan exopolysaccharide, binds to short DNA regions upstream of *exoH* and *exoY*. Mol. Gen. Genet. 257, 433–441.
 22. **Bertram-Drogatz P.A.**, Rüberg S., Becker A. (1997) The regulatory protein MucR binds to a short DNA region located upstream of the *mucR* coding region in *Rhizobium meliloti*. Mol. Gen. Genet. 254, 529–538.
 23. **Bhagwat A.**, Jun W., Liu L. (2009) Osmoregulated periplasmic glucans of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are required for optimal virulence in mice Microbiology, 155(1), 229–237.
 24. **Bhagwat A.**, Mithöfer A., Pfeffer P., Kraus C., Spickers N., Hotchkiss A., Ebel J. Keister, D. L. (1999) Further studies of the role of cyclic β -glucans in symbiosis. An *ndvC* mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1→3)- β -glucosyl. Plant Physiol. 119, 1057–1064.
 25. **Bhat U.R.**, Carlson R.W. (1992) Chemical characterization of pH dependent structural epitopes of lipopolysaccharides from *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. J. Bacteriol. 174, 2230–2235.
 26. **Bhat U.R.**, Forsberg L.S., Carlson R.W. (1994) Structure of lipid A component of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* lipopolysaccharide. J. Biol. Chem. 269, 14402–14410.
 27. **Bhat U.R.**, Mayer H., Yokota A., Hollingsworth R. I., Carlson R. W. (1991b) Occurrence of lipid A variants with 27-hydroksoctacosanoic acid in lipopolysaccharides from members of the family *Rhizobiaceae*. J. Bacteriol. 173, 2155–2159.
 28. **Bittinger M.A.**, Milner J.L., Saville B.J., Handelsman J. (1997) *rosR*, a determinant of nodulation competitiveness in *Rhizobium etli*. J. Bacteriol. 10, 180–186.
 29. **Bligh E.**, Dyer W. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911–918.
 30. **Bock K.**, Vinogradov E.V., Holst O., Brade H. (1994) Isolation and structural analysis of oligosaccharide phosphates containing the complete carbohydrate chain of the

- lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* strain H11 (non-01). Eur. J. Biochem. 225, 1029-1039.
31. **Bohin J.P. (2000)** Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 186, 11-19.
 32. **Bontemps-Gallo S., Cogez V., Robbe-Masselot C., Quintard K., Dondeyne J., Madec E., Lacroix J. (2013)** Biosynthesis of osmoregulated periplasmic glucans in *Escherichia coli*: The phosphoethanolamine transferase is encoded by *opgE*. BioMed Research International.
 33. **Bontemps-Gallo S., Madec E., Dondeyne J. (2013)** Concentration of osmoregulated periplasmic glucans (OPGs) modulates the activation level of the RcsCD RcsB phosphorelay in the phytopathogen bacteria *Dickeya dadantii*. Environmental Microbiology, 15, 881–894.
 34. **Borthakur D., Barker RF., Latchford JW., Rossen L., Johnston AW. (1988)** Analysis of *pss* genes of *Rhizobium leguminosarum* required for exopolysaccharide synthesis and nodulation of peas: their primary structure and their interaction with *psi* and other nodulation genes. Mol. Gen. Genet. 213, 155–162.
 35. **Borthakur D., Johnston A.W.B. (1987)** Sequence of *psi*, a gene of the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli* which inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by *psr*, another gene on the symbiotic plasmid. Mol. Gen. Genet. 207, 149–154.
 36. **Borucki W. (1998)** Struktura i funkcjonowanie brodawek korzeniowych roślin motylkowych. Wiadomości Botaniczne 42, 41-61.
 37. **Breedveld M.W., Canter Cremers, H.C.J., Batley M., Posthumus M.A., Zevenhuizen, L.P.T.M., Wijffelman, C.A., Zehnder A.J.B. (1993)** Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behaviour of *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol., 175, 750–757.
 38. **Breedveld M.W., Miller K. (1994)** Cyclic β -glucans of members of the family *Rhizobiaceae* Microbiol. Rev. 58(2), 145-161.
 39. **Breedveld M.W., Zevenhuizen L.P., Canter Cremers H.C., Zehnder A.J. (1993)** Influence of growth conditions on production of capsular and extracellular polysaccharides by *Rhizobium leguminosarum*. Antonie Van Leeuwenhoek. 64, 1–8
 40. **Brencic A., Winans S.C. (2005)** Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 69, 155–194.
 41. **Briones G., Inon de Iannino N., Steinberg M., Ugalde R., A (1997)** Periplasmic cyclic 1,2- β -glucan in *Brucella* spp. is not osmoregulated. Microbiology, 143, 1115-1124.
 42. **Broadly K.W., Rietschel E.T., Lüderitz O. (1981)** The chemical structure of the lipid A component of lipopolysaccharides from *Vibrio cholerae*. Eur. J. Biochem., 115, 463-468.
 43. **Brooke J.S., Valvano M.A. (1996)** Biosynthesis of inner core lipopolysaccharide in enteric bacteria identification and characterization of a conserved phosphoheptose isomerase. J. Biol. Chem., 271: 3608–3614.
 44. **Bruins M., Kapil S., Oehme F. (2000)** Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 198-207.
 45. **Buendia A.M., Enenkel B., Koplin R., Niehaus K., Arnold W., Pühler A. (1991)** The *Rhizobium meliloti* *exoZ/exoB* fragment of megaplasmid 2: ExoB functions as an UDP-glucose 4-epimerase and ExoZ shows homology to NodX of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain TOM. Mol. Microbiol., 5, 1519–1530.

46. **Bulawa C.E.**, Raetz C.R.H. (1984) The biosynthesis of Gram-negative endotoxin. Identification and function of UDP-2,3-diacylglucosamine in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 259, 4846–4851.
47. **Bushell S.**, Mainprize I., Wear M., Lou H., Whitfield C., Naismith J. (2013) Wzi is an outer membrane lectin that underpins group 1 capsule assembly in *Escherichia coli*. Structure 21, 844–853.
48. **Butty F.D.**, Aucoin M., Morrison L., Ho N., Shaw G., Creuzenet C. (2008) Elucidating the formation of 6-deoxyheptose: biochemical characterization of the GDP-D-glycero-D-manno-heptose C6 dehydratase, DmhA, and its associated C4 reductase, DmhB. Biochemistry 48, 7764–7775.
49. **Caetano-Anolles G.**, Crist-Estes D.K., Bauer D.W. (1988) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. J. Bacteriol. 170, 3164–3169.
50. **Campbell G.R.O.**, Sharypova L.A., Scheidle H., Jones K.M., Niehaus K., Becker A., Walker G.C. (2003) Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. J. Bacteriol. 185, 3853–3862.
51. **Canter Cremers H.C.J.**, Stevens K., Lugtenberg B.J.J., Wijffelman C.A., Batley M., Redmond J.W., Breedveld M., Zevenhuizen L.P.T.M. (1991) Unusual structure of the exopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain 248. Carbohydr. Res., 218, 185–200.
52. **Cárdenas L.**, Holdaway-Clarke T. (2000) Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. Plant Physiol. 123, 443–52.
53. **Carlson R. W.**, Shatters R., Duh J.L., Turnbull E., Hanley B., Rolfe B.G., Djordjevic M.A. (1987b) The isolation and partial characterization of the lipopolysaccharides from several *Rhizobium trifolii* mutants affected in root hair infection. Plant Physiol. 84(2), 421–7.
54. **Carlson R.W.** (1984) Heterogeneity of *Rhizobium lipopolysaccharides*. J. Bacteriol. 158, 1012–1017.
55. **Carlson R.W.**, Bhat U.R., Reuhs B., (1992b) *Rhizobium lipopolysaccharides*; the structures and evidence for their importance in the nitrogen-fixing symbiotic infection of their host legumes. Current topic in plant molecular biology. Plant biotechnology and development. Ed. Gresshoff P.M., CRC Press. Boca. Raton, Florida s. 33.
56. **Carlson R.W.**, Kalembsa S., Turowski D., Pachori P., Noel K.I. (1987a) Characterization of the lipopolysaccharide from *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection threatened development. J. Bacteriol. 169, 4923–4928.
57. **Carlson R.W.**, Krishnaiah B. (1992a) Structures of the oligosaccharides obtained from the core regions of the lipopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* 61A101c and its symbiotically defective lipopolysaccharide mutant, JS314. Carbohydr Res. 08, 231, 205–219.
58. **Carlson R.W.**, Reuhs B. L., Forsberg L.S., Kannenberg E. L. (1999) Rhizobial cell surface carbohydrates: Their structure, biosynthesis and functions. W.: Genetics of Bacterial Polysaccharides, Ed., Goldberg J.B., CRC Press, Boca Raton, s. 53.
59. **Carlson R.W.**, Reuhs B., Chen T., Bhat U.R., Noel K.D. (1995) Lipopolysaccharide core structures in *Rhizobium etli* and mutants deficient in O-antigen. J. Biol. Chem., 270: 11783–11788.
60. **Caroff M.**, Deprun C., Richards J.C., Karibian D. (1994) Structural characterization of the lipid A of *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. J. Bacteriol., 176: 5156–5159.

61. **Carrion M.**, Bath U. R., Reuhs B., Carlson R. W. (1990) Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 172, 1725-1731.
62. **Castro C.**, Molinaro A., Lanzetta R., Silipo A., Parrilli M. (2008) Lipopolysaccharide structures from *Agrobacterium* and *Rhizobiaceae* species. Carbohydr. Res. 343, 1924–1933.
63. **Catoira R.**, Galera C. (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. Plant Cell. 12, 1647-66.
64. **Cedergren R.A.**, Wang Y., Hollingsworth R.I. (1996) The “missing” typical *Rhizobium leguminosarum* O-antigen is attached to a fatty acylated glycerol in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* 4S, a strain that also lacks the usual tetrasaccharide “core” component. J. Bacteriol. 178, 5529-5532.
65. **Chen S.**, Hu M., Liu J., Zhong G., Yang L., Rizwanh-ul-Haq M., Han H. (2011) Biodegradation of beta-cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Ochrobactrum lupini* DG-S-01. Journal of Hazardous Material 187, 433-440.
66. **Cheng H.-P.**, Walker G.C. (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 180, 5183–5191.
67. **Cho E.** and Jung, S. (2009) Novel acetylated linear periplasmic glucans isolated from *Pseudomonas syringae*. Bull. Korean Chem. Soc. 30, 1-4.
68. **Cho E.**, Jeon Y., Jung S. (2009) Novel succinylated and large-sized osmoregulated periplasmic glucans of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Carbohydr. Res. 344, 996-1000.
69. **Cho E.**, Lee S., Jung S. (2008) Novel acetylated α -cyclosophorotridecaose produced by *Ralstonia solanacearum*. Carbohydr. Res. 343, 912-918.
70. **Cho, E.**, Lee, S. and Jung, S. (2007) Benzoate methanolysis catalyzed by α -cyclosophorohexadecaose isolated from *Xanthomonas oryzae*. Carbohydr. Polym. 70, 174-180.
71. **Choma A** (1999) Fatty acid composition of *Mesorhizobium huakuii* lipopolysaccharides. Identification of 27-oxooctacosanoic acid. FEMS Microbiol Lett 177: 257–262.
72. **Choma A.** and Komaniecka I. (2003) Characterisation of *Mesorhizobium huakuii* cyclic β -glucan. Acta Biochem. Polon. 50(4), 1273–1281.
73. **Choma A.**, Sowiński P. (2004) Characterization of *Mesorhizobium huakuii* lipid A containing both D-galacturonic acid and phosphate residues. Eur J Biochem 271, 1310–22.
74. **Choma A.**, Sowinski P., Mayer H., (2000) Structure of the O-specific polysaccharide of *Mesorhizobium huakuii* IFO15243T Carbohydr. Res., 329, 459–464.
75. **Choma A.**, Urbanik-Sypniewska T., Russa R., Kutkowska J., Mayer H. (2000) Occurrence and taxonomic significance of oxo-fatty acids in lipopolysaccharides from members of *Mesorhizobium*. Syst. Appl. Microbiol., 23, 185-190.
76. **Clemens S.** (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212, 475-486.
77. **Clementz T.**, Bednarski J., Raetz C.R.H. (1996) Function of the *htrB* high temperature requirement gene of *Escherichia coli* in the acylation of lipid A. Htrb catalyzed incorporation of laurate. J. Biol. Chem., 271: 12095–12102.
78. **Cogez V.**, Evgueni Gak E., Puskas A., Kaplan S., Bohin, J. (2002) The *opgGIH* and *opgC* genes of *Rhodobacter sphaeroides* form an operon that controls backbone synthesis and succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. Eur. J. Biochem. 269, 2473-2484.

79. **Cogez V.**, Talaga P., Lemoine J., Bohin J. (2001) Osmoregulated Periplasmic Glucans of *Erwinia chrysanthemi*. J. Bacteriol. 183(10), 3127–3133.
80. **Cohn J.**, Bradley D., Stacey G., (1998). Legume nodule organogenesis. Trends in Plant Science 3: 105-110.
81. **Cooper J.E.** (2004) Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. Adv. Bot. Res. 41, 1–62.
82. **Cooper J.E.** (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. J. Appl. Microbiol. 103, 1355–1365.
83. **Crespi M.**, Gálvez S. (2000) Molecular mechanisms in root nodule development. J. Plant Growth Regul. 19, 155-166.
84. **Cuthbertson L.**, Mainprize I., Naismith J., Whitfield C. (2009) Pivotal roles of the outer membrane polysaccharide export and polysaccharide copolymerase protein families in export of extracellular polysaccharides in Gram-negative bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73(1), 155-177.
85. **D’Haeze W.**, Glushka J., De Rycke R., Holsters M., Carlson R. (2004) Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. Mol. Microbiol. 52(2), 485-500.
86. **Dalla V.N.**, Minka S., Bruneteau M., Mayer H., Michel G. (1985) Lipopolysaccharides from *Yersinia pestis*. Studies on lipid A of lipopolysaccharides I and II. Eur. J. Biochem., 151, 399-404.
87. **Dazzo F.B.**, Truchet G.L., Sherwood J.E., Hrabak E.M., Abe M., Pankratz S.H. (1984) Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii* - clover symbiosis. Appl. Environ. Microbiol. 48, 1140–1150.
88. **Deakin W.J.**, Broughton W.J. (2009) Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. Nat. Rev. Microbiol. 7, 312–320.
89. **Dharmatilake A.J.**, Bauer W.D. (1992) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. Appl. Environ. Microbiol. 58, 1153–1158.
90. **Djordjevic S.P.**, Chen H., Batley M., Redmond J.W., Rolfe B.G. (1987) Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by addition of homologous exopolysaccharides. J. Bacteriol. 169, 53–60.
91. **Downie J.A.** (2010) The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. FEMS Microbiol. Rev. 34, 150–170.
92. **Downie J.A.**, Young P.J.W. (2001) The ABC of symbiosis. Nature 412, 597-598.
93. **Dubois M.**, Gilles K., Hamilton I., Rebers P., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28, 350-356.
94. **Dylan T.**, Helinski D., Ditta G. (1990) Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires β -(1-2)-glucan. J. Bacteriol. 172, 1400-8.
95. **Feldman M.F.**, Marolda C.L., Monteiro M.A., Perry M.B., Parodi A.J., Valvano M.A. (1999) The activity of a putative polyisoprenol-linked sugar translocase (Wzx) involved in *Escherichia coli* O antigen assembly is independent of the chemical structure of the O repeat. J. Biol. Chem., 274, 35129–35138.
96. **Feng M.**, Chen X., Li C., Nurgul R., Dong M. (2012) Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from Chinese Paocai and biosorption of Pb (II) by its exopolysaccharide. Journal of food science Vol 77, 6.

97. **Ferrer J.L.**, Austin M.B., Stewart Jr. C., Noel J.P. (2008) Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 356–370.
98. **Finan T.M.**, Weidner S., Womg K., Buhrmester J., Chain, P., Vorhölter F.J., Hernandez-Lucas I., Becker A., Cowie A., Gouzy J., et al. (2001) The complete sequence of the 1683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 9889–9894.
99. **Firmin J.L.**, Wilson K.E., Rossen L., Johnston A.W.B. (1986) Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature* 324, 90–92.
100. **Forsberg L. S.**, Bhat U. R., Carlson R. W. (2000) Structural characterization of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Rhizobium etli* strain CE3. *J. Biol. Chem.*, 275, 18851–18863.
101. **Forsberg L.S.**, Carlson R.W. (1998) The structure of the lipopolysaccharide from *Rhizobium etli* strains CE358 and CE359. The complete structure of the core region of *R. etli* lipopolysaccharides. *J. Biol. Chem.* 273, 2747–2757.
102. **Frayse N.**, Couderc F., Poinot V. (2003) Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270, 1365–1380.
103. **Gabryś H.** (2002). *Gospodarka azotowa*. [w]: Kopcewicz J., Lewak S.: *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo naukowe PWN; 246–258.
104. **Gagnon H.**, Ibrahim R.K. (1998) Aldonic acids: a novel family of nod gene inducers of *Mesorhizobium loti*: *Rhizobium lupini* and *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 988–998.
105. **Gala A.**, Sanak-Rydlewska S. (2010) Sorpcja jonów metali toksycznych z roztworów wodnych na odpadach naturalnych- przegląd literaturowy, *Górnictwo i Geoinżynieria*, 34(4/1).
106. **Gamian A.**, Jones C., Lipinski T., Korzeniowska-Kowal A., Ravenscroft N. (2000) Structure of the sialic acid-containing O-specific polysaccharide from *Salmonella enterica* serovar *Toucr* O48 lipopolysaccharide. *Eur J Biochem*, 267, 3160–3167.
107. **Gao M.**, D’Haeze W., De Rycke R., Wolucka B., Holsters M. (2001) Knockout of an Azorhizobial dTDP-L-Rhamnose Synthase Affects Lipopolysaccharide and Extracellular Polysaccharide Production and Disables Symbiosis with *Sesbania rostrate*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 857–866.
108. **Gay-Fraret J.**, Ardisson S., Kambara K., Broughton W., Deakin W., Le Que’re A., (2012) Cyclic- β -glucans of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) sp. strain NGR234 are required for hypo-osmotic adaptation, motility, and efficient symbiosis with host plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 333, 28–36.
109. **Gerwig G.J.**, Kamerling J.P., Vliegthart J.F. (1978) Determination of the D and L configuration of neutral monosaccharides by high-resolution capillary G.L.C. *Carbohydr. Res.* 62, 349–357.
110. **Gharyal P.K.**, Ho S., Wang J.L., Schindler M. (1989) O-antigen from *Bradyrhizobium japonicum* lipopolysaccharide inhibits intercellular (symplast) communication between soybean (*Glycine max*) calls. *J. Biol. Chem.*, 264, 12119–12121.
111. **Gibson K.**, Kobayashi H., Walker G. (2008); Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annu Rev Genet.* 42: 413–441.
112. **Gil-Serrano A.M.**, Gonzalez-Jimenez I., Mateo P.T., Bernabe M., Jimenez-Barbero J., Megias M., Romero-Vazquez M. J. (1995) Structural analysis of the O-antigen of the lipopolysaccharide of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Carbohydr. Res.*, 275, 285–294.

113. **Giraud E.**, Moulin L., Vallenet D., Barbe V., Cytryn E., Avarre J.C., Jaubert M. (2007) Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 316, 1307–1312.
114. **Glucksmann M.A.**, Reuber T.L., Walker G.C. (1993) Genes needed for the modification, polymerization, export and processing of succinoglycan by *Rhizobium meliloti*: A model for succinoglycan biosynthesis. *J. Bacteriol.*, 175, 7045–7055.
115. **Godefroid M.**, Svensson M., Cambier P., Uzureau S., Mirabella A., Bolle X., Cutsem P., Widmalm G., Letesson J. (2010) *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 364–377.
116. **Gonzalez J.E.** Reuhs B., Walker G.C. (1996) Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8636–8641.
117. **Górska S.**, Grycko P., Rybka J., Gamian A. (2007) Egzopolisacharydy bakterii kwasu mlekowego – biosynteza mlekowego – biosynteza i struktura. *Postepy Hig. Med. Dosw.*; 61, 805–818.
118. **Göttfert M.**, Grob P., Hennecke H. (1990) Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes: determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2680–2684.
119. **Hakomori S.** (1964) A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.* 55, 205, 205–208.
120. **Hartwig U.A.**, Maxwell C.A., Joseph C.M., Phillips D.A. (1990) Effects of alfalfa nod gene-inducing flavonoids on *nodABC* transcription in *Rhizobium meliloti* strains containing different *nodD* genes. *J. Bacteriol.* 172, 2769–2773.
121. **Hase S.**, Reitschel E.T. (1977) The chemical structure of the lipid A component of lipopolysaccharides from *Chromobacterium violaceum* NCTC 9694. *Eur. J. Biochem.*, 75, 23–34.
122. **Her G.R.**, Glazebrook J., Walker G.C., Reinhold V.N. (1990) Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium meliloti* strain Rm 1021. *Carbohydr Res*, 198, 305–312.
123. **Hirsch A.M.** (1992). Developmental biology of legume nodulation. *New Phytol.* 122, 211–237
124. **Holst O.** (2011) Bacterial lipopolysaccharides structure, chemical synthesis and interaction with host cells. Springer p. 26.
125. **Horvath B.**, Kondorosi E., John M., Schmidt J., Torok I., Gyorgypal Z., Barabas I., Wieneke U., Schell J., Kondorosi A. (1986) Organization, structure and symbiotic function of *Rhizobium meliloti* nodulation genes determining host specificity for alfalfa. *Cell* 46, 335–343.
126. **Imoto M.**, Kusumoto S., Shiba T., Naoki H., Iwashita T., Rietschel E. Th., Wollenweber H. W., Galanos C., Lüderitz O. (1983) Chemical structure of *E. coli* lipid A: linkage site of acyl groups in the disaccharide backbone. *Tetrahedron Lett.*, 24, 4017–4020.
127. **Ivashina T.V.**, Khmelnitsky M.I., Shlyapnikov M.G., Kanapin A.A., Ksenzenko V.N. (1994) The *pss4* gene from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* VF39: cloning, sequence and the possible role in polysaccharide production and nodule formation. *Gene.*, 150, 111–116.
128. **Tangaromsuk J.P.**, Pokethitiyook, M. Kruatrachue, E.S. Upatham (2002) Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass *Bioresour. Technol.*, 85, pp. 103–105

129. **Jackson B.**, Bohin J.P., Kennedy E. (1984) Biosynthesis of membrane derived oligosaccharides: characterization of *opgB* mutants defective in phosphoglycerol transferase I activity. *J. Bacteriol.* 160, 976-981.
130. **Jakubowska A.**, Kowalczyk K. (1998) Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin *Postępy biochemii* 44(1), 73-8.
131. **Janczarek M.** (2011) Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in *Rhizobia* *Int. J. Mol. Sci.*, 12, 7898-7933.
132. **Janczarek M.**, Kalita M., Skorupska A. (2009) New taxonomic markers for identification of *Rhizobium leguminosarum* and discrimination between closely related species. *Arch. Microbiol.*, 191, 207-219.
133. **Janczarek M.**, Król J., Skorupska A. (1999) The *pssB* gene product of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is homologous to a family of inositol monophosphatases. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 319-325.
134. **Janczarek M.**, Mazur A., Wielbo J., Król J., Skorupska A. (1999) Egzopolisacharydy rizobiowe: struktura, biosynteza i funkcja w symbiozie. *Post. Mikrobiol.* 38(3), 217-244.
135. **Janczarek M.**, Rachwał K., Marzec A., Grządziel J., Palusińska-Szys M. (2014) Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume–rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology* 85, 94-113.
136. **Janczarek M.**, Skorupska A. (2004) Regulation of *pssA* and *pssB* gene expression in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* in response to environmental factors. *Anton. Leeuw.* 85, 217-227.
137. **Janczarek M.**, Skorupska A. (2007) The *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* RosR: Transcriptional regulator involved in exopolysaccharide production. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 867-881.
138. **Janczarek M.**, Skorupska A. (2011) Modulation of *rosR* expression and exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* by phosphate and clover root exudates. *Int. J. Mol. Sci.* 12 (6), 4132-4155.
139. **Jann B.**, Prehm P, Jann K (1978) Citrobacter O-Antigens: Structure of the O-antigenic polysaccharide from *Citrobacter* sp. 396. *J Bacteriol*, 134, 462-469.
140. **Ji G.**, Silver S. (1995) Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.* 14, 61-75.
141. **Johnson, K.G.**, Perry, M.B. (1976) Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharides. *Can. J. Microbiol.* 22, 29-34.
142. **Jumas-Bilak E.**, Michaux-Charachon S., Bourg G., Ramuz M., Allardet-Servent A. (1998) Unconventional genomic organization in the alpha subgroup of the Proteobacteria. *J. Bacteriol.*, 180, 2749-2755.
143. **Kadrmaz J.L.**, Brozek K.A., Raetz C.R.H. (1998) Lipopolysaccharide core glycosylation in *Rhizobium leguminosarum*. An unusual mannosyl transferase resembling the heptosyl transferase I of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 271, 32119-32125.
144. **Kaneko T.**, Nakamura Y., Sato S., Minamisawa K., Uchiumi T., Sasamoto S., Watanabe A., Idesawa K., Iriguchi M., Kawashima K., Kohara M., Matsumoto M., Shimpo S., Tsuruoka H., Wada T., Yamada M., Tabata S. (2002) Complete genome sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacteria *Bradyrhizobium japonicum*. *USDA110. DNA Res.* 7, 331-338.
145. **Kanipes M.I.**, Ribeiro A.A., Lin S.L., Cotter R.J., Raetz C.R.H. (2003) A mannosyl transferase required for lipopolysaccharide inner core assembly in *Rhizobium leguminosarum*. Purification, substrate specificity, and expression in *Salmonella waac* mutants. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278, 16356-16364.

146. **Kannenberg E.**, Carlson R.W. (2005) An abundance of Nod factors. *Chem. Biol.* 12, 956–958.
147. **Kannenberg M.J.**, Reuhs B.L., Forsberg L.S., Carlson R.W. (1998) Lipopolysaccharides and K-antigens: Their structures biosynthesis and functions in the *Rhizobiaceae*. Spaink, H. P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. J., Eds.; Kluwer Academic: Dordrecht, 119–154.
148. **Kasai N.**, Arata S., Mashimo J., Ogimori M., Mizutani T., Egawa K. (1990) Structure-activity relationships of endotoxic lipid A containing 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose. *Endotoxin Research Series*, Elsevier, Amsterdam 1, 121.
149. **Kaszowska M.** (2004) Budowa chemiczna i biosynteza lipopolisacharydu– ważnego składnika osłony komórkowej bakterii Gram-ujemnych *Postępy Hig Med Dosw.*, 58 p. 333-342.
150. **Katzenellenbogen E.**, Ekiel I., Romanowska E. (1988) The structure of the O-specific polysaccharide chain from *Citrobacter* O23-lipopolysaccharide. *Carbohydr Res* 179, 349–357.
151. **Katzenellenbogen E.**, Kocharova N.A., Zatonsky G.V., Mieszala M., Gamian A., Bogulska M., Shashkov A.S., Romanowska E., Knirel Y.A. (1998) Immunochemical studies of the lipopolysaccharide O-specific polysaccharide of *Hafnia alvei* PCM 1199 related to *H. alvei* PCM 1205. *Eur J Biochem* 251, 980–985.
152. **Katzenellenbogen E.**, Romanowska E., Kocharova N.A., Shashkov A.S., Knirel Y.A., Kochetkov N.K. (1995) Structure of the polysaccharide of *Hania alvei* 1204 containing 3,6-dideoxy-3-formamido-D-glucose. *Carbohydr Res* 273, 187–195.
153. **Keenleyside W.J.**, Whitfield C. (1995) Lateral Transfer of *rfb* Genes: A mobilizable ColE1-type plasmid Carries the *rfbO*: 54 (O: 54 antigen biosynthesis) gene cluster from *Salmonella enterica* serovar Borreze. *J. Bacteriol.*, 177, 5247–5253.
154. **Keenleyside W.J.**, Whitfield C. (1996) A novel pathway for O-polysaccharide biosynthesis in *Salmonella enterica* serovar Borreze *J. Biol. Chem.* 271, 28581–28592.
155. **Keller M.**, Roxlau A., Wenig W.M., Schmidt M., Quandt J., Niehaus K., Jording D., Arnold W., Pühler A. (1995) Molecular analysis of the *Rhizobium meliloti mucR* gene regulating the biosynthesis of the exopolysaccharides succinoglycan and galactoglucan. *Mol. Plant Microbe Interact.* 8, 267–277.
156. **Kelly T.M.**, Stachula S.A., Raetz C.R.H., Anderson M.S. (1993) The *firA* gene of *Escherichia coli* encodes UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-glucosamine N-acyltransferase. The third step of endotoxin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, 268, 19866–19874.
157. **Kennedy E.** (1996) Membrane derived oligosaccharides (periplasmic β -D glucans) of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed, Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology 1064–1074.
158. **Kereszt A.**, Kiss E., Reuhs B., Carlson R., Kondorosi A., Putnoky P. (1998) Novel *rkp* gene clusters of *Sinorhizobium meliloti* involved in capsular polysaccharide production and invasion of the symbiotic nodule: the *rkpK* gene encodes a UDP-glucose dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 180, 5426-31.
159. **Kiss E.**, Reuhs B., Kim J., Kereszt A., Petrovics G., Putnoky P., Dusha I., Carlson R., Kondorosi A. (1997) The *rkpGHI* and *J* genes are involved in capsular polysaccharide production by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 179, 2132-40.
160. **Klama J.** (2004) *Herbaspirillum seropedicale* - efektywny diazotrof klimatu umiarkowanego? *Kosmos* 53, 2, 225-229.

161. **Kneidinger B.**, Marolda C., Graninger M., Zamyatina A., McArthur F., Kosma P., Valvano M.A., Messner P. (2002) Biosynthesis pathway of ADP-L-glycero- β -D-mannoheptose in *E. coli*. J. Bacteriol., 184, 363–369.
162. **Knirel Y.A.**, Moran A.P., Holst O., Brennan P.J., von Itzstein M. (2009) O-Specific polysaccharides of Gram-negative bacteria. Microbial glycobiology. Structures, relevance and applications. Elsevier, Amsterdam, 57-73.
163. **Kocharova N.A.**, Mieszala M., Zatonsky G.V., Staniszevska M., Shashkov A.S., Gamian A., Knirel Y.A. (2004) Structure of the O-specific polysaccharide of *Citrobacter* O1 containing an α -D-ribofuranosyl group. Carbohydr Res 339, 321–325.
164. **Komaniecka I.**, Choma A. (2003) Isolation and characterization of periplasmic cyclic β -glucans of *Azorhizobium caulinodans*. FEMS Microbiol. Lett. 227, 263-269.
165. **Komaniecka I.**, Choma A (2001) Składniki lipidowe *Rhizobiaceae* Post. Mikrobiol., 40, 1, 7-30
166. **Komaniecka I.**, Choma A. (2008) Peryplazmatyczne β -glukany bakterii Gram-ujemnych. Post. Mikrobiol. 47(1), 35-42.
167. **Komaniecka I.**, Zdzisińska B., Kandefer-Szerszeń M., Choma A. (2010) Low endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, and *Azospirillum* strains Microbiol Immunol, 54, 717–725.
168. **Kosslak R.M.**, Bookland R., Barkei J., Paaren H.E., Applebaum E.R. (1987) Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 84, 7428–7432.
169. **Krauss J.H.**, Seydel U., Weckesser J., Mayer H. (1989) Structural analysis of the nontoxic lipid A of *Rhodobacter capsulatus* 37b4. Eur. J. Biochem., 180, 519-526.
170. **Krehenbrink M.**, Downie J.A. (2008) Identification of protein secretion systems and novel secreted proteins in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. BMC Genom. 9, 55.
171. **Krol E.**, Becker A. (2004) Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. Mol. Gen. Genomics. 272, 1–17.
172. **Król J.E.**, Mazur A., Marczak M., Skorupska A. (2005) Mapping of the *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 genome. In: Kuusiene S, editor. Abstract book of The First Baltic Region Symposium and postgraduate course: Agro-biotechnology focused on root-microbe systems: 20–27; pp. 33–34.
173. **Król J.E.**, Mazur A., Marczak M., Skorupska A. (2007) Syntenic arrangements of the surface polysaccharide biosynthesis genes in *Rhizobium leguminosarum*. Genomics, 89, 237–247.
174. **Kubler-Kielb J.**, Vinogradov E. (2013) Reinvestigation of the structure of *Brucella* O-antigens. Carbohydr. Res. 378,144–147.
175. **Kulshin V.A.**, Zähringer U., Lindner B., Jäger K.E., Dmitriev B.A., Rietschel E.T. (1991) Structural characterization of the lipid A component of *Pseudomonas aeruginosa* wild-type and rough mutant lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem., 198, 697-704.
176. **Kumada H.**, Haishima Y., Umemoto T., Tanamoto K. (1995) Structural study on the free lipid A isolated from lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol., 177, 2098-2106.
177. **Lacroix J.**, Lanfroy E., Cogez V., Lequette Y., Bohin A., Bohin J.P. (1999) The *mdoC* gene of *Escherichia coli* encodes a membrane protein that is required for succinylation of osmoregulated periplasmic glucans. J. Bacteriol. 181, 3626-3631.

178. **Lacroix J.**, Loubens I., Tempête M., Menichi B., Bohin J.P. (1991) The *mdoA* locus of *Escherichia coli* consists of an operon under osmotic control. *Mol. Microbiol.* 5, 1745-1753.
179. **Lanfroy E.**, Bohin J.P. (1993) Physical map location of the *Escherichia coli* gene encoding phosphoglycerol transferase I. *J. Bacteriol.* 175, 5736-5737.
180. **Latchford J.W.**, Borthakur D., Johnston AWB. (1991) The products of *Rhizobium genes*, *psi* and *pss*, which affect exopolysaccharide production, are associated with the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* 5, 2107-2114.
181. **Greenfield L.K.**, Whitfield C. (2012) Synthesis of lipopolysaccharide O-antigens by ABC transporter-dependent pathways; *Carbohydrate Research* p. 594-602.
182. **Le Strange K.K.**, Bender G.L., Djordjevic M.A., Rolfe B.G., Redmond J.W. (1990) The *Rhizobium* strain NGR234 *nodD1* gene product responds to activation by the simple phenolic compounds vanillin and isovanillin present in wheat seedling extracts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3, 214-220.
183. **Lee A.**, Hirsch A. M. (2006) Signals and Responses. Choreographing the Complex Interaction between Legumes and α - and β -Rhizobia. *Landes Bioscience*, 1(4), 161-168.
184. **Lee S.**, Cho E., Jung S. (2009) Periplasmic glucans isolated from Proteobacteria. *BMB Reports* 42(12), 769-775.
185. **Legatzki A.**, Franke S., Lucke S., Hoffmann T., Anton A., Naumann D., Nies D. (2003) First step towards a quantitative model describing Czc-mediated heavy metals resistance in *Ralstonia matallidurans*. *Biodegradation*, 14, 153-168.
186. **Leigh J.A.**, Walker G. C. (1994) Exopolysaccharides of *Rhizobium*: synthesis, regulation and symbiotic function. *Trends Genet.* 10, 63.
187. **Lequette Y.**, Odberg-Ferragut C., Bohin J.P. Lacroix J. (2004) Identification of *mdoD*, an *mdoG* paralog which encodes a twin-arginine-dependent periplasmic protein that controls osmoregulated periplasmic glucan backbone structures. *J. Bacteriol.* 186, 3695-3702.
188. **Lequette Y.**, Rollet E., Delangle A., Greenberg, E., Bohin J.P. (2007) Linear osmoregulated periplasmic glucans are encoded by the *opgGH* locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153, 3255-3263.
189. **Lerouge I.**, Laeremans T., Verreth C., Vanderleyden J., van Soom C., Tobin A., Carlson R.W. (2001) Identification of an ATP-binding cassette transporter for export of the O-antigen across the inner membrane in *Rhizobium etli* based on the genetic, functional and structural analysis of an *lps* mutant deficient in O-antigen. *J. Biol. Chem.* 276, 17190-17198.
190. **Lerouge I.**, Vanderleyden, J. (2001). O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 17-47.
191. **Lerouge P.**, Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.C., Denarie J., (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784.
192. **Lippens G.**, Wieruszeski J., Horvath D., Talaga P., Bohin J.P. (1998) Slow dynamics of the cyclic osmoregulated periplasmic glucan of *Ralstonia solanacearum* as revealed by heteronuclear relaxation studies. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 170-177.
193. **Liu D.**, Cole R.A., Reeves P.R., (1996) An O-antigen processing function for Wzx (RfbX): a promising candidate for O-unit fiippase. *J. Bacteriol.* 178, 2102.
194. **Lodowska J.**, Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z. (2007) Heterogenność strukturalna lipidu A bakterii Gram-ujemnych, *Postepy Hig Med Dosw.*, 61, 106-121.

195. **Lodowska J.**, Zięba A., Wolny D., Węglarz L., Dzierżewicz Z. (2006) Metody derywatywacji komponentów lipopolisacharydów w ocenie ich struktury chemicznej technikami chromatograficznymi Postępy Hig Med Dosw. 60: 113-128.
196. **Maassen A.**, Hennig J. (2001) Udział tlenu azotu w odpowiedzi roślin na infekcje Postępy biochemii 47(2), 192-199.
197. **Małek W.**, Sajnaga E. (1999) Current taxonomy of the rhizobia. Acta Microbiol. Pol., 48, 109-122.
198. **Martyniuk S.** (2009). The importance of biological fixation of atmospheric nitrogen in ecological agriculture. Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, Vol. 53; 9-14.
199. **Masoud H.**, Perry M., Richards J. (1994) Characterization of the lipopolysaccharide of *Moraxella catarrhalis*. Structural analysis of the lipid A from *M. catarrhalis* serotype A lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem., 220, 209-216.
200. **Masson-Boivin C.**, Giraud E., Perret X., Batut J. (2009) Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends Microbiol. 17(10), 458-66.
201. **Mathema V. B.**, Thakuri B., Sillanpaa M. (2011) Bacterial *mer* operon mediated detoxication of mercurial compounds: a short review. Arch. Microbiol. 193, 834-844.
202. **Mathis R.**, Van Gijsegem F., De Rycke R., D’Haeze W., Van Maelsaeke E., Anthonio E., Van Montagu M., Holsters M., Vereecke D. (2005) Lipopolysaccharides as a communication signal for progression of legume endosymbiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 2655-2660.
203. **Mayer H.**, Salimath P.V., Holst O., Weckesser J. (1984) Unusual lipid A types in phototrophic bacteria and related species. Rev. Infect. Dis., 6, 542-545.
204. **McIntire, F.**, Peterson W., Riker A. (1942) A polysaccharide produced by the crown-gall organism. J. Biol. Chem. 143, 491-496.
205. **McNeil M.**, Darvill J. Darvill A., Albersheim P., van Veen R., Hooykaas P., Schilperoort R., Dell A., (1986) The discernible structural features of the acidic exopolysaccharides secreted by different *Rhizobium* species are the same. Carbohydr. Res., 146, 307–326.
206. **Mendrygal K.E.**, González J.E. (2000) Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 182, 599–606.
207. **Meredith T.C.**, Aggarwal P., Mamat U., Lindner B., Woodard R.W. (2006) Redefining the requisite lipopolysaccharide structure in *Escherichia coli*. ACS Chem. Biol., 1, 33-42.
208. **Mergaert P.**, Uchiumi T. (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium* – legume symbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103, 5230–5235.
209. **Mergeay M.** (1991) Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. Trends Biotechnol. 9, 17-24.
210. **Miller K.**, Gore R., Benesi A. (1988) Phosphoglycerol substituents present on the cyclic α -1,2-glucans of *Rhizobium meliloti* 1021 are derived from phosphatidylglycerol. J. Bacteriol. 170, 4569-4575.
211. **Mimmack M.L.**, Borthakur D., Jones M.A., Downie J.A., Johnston A.W.B.. (1994) The *psi* operon of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*: identification of two genes whose products are located at the bacterial cell surface. Microbiol. 140, 1223–1229.
212. **Mimmack M.L.**, Hong GF., Johnston AWB. (1994) Sequence and regulation of *psrA*, a gene on the Sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* which inhibits transcription of the *psi* genes. Microbiol. 140, 455–461.

213. **Minamisawa K. (1989)** Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production, and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum* Plant Cell Physiol. 30, 877-884.
214. **Molinaro A., Newman M.A., Lanzetta R., Parrilli M. (2009)** The structures of lipopolysaccharides from plant-associated gram-negative bacteria. Eur. J. Org. Chem., 34, 5887-5896.
215. **Moran A.P., Zähringer U., Seydel U., Scholz D., Stutz P., Rietschel E.T. (1991)** Structural analysis of the lipid A component of *Campylobacter jejuni* CCUC 10936 (serotype O:2) lipopolysaccharide. Description of a lipid A containing a hybrid backbone of 2-amino-2-deoxy-D-glucose and 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose. Eur. J. Biochem., 198, 459-469.
216. **Morón B., Soria-Diaz M.E., Ault J., Verroios G., Sadaf N., Rodriguez-Navarro D.N., Gil-Serrano A., Thomas-Oates J., (2005)** Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. Chem. Biol. 12, 1029–1040.
217. **Morris J., González J.E. (2009)** The novel genes *emmABC* are associated with exopolysaccharide production, motility, stress adaptation, and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol., 191, 5890–5900.
218. **Moulin L., Munive A., Dreyfus B., Boivin-Masson C. (2001)** Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. Nature 411, 948–950.
219. **Mukhopadhyay P., Williams J., Mills D. (1988)** Molecular analysis of a pathogenicity locus in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. J. Bacteriol. 170, 5479-5488.
220. **Müller-Loennies S., Lindner B., Brade H (2002)** Structural analysis of deacylated lipopolysaccharide of *Escherichia coli* strains 2513 (R4 core-type) and F653 (R3 core-type). Eur J Biochem 269, 5982–5991.
221. **Nies D. (2003)** Efflux-mediated heavy metal resistance in procaryotes. Fems Microbiol. Rev., 27, 313-339.
222. **Noel K.D., Van den Bosch K.A., Kulpaca B. (1986)** Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. J. Bacteriol. 168, 1392-1401.
223. **O'Neill M.A., Darvill A.G., Albersheim P. (1991)** The degree of esterification and points of substitution by O-acetyl and O-(3-hydroxybutanoyl) groups in the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *trifolii*, and *phaseoli* are not related to host range. J. Biol. Chem., 266, 9549–9555.
224. **Ogawa T. (1993)** Chemical structure of lipid A *Porphyromonas* (Bacteroides) *gingivalis* lipopolysaccharide. FEBS Lett., 332, 197-201.
225. **Oleńska E., Małek W. (2013)** Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie. Post. Mikrobiol., 52, 4, 363-371.
226. **Ormeño-Orrillo E. (2005)** Lipopolysaccharides of *Rhizobiaceae*: structure and biosynthesis Rev Latinoam Microbiol 47 (3-4), 165-175.
227. **Ozdemir G., Ozturk T., Ceyhan N., Isler R., Cosar T. (2003)** Heavy metal biosorption by biomass of *Ochrobactrum anthropi* producing exopolysaccharide in activated sludge. Bioresour Technol. 90(1):71-4.
228. **Pac M., Komaniecka I., Zamlynska K., Turska-Szewczuk A., Choma A. (2015)** Structure of the O-specific polysaccharide from the legume endosymbiotic bacterium *Ochrobactrum cytisi* strain ESC1(T). Carbohydr Res. 2;413:37-40.
229. **Page F., Altabe S., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Lacroix J., Robert-Baudouy J., Bohin J.P. (2001)** Osmoregulated periplasmic glucans synthesis is required for *Erwinia chrysanthemi* pathogenicity. J. Bacteriol. 183, 3134-3141.

230. **Palacios R.**, Newton W.E. (2005) Genomes and Genomics of Nitrogen-Fixing Organisms. Springer, Dordrecht, Netherlands.
231. **Pao S.**, Paulsen I., Saier M. (1998) Major facilitator superfamily. Microbiol. 48, 49-64.
232. **Paradkar R.P.**, Williams R.R. (1994); Micellar colorimetric determination of dithizone metal-chelates. Anal. Chem. 66, 2752-2756.
233. **Paul E.**, Clark F. (2000) Mikrobiologia i biochemia gleb Wyd. UMCS.
234. **Peck M.C.**, Fisher R.F., Long S.R. (2006) Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 188, 5417–5427.
235. **Philip-Hollingsworth S.**, Hollingsworth R.I., Dazzo F.B. (1989) Host-range related structural features of the acidic extracellular polysaccharides of *Rhizobium trifolii* and *Rhizobium leguminosarum*. J. Biol. Chem., 264, 1461–1466.
236. **Phillips D.A.**, Joseph C.M., Maxwell C.A. (1992) Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. 99, 1526–1531.
237. **Plötz B.M.**, Lindner B., Stetter K.O., Holst O. (2000) Characterization of a novel lipid A containing D-galacturonic acid that replaces phosphate residues. The structure of the lipid A of the lipopolysaccharide from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex pyrophilus*. J. Biol. Chem., 275: 11222-11228.
238. **Poddebniak M.**, Jafra S., (2009) Biodegradacyjna i bioadsorpcyjna aktywność bakterii z rodzaju *Ochrobactrum* i możliwości jej wykorzystania w bioremediacji środowiska naturalnego. Biotechnologia 4(87): 152-167.
239. **Price N.P.J.**, Jeyaretnam B., Carlson R. W., Kadrmas J.L. Raetz C.R.H., Brozek K.A. (1995) Lipid A biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum*: role of a 2-keto-3-deoxyoctulosonate-activated 4' phosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 7352-7356.
240. **Qian J.**, Garrett T., Raetz C. (2014) In Vitro Assembly of the Outer Core of the Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium*. Biochemistry. 4; 53(8): 1250–1262.
241. **Que N.L. S.**, Lin S.H., Cotte R.J. r, Raetz C.R.H. (2000) Purification and mass spectrometry of six lipid A species from the bacterial endosymbiont *Rhizobium etli*: Demonstration of a conserved distal unit and a variable proximal portion. J. Biol. Chem. 275, 28006-28016.
242. **Que-Gewirth N.L.S.**, Karbarz M.J. Kalb S.R. Cotter R. J. Raetz C.R.H. (2003) Origin of the 2-amino-2deoxy-gluconate unit in *Rhizobium leguminosarum* lipid A. Expression cloning of the outer membrane oxidase LpxQ. J. Biol. Chem. 278, 12120-12129.
243. **Que-Gewirth N.L.S.**, Ribeiro A.A., Kalb S.R., Cotter R.J., Bulach D.M., Adler B., Girons I.S., Werts C., Raetz C.R. (2004) A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. J. Biol. Chem., 279, 25420-25429.
244. **Quelas J.I.**, López-García S.L., Casabuono A., Althabegoiti M.J., Mongiardini E.J., Pérez-Giménez J., Couto A., Lodeiro A.R. (2006) Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. Arch. Microbiol. 186, 119–128.
245. **Quester I.**, Becker A. (2004) Four promoters subject to regulation by ExoR and PhoB direct transcription of the *Sinorhizobium meliloti* *exoYFQ* operon involved in the biosynthesis of succinoglycan. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 7, 115–132.
246. **Qureshi N.**, Takayama K., Meyer K.C., Kirkland T.N., Bush C.A., Chen L., Wang R., Cotter R.J. (1991) Chemical reduction of 3-oxo and unsaturated groups in fatty acid of diphosphoryl lipid A from the lipopolysaccharide of *Rhodopseudomonas sphaeroides*.

- Comparison of biological properties before and after reduction. *J. Biol. Chem.*, 266, 6532-6538.
247. **Raetz C.R.H.**, Guan Z., Ingram B., Six D., Song F., Wang X., Zhao J. (2009) Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. *J Lipid Res.* 50, 103–108.
 248. **Raetz C.R.H.**, Whitfield C. (1990) Biochemistry of endotoxin. *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 129–170.
 249. **Raetz C.R.H.**, Whitfield C. (2002); Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.*, 71, 635–700.
 250. **Ray B.L.**, Painter G., Raetz C.R.H. (1984) The biosynthesis of Gram-negative endotoxin. Formation of lipid A disaccharide from monosaccharide precursors in extracts of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 259, 4852–4859.
 251. **Ray B.L.**, Raetz C.R.H. (1987) The biosynthesis of Gram-negative endotoxin. A novel kinase in *Escherichia coli* membranes that incorporates the 4'-phosphate of lipid A. *J. Biol. Chem.*, 262, 1122–1128.
 252. **Reed J.W.**, Glazebrook J., Walker G.C. (1991) The *exoR* gene of *Rhizobium meliloti* affect RNA levels of other *exo* genes but lacks homology to known transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 173, 3789–3794.
 253. **Reeve W.G.**, Dilworth M.J., Tiwari R.P., Glenn A.R. (1997) Regulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710 involves *exoR*. *Microbiology.* 143, 1951–1958.
 254. **Reinhold B.**, Chan S., Reuber T., Marra A., Walker G., Reinhold V. (1994) Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm 1021. *J. Bacteriol.* 176, 1997-2002.
 255. **Reitz M.**, Rudolph K., Schröder I., Hoffman-Hergarten S., Hallmann J., Sikora R. A. (2000) Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3515-3518.
 256. **Reuber T.L.**, Walker G.C. (1993) Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti*. *Cell*, 74, 269–280.
 257. **Reuhs B.L.**, Geller D.P., Kim J.S., Fox J.E., Kolli V.S. Pueppke S.G. (1998) *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4930-4938.
 258. **Reuhs B.L.**, Kim J.S., Badgett A., Carlson R.W. (1994) Production of cell associated polysaccharides of *Rhizobium fredii* USDA205 is modulated by apigenin and host root extract. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 7, 240-247.
 259. **Rhijn P.** Vanderleyden J. (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiology Reviews* 59, 124-142.
 260. **Robertson B. K.**, Aman P., Darvill A.G., McNeil M., Albersheim P. (1981) Host-symbiont interactions. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.*, 67, 389–400.
 261. **Rolin D.**, Pfeffer P., Osman S., Szwergold B., Kappler F., Benesi A. (1992) Structural studies of a phosphocholine substituted β -(1, 3);(1, 6) macrocyclic glucan from *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Biochim. Biophys. Acta. (BBA) Gen. Subj.* 1116(3), 215–225.
 262. **Roset M.**, Ciocchini A., Ugalde R., de Iannino N. (2006) The *Brucella abortus* cyclic β -(1,2)-glucan virulence factor is substituted with O-ester-linked succinyl residues. *J. Bacteriol.* 188, 5003-5013.

263. **Różalski A. (1995a)** Lipopolisacharyd [LPS] bakterii gram-ujemnych - struktura chemiczna, aktywność biologiczna i znaczenie w chorobotwórczości. I. Struktura chemiczna i właściwości fizyko-chemiczne lipopolisacharydów. *Post. Mikrobiol.*, 34(3) 289-315.
264. **Różalski A. (1995b)** Lipopolisacharyd [LPS] bakterii gram-ujemnych - struktura chemiczna, aktywność biologiczna i znaczenie w chorobotwórczości. II. Budowa chemiczna a funkcja biologiczna LPS. *Post. Mikrobiol.*, 34(3) 317-337.
265. **Rüberg S., Pühler A., Becker A. (1999)** Biosynthesis of the exopolysaccharide galactoglucan in *Sinorhizobium meliloti* is subject to a complex control by the phosphate-dependent regulator PhoB and the proteins ExpG and MucR. *Microbiology*. 145, 603–611.
266. **Ruengsitagoon W., Chisvert A., Liawruangrath S. (2010)**; *Talanta* 81, 709-713.
267. **Russa R., Bruneteau M., Shashkov A.S., Urbanik-Sypniewska T., Mayer H. (1996a)** Characterization of the lipopolysaccharides from *Rhizobium meliloti* strain 102F51 and its non-nodulating mutant WL113. *Arch. Microbiol.* 165, 26-33.
268. **Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Choma A., Mayer H. (1991)** Identification of 3-deoxy-lyxo-2-heptulosaric acid in the core region of lipopolysaccharides from *Rhizobiaceae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 84, 337-344.
269. **Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Lindström K., Mayer H. (1995a)** Chemical characterization of two lipopolysaccharide species isolated from *Rhizobium loti* NZP2213. *Arch. Microbiol.* 163, 345-351.
270. **Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Shashkov A. S.; Kochanowski H., Mayer H. (1995)** The structure of the homopolymeric O-specific chain from the phenol soluble LPS of the *Rhizobium loti* type strain NZP2213 *Carbohydr. Polym.* 1995, 27, 299–303.
271. **Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Shashkov A., Kochanowski H., Mayer H. (1995b)** The structure of the homopolymeric O-specific chain from the phenol-soluble LPS of the *Rhizobium loti* NPZ2213 *Carbohydr. Polym.*, 27, 299–303.
272. **Russa R., Urbanik-Sypniewska T., Shashkov A.S., Banaszek A., Zamojski A., Mayer H. (1996b)** Partial structure of lipopolysaccharides isolated from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* 24 and its GalA-negative Exo⁻ mutant AR20. *System. Appl. Microbiol.* 19, 1-8.
273. **Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Gouzy J., Mangenot S., Arlat M., Billault A., Brottier P., Camus J., Cattolico L., Chandler M., Choisne N., Claudel-Renard C., Cunnac S., Demange N., Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robert C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., Thebault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J., Boucher, C. (2002)** Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* 415, 497-502.
274. **Sanchez-Andujar B., Coronado C., Philip-Hollingsworth S., Dazzo FB., Palomares AJ. (1997)** Structure and role in symbiosis of the *exoB* gene of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. *Mol. Gen. Genet.*, 255, 131–140.
275. **Sanjuan J., Groß P., Göttfert M., Hennnecke H., Stacey G. (1994)** NodW is essential for the full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7, 364–369.
276. **Schlaman H. R. M., Olsthoorn M.M., Harteveld M., Dörner L., Djordjevic M.A., Thomas-Oates, J.E., Spaink H.P. (2006)** The production of species-specific highly unsaturated fatty acyl-containing LCOs from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is stringently regulated by *nodD* and involves the *nodRL* genes. *Mol. Plant-microbe Interact.* 19 (3), 215–226.

277. **Schneider J.**, Reinhold V., Rumley M., Kennedy E. (1979) Structural studies of the membrane - derived oligosaccharides of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 254(20), 10135-8.
278. **Schultze M.**, Kondorosi A. (1998) Regulation of symbiotic root nodule development Annu. Rev. Genet. 32, 33-57.
279. **Schwudke D.**, Linscheid M., Strauch E., Appel B., Zähringer U., Moll H., Müller M., Brecker L., Gronow S., Lindner B. (2003) The obligate predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* possesses a neutral lipid A containing α -D-mannoses that replace phosphate residues: similarities and differences between the lipid As and the lipopolysaccharides of the wild type strain *B. bacteriovorus* HD100 and its host-independent derivative HI100. J. Biol. Chem., 278, 27502-27512.
280. **Serrato R.** (2014) Lipopolysaccharides in diazotrophic bacteria. Front. Cell. Infect. Microbiol., 03.
281. **Shi X.Z.**, Guo R.J., Takagi K., Miao Z.Q., Li S.D. (2011) Chlorothalonil degradation by *Ochrobactrum lupini* strain TP-D1 and identification of its metabolites. World J Microbiol Biotechnol.; 27(8):1755–1764.
282. **Sidorczyk Z.**, Zähringer U., Rietschel E.T. (1983) Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* Re-mutant. Eur. J. Biochem., 137: 15-22.
283. **Silver S.**, Phung L. (1996) Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Annu. Rev. Microbiol. 50, 753-789.
284. **Skorupska A.**, Janczarek M., Marczak M., Mazur A., Król J. (2006) Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. Microb. Cell Fact., 5- 7.
285. **Skorupska A.**, Król J., Mazur A., Marczak M. (2008) Genomika *Rhizobium leguminosarum* – badanie genów syntezy polisacharydów powierzchniowych. Biotechnologia, 2(81), 27-40.
286. **Słomka A.**, Sutkowska A., Szczepaniak M., Malec P., Mitka J. and Kuta E. (2011) Increased genetic diversity of *Viola tricolor* L. (Violaceae) in metal-polluted environments. Chemosphere 83, 435-442.
287. **Smit G.**, Swart S, Lugtenberg BJJ, Kijne JW. (1992) Molecular mechanisms of attachment of rhizobium bacteria to plant roots. Mol Microbiol. 6, 2897–2903.
288. **Sochocka M.**, Boratyński J. (2011) Osmoregulacja - ważny parametr rozwoju bakterii. Post. Hig. Med. Dośw. 65, 714-724.
289. **Sorensen P.G.**, Lutkenhaust J., Yoing K., Eveland S.S., Anderson M.S., Raetz C.R.H. (1996) Regulation of UDP-3-O-[R-3-hydroksymirystoyl]-N-acetylglucosamine deacetylase in *Escherichia coli*. The second enzymatic step of lipid A biosynthesis. J. Biol. Chem., 271, 25898–25905.
290. **Spaink H.P.** (2000) Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 54, 257–288.
291. **Streeter J.**, Salminen S. (1993) Distribution of the two types of polysaccharide formed by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in nodules on field-grown soybean plants (*Glycine max* (L.) Merr.) Soil Biology and Biochemistry 25, 8, 1027–1032.
292. **Sugawara M.**, Tsukui T, Kaneko T, Ohtsubo Y, Sato S, Nagata Y, Tsuda M, Mitsui H, Minamisawa K. (2017) Complete Genome Sequence of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 122, a Nitrogen-Fixing Soybean Symbiont. Genome Announc. 2;5(9).
293. **Sullivan J.T.**, Trzebiatowski J.R., Cruickshank R.W., Gouzy J., Brown S.D., Elliot R. M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., Weaver, J.E., Webby

- R.J., de Bruijn F.J., Ronson C.W. (2002) Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. J. Bacteriol. 184, 3086–3095.
294. **Sultan S.**, Hasnain S. (2007) Reduction of toxic hexavalent chromium by *Ochrobactrum intermedium* strain SDCr-5 stimulated by heavy metals. Bioresource Technology 98, 340–344.
 295. **Summers M.L.**, Elkins J.G., Elliot B.A., McDermott T.R. (1999) Expression and regulation of phosphate stress inducible genes in *Sinorhizobium meliloti*. Mol. Plant Microbe Interact. 11, 1094–1101.
 296. **Suominen L.**, Luukkainen R., Roos C., Lindström K. (2003) Activation of the *nodA* promoter by the *nodD* genes of *Rhizobium galegae* induced by synthetic flavonoids or *Galega orientalis* root exudate. FEMS Microbiol. Lett. 219, 225–232.
 297. **Sutherland I.** (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 147, 3–9.
 298. **Szember A.** (2001) Zarys Mikrobiologii Rolniczej. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, 117–144.
 299. **Tai H.**, McHenry L., Fritz P.J., Furtek D.B. (1991) Nucleic acid sequence of a 21 kDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family of protease inhibitors. Plant Molecular Biology 16, 913–915.
 300. **Talaga P.**, Cogez V., Wieruszeski J., Stahl B., Lemoine J., Lippens G., Bohin J.P. (2002) Osmoregulated periplasmic glucans of the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. Eur. J. Biochem. 269, 2464–2472.
 301. **Talaga P.**, Stahl B., Wieruszeski J. M., Hillenkamp F., Tsuyumu S., Lippens G. and Bohin J.P. (1996) Cell-associated glucans of *Burkholderia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *citri*: a new family of periplasmic glucans. J. Bacteriol. 178, 2263–2271.
 302. **Tanamoto K.**, Azumi S., Haishima Y., Kumada H., Umemoto T. (1997) Endotoxic properties of free lipid A from *Porphyromonas gingivalis*. Microbiology, 143, 63–71.
 303. **Tang W.**, Guo Z., Cao Z., Wang M., Li P., Meng X., Zhao X., Xie Z., Wang W., Zhou A., Lou C., Chen Y. (2018) d-Sedoheptulose-7-phosphate is a common precursor for the heptoses of septacidin and hygromycin B. Proc Natl Acad Sci USA. 115(11), 2818–2823.
 304. **Taylor P.L.**, Blakely K.M., de Leon G.P., Walker J.R., McArthur F., Evdokimova E., Zhang K., Valvano M.A., Wright G.D., Junop M.S. (2008) Structure and function of sedoheptulose-7-phosphate isomerase, a critical enzyme for lipopolysaccharide biosynthesis and a target for antibiotic adjuvants. J Biol Chem. 283(5), 2835–2845.
 305. **Tharanathan R.N.**, Weckesser J., Mayer H. (1978) Structural studies on the D-arabinose-containing lipid A from *Rhodospirillum tenue* 2761. Eur. J. Biochem., 84: 385–394.
 306. **Trent M.S.** (2004) Biosynthesis, transport, and modification of lipid A Biochem. Cell Biol., 82: 71–86.
 307. **Trent M.S.**, Stead C.M., Tran A.X., Hankins J.V. (2006) Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis, J. Endotoxin. Res. 12 205.
 308. **Trujillo M.**, Willems A., Abril A., Planchuelo A., Rivas R., Ludeña D., Mateos P., Martínez-Molina E. (2005) Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. AEM 71, 1318–1327
 309. **Tsai C.M.**, Frasch C.E. (1982) A sensitive silver strain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Microbiol. 119, 115–119.
 310. **Turska-Szewczuk A.**, Russa R. (2004) Charakterystyka lipopolisacharydów *Rhizobium* i ich znaczenie w procesie symbiozy; Post. Mikrobiol. 43, 4, 433–458.

311. **Urbanik-Sypniewska T.**, Seydel U., Greck M., Weckesser J., Mayer H. (1989) Chemical studies on the lipopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* 10406 and its lipid A region. Arch. Microbiol. 152, 527-532.
312. **Usui T.**, Yamaoka N., Matsuda K., Tuzimura K., Sugiyama H., Seto S. (1973) ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of glucobioses, glucotrioses, and glucans. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 2425-2432.
313. **Valls M.**, de Lorenzo V. (2002) Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. FEMS Microbiol. Rev. 26, 327-338.
314. **Van Golde L.**, Schulman H., Kennedy E. (1973) Metabolism of membrane phospholipids and its relation to a novel class of oligosaccharides in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1368-1372.
315. **van Rhijn P.**, Fujishige NA., Lim PO., Hirsch AM. (2001) Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. Plant Physiol., 126, 133-144.
316. **van Workum W. A. T.**, van Slageron S, van Brussel AAN, Kijne JW. (1998) Role of exopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. Mol. Plant. Microbe. Interact. 11, 1233-1241.
317. **Velasco J.**, Bengoechea J. A., Brandenburg K., Lindner B., Seydel U., González D., Zähringer U., Moreno E., Moriyón I. (2000) *Brucella abortus* and its closest phylogenetic relative, *Ochrobactrum* spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance. Infect Immun. 68(6), 3210-8.
318. **Velasco J.**, Moll H., Knirel Y.A., Sinnwell V., Moriyón I., Zähringer U. (1998) Structural studies on the lipopolysaccharide from a rough strain of *Ochrobactrum anthropi* containing a 2,3-diamino-2,3-dideoxy-D-glucose disaccharide lipid A backbone. Carbohydr Res. 306(1-2), 283-90.
319. **Vincent M.** (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International biological programme, handbook no. 15. Blackwell Oxford Edinburgh.
320. **Vinogradov E.**, Perry M.B., Conlan J.W. (2002) Structural analysis of *Francisella tularensis* lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem., 269, 6112-6118.
321. **Vinogradov E.V.**, Holst O., Thomas-Oates J.E., Broady K.W., Brade H. (1992) The structure of the O-antigenic polysaccharide from lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* strain H11 (non-O1). Eur. J. Biochem. 210(2), 491-498.
322. **Volk W.A.** (1960) Purification and properties of phosphoarabinoisomerase from *Propionibacterium pentosaceum*. J. Biol. Chem., 235, 1550-1553.
323. **Walker S.**, Viprey V., Downie J. (2000) Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by Nod factors and chitin oligomers. The Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 13413-8.
324. **Wang P.**, Ingram-Smith C., Hadley J., Miller K. (1999) Cloning, sequencing and characterization of the *cgmB* gene of *Sinorhizobium meliloti* involved in cyclic β -glucan biosynthesis. J. Bacteriol. 181, 4576-4583.
325. **Wang X.**, Quinn P., Yan A. (2014) Kdo2-lipid A: structural diversity and impact on immunopharmacology. Biol. Rev. (wydanie internetowe).
326. **Wang Y.**, Hollingsworth R.,I. (1994) The structure of the O-antigenic chain of the lipopolysaccharide of *Rhizobium trifolii* 4S. Carbohydr. Res., 260, 305-317.
327. **Weckesser J.**, Mayer H. (1988) Different lipid A types in lipopolysaccharides of phototrophic and related non-phototrophic bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 54, 143-153.

328. **Weir B.S. (2012)** The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.
329. **Westphal O., Jann K. (1965)** Extraction with phenol–water and further application of the procedure. Bacterial lipopolysaccharide. (w): Methods in Carbohydrate Chemistry; Whistler R. L., Ed.; Academic Press, New York, 5, 83-91.
330. **Whittington D.A., Rusche K.M., Shin H., Fierke C.A., Christianson D.W. (2003)** Crystal structure of LpxC, a zinc-dependent deacetylase essential for endotoxin biosynthesis. PNAS. 100, 8146–8150.
331. **Wielbo J., Skorupska A. (2003)** Ewolucja układu symbiotycznego *Rhizobium*-rośliny motylkowate. Post. Mikrobiol., 42, 3, 263-283.
332. **Wielbo J., Skorupska A. (2003)** Strategie symbiotycznych rizobiów w pokonywaniu reakcji obronnych roślin motylkowatych Postępy Biologii Komórki 30 (3), 433-446.
333. **Willis L., Whitfield C. (2013)** Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. Carb. Res. 378, 35-44.
334. **York, W. (1995)** A conformational model for cyclic β -(1 $\rightarrow$ 2)-linked glucans based on NMR analysis of the β -glucans produced by *Xanthomonas campestris*. Carbohydr. Res. 278, 205-225.
335. **Young J.P.W., Crossman L. C., Johnston A. W. B., Thomson N. R., Ghazoui Z. F., Hull K. H., Wexler M., Curson A. R. J., Todd J. D., Poole P. S., Mauchline T. H., East A. K., Quail M. A., Churcher C., Arrowsmith C., Cherevach I., Chillingworth T., Clarke K., Cronin A., Davis P., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Mungall K., Norbertczak H., Rabinowitsch E., Sanders M., Simmonds M., Whitehead S., Parkhill J. (2006)** The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome Biology, 7:R34.
336. **Yuan Z., Zaheer R., Morton R., Finan T.M. (2006)** Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. Nucleic Acids Res. 34, 2686–2697.
337. **Yuen J.P.Y., Cassini S.T., de Oliveira T.T., Nagem T.J., Stacey G. (1995)** Xanthone induction of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. Symbiosis 19, 131–140.
338. **Zähringer U., Knirel Y.A., Lindner B., Helbig J.H., Sonesson A., Marre R., Rietschel E.T. (1995)** The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1 (strain Philadelphia1): chemical structure and biological significance. Prog. Clin. Biol. Res., 392, 113-139.
339. **Zähringer U., Lindner B., Knirel Y.A., van den Akker W.M., Hiestand R., Heine H., Dehio C. (2004)** Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882 T. J. Biol. Chem., 279: 21046-21054.
340. **Zamłyńska K., Komaniecka I., Żebracki K., Mazur A., Sroka-Bartnicka A., Choma A. (2017)** Studies on lipid A isolated from *Phyllobacterium trifolii* PETP02T lipopolysaccharide. Antonie Leeuwenhoek;110 (11):1413-1433.
341. **Zevenhuizen L.P.T.M. (1997)** Succinoglycan and galactoglucan. Carbohydr. Polym., 33,139-144.
342. **Zhan H., Leigh JA. (1990)** Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 172, 5254–5259.
343. **Zurdo-Pineiro J., Rivas R., Trujillo M., Vizcano N. (2007)** *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain; Int. J. Syst. Evol. Micr., 57, 784–788.

VIII WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

BNF	- biologiczne wiązanie azotu (ang. <i>Biological Nitrogen Fixation</i>)
COSY	- spektroskopia homokorelacyjna (ang. <i>Correlation Spectroscopy</i>)
CPS	- kapsularne polisacharydy
Da	- jednostka masy atomowej (Dalton)
dgPS	- degradowany polisacharyd
DMSO	- dimetylosulfotlenek
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
EPS	- egzopolisacharyd, kwaśny polisacharyd zewnątrzkomórkowy
Fuc	- fukoza
Gal	- galaktoza
GC-MS	- chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas
Glc	- glukoza
GlcA	- kwas glukuronowy
GlcN	- glukozamina
GlcN3N	- 2,3-diamino-2,3-dideoksy-D-glukoza
GlcNA	- kwas 2-deoksy-2-aminoglukonowy
GlcNAc	- N-acetyloglukozamina
Hex	- heksoza
HMBC	- heterojądrowa korelacja ($^1\text{H-X}$) dalekiego zasięgu - dwuwymiarowa (2D) technika pozwalająca na korelowanie sygnałów pochodzących od jąder różnych pierwiastków, oddalonych o wiele wiązań (najczęściej 3 lub 5) (ang. <i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i>)
HMQC	- heterojądrowa korelacja z detekcją przejść wielokwantowych (ang. <i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>)
HSQC	- technika pozwalająca na korelowanie sygnałów protonów z sygnałami jąder innego pierwiastka (heterojądra) na jednym widmie 2D, korelowane jądra są odległe o jedno wiązanie (ang. <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>)
Kdo	- kwas 3-deoksy-D-manno-2-oktulozonowy

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

KPS	- kapsularny polisacharyd
LPS	- lipopolisacharyd
LPS-R	- forma szorstka LPS (ang. <i>Rough LPS</i>)
LPS-S	- forma gładka LPS (ang. <i>Smooth LPS</i>)
LPS-SR	- forma półszorstka LPS (ang. <i>Semi-Rough LPS</i>)
m/z, (m/e)	- stosunek wartości masy do liczby ładunków (elektronu)
MALDI-TOF	- spektrometria mas czasu przelotu z jonizacją przez desorpcję laserową w asyście matrycy (ang. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation-Time Of Flight Mass Spectroscopy</i>)
Man	- mannoza
NMR	- magnetyczny rezonans jądrowy (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOESY	- homojądrowa technika wielowymiarowa (ang. <i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>)
O-Ac	- reszta acetylowa związana estrowo
O-PS	- polisacharyd O-swoisty, łańcuch O-swoisty, O-antygen (ang. <i>O-polysaccharide</i>)
PAGE	- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (ang. <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
Rha	- ramnoza
RNaza	- rybonukleaza
SDS	- sól sodowa siarczanu dodecyłu (ang. <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS
TEMED	- N,N,N',N' - tetrametyloetylenodiamina
TFA	- kwas trifluorooctowy
TMSi	- trimetylosilan
TOCSY	- korelacyjna spektroskopia zupełna (totalna) (ang. <i>Total Correlation Spectroscopy</i>)
Tris-HCl	- chlorowodorek trihydroksometyloaminometanu
δ	- przesunięcie chemiczne

IX SPIS RYCIN I TABEL

RYCINY		
Lp.	Tytuł	Strona
1.	Drzewo filogenetyczne obejmujące rodzaj <i>Ochrobactrum</i> .	15
2.	Schemat interakcji symbiotycznych pomiędzy roślinami motylkowatymi a <i>Rhizobium</i> .	16
3.	Schemat budowy ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych.	25
4.	Schemat budowy LPS typowego dla enterobakterii.	27
5.	Schemat budowy lipidu A <i>E. coli</i> .	29
6.	Schemat budowy lipidu A <i>Salmonella</i> sp.	30
7.	Struktura lipidu A <i>R. etli</i> CE3.	32
8.	Struktura lipidu A <i>Sinorhizobium meliloti</i> .	33
9.	Struktura lipidu A <i>Mesorhizobium huakuii</i> i <i>Bradyrhizobium elkanii</i> .	34
10.	Struktura regionu rdzeniowego <i>Escherichia coli</i> R4.	37
11.	Struktura regionu rdzeniowego <i>R. etli</i> CE3.	37
12.	Struktura regionu rdzeniowego <i>R. leguminosarum</i> .	38
13.	Struktura powtarzalnej podjednostki polisacharydu O-swoistego <i>Salmonella enterica</i> serovar Toucra O48.	40
14.	Szlak biosyntezy lipidu A u <i>E. coli</i> .	44
15.	Szlak biosyntezy ADP-L-glicero-D-manno-heptozy u <i>E. coli</i> .	46
16.	Enzymy uczestniczące w biosyntezie zewnętrznej części rdzenia lipopolisacharydu <i>E. coli</i> i <i>S. typhimurium</i> .	47
17.	Mechanizmy biosyntezy łańcucha O-swoistego.	48
18.	Struktura liniowych peryplazmatycznych glukanów <i>E. coli</i> .	54
19.	Struktura cyklicznych β -(1,2)-glukanów.	55
20.	Struktura cyklicznych β -(1,2)-glukanów z jednym wiązaniem typu α -(1,6) w pierścieniu.	56
21.	Struktura cyklicznego β -(1,3)-(1,6)-glukanu <i>B. japonicum</i> .	57
22.	Biosynteza OPG u <i>E. coli</i> .	58
23.	Wzajemny szlak biosyntezy CPS.	64
24.	Szlak biosyntezy CPS przy udziale transporterów ABC.	65

25.	Typy egzopolisacharydów u <i>Sinorhizobium</i> .	67
26.	Struktura wybranych podjednostek ryzobiowych egzopolisacharydów.	68
27.	Szlak biosyntezy bursztynyloglikanu <i>S. meliloti</i> .	70
28.	Szlak biosyntezy egzopolisacharydu <i>R. leguminosarum</i> .	72
29.	Mechanizmy oporności bakterii na toksyczne działanie jonów metali ciężkich.	80
30.	Rozdział elektroforetyczny (PAGE-SDS) preparatów LPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T .	101
31.	Rozdział elektroforetyczny (PAGE-SDS) preparatów LPS wyizolowanych z <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	102
32.	Chromatogram GC-MS mieszaniny octanów alditoli otrzymanych z LPS <i>O. cytisi</i> .	103
33.	Schemat fragmentacji 4- <i>O</i> -metylogalaktozaminy.	104
34.	Chromatogram analizy GC-MS cukrów w formie octanów alditoli i aminoalditoli izolowanych z LPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	105
35.	Chromatogram GC-MS mieszaniny estrów metylowanych kwasów tłuszczowych izolowanych z lipopolisacharydu <i>Ochrobactrum cytisi</i> ESC1 ^T .	106
36.	Chromatogram GC-MS mieszaniny estrów metylowych kwasów tłuszczowych izolowanych z lipopolisacharydu <i>O. lupini</i> LUP21 ^T (faza wodna).	108
37.	Profil elucji degradowanego polisacharydu <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T uzyskany na kolumnie Sephadex G50 fine przy zastosowaniu 1% kw. octowego jako eluentu.	110
38.	Profil elucji frakcji niskocząsteczkowej degradowanego polisacharydu <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T po rozdziale na kolumnie BioGel P2 fine.	111
39.	Chromatogram GC preparatu polisacharydowego LPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T frakcji A wysokocząsteczkowej poddanej analizie etylacyjnej i konwertowanej w peretylowane octany amino/alditoli (solwoliza w 95% kwasie mrówkowym przez 45 min).	112
40.	Widmo ¹ H-NMR OPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T z zaznaczonymi sygnałami protonów anomerycznych, -O-CH ₃ , -N-Ac, -C-CH ₃ i protonami	113

	związanymi bezpośrednio z atomami węgla tworzącymi pierścienie cukrowe.	
41.	Widmo HMQC preparatu OPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T .	114
42.	Fragment widma HMQC oraz widma HMBC preparatu polisacharydu otrzymanego z LPS <i>Ochrobactrum cytisi</i> ESC1 ^T .	115
43.	Proponowana struktura chemiczna powtarzającej się podjednostki łańcucha polisacharydowego antygeny <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T .	118
44.	Profil elucji degradowanego polisacharydu <i>O. lupini</i> LUP21 ^T po rozdziale na kolumnie Sephadex G50 fine przy zastosowaniu 1% kw. octowego jako eluentu.	119
45.	Chromatogram GC octanów alditoli uzyskanych z frakcji A (wysokocząsteczkowej) <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	120
46.	Chromatogram GC octanów alditoli uzyskanych z frakcji C (niskocząsteczkowej) <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	120
47.	Widmo mas octanu „alditolu” uzyskane ze związku o czasie retencji 16,75.	121
48.	Fragment (obszar anomerycznych przesunięć węglowych) widma HMBC preparatu frakcji C dgPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	123
49.	Fragment widma HSQC preparatu frakcji C dgPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	124
50.	Widmo 1D-NMR frakcji A dgPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	125
51.	Fragment widma deptHSQC frakcji A dgPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	126
52.	Profil elucji preparatu glukanowego <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T rozdzielanego na kolumnie wypełnionej Sephadexem G50f.	129
53.	Profil elucji preparatu glukanowego <i>O. lupini</i> LUP21 ^T rozdzielanego na kolumnie wypełnionej Sephadexem G50 fine.	129
54.	Chromatogram gazowy octanów alditoli otrzymanych z preparatu glukanu <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T .	130
55.	Preparat glukanowy z <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T - widmo mas i schemat fragmentacji związku o czasie retencji 13.56 min. (1,2,5-O-Ac ₃ -3,4,6-O-Me ₃ -glucitolu).	131
56.	Chromatogram TLC wywołany metodą zwęglania przy użyciu stężonego H ₂ SO ₄ .	132

57.	Widmo jonów dodatnich metylowanego preparatu glukanu <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T otrzymane techniką MALDI-TOF.	134
58.	Widmo jonów dodatnich preparatu metylowanego glukanu <i>O. lupini</i> LUP21 ^T otrzymane techniką MALDI-TOF.	134
59.	Widmo ¹ H-NMR glukanu <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T rozpuszczonego w DMSO-d ₆ .	136
60.	Widmo ¹ H-NMR glukanu <i>O. lupini</i> LUP21 ^T rozpuszczonego w D ₂ O.	137
61.	Widmo HSQC glukanu <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T rozpuszczonego w DMSO-d ₆ .	137
62.	Widmo DQF-COSY preparatu glukanowego <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T rozpuszczonego w DMSO-d ₆ .	138
63.	Fragment widma TOCSY peryplazmatycznego glukanu <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	138
64.	Profil elucji preparatu EPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T rozdzielanego na kolumnie wypełnionej Sephadexem CL-6B (0,7 × 90 cm).	141
65.	Profil elucji preparatu EPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T rozdzielanego na kolumnie wypełnionej Sephadexem CL-6B (0,7 × 90 cm).	141
66.	Chromatogram rozdziału octanów alditoli otrzymanych z preparatu EPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	142
67.	Chromatogram GC preparatu EPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T poddanego metylacji, całkowitej hydrolizie, redukcji i peracetylacji.	143
68.	Chromatogram GC preparatu EPS <i>O. lupini</i> LUP1 ^T poddanego metylacji, hydrolizie 2M TFA, redukcji i peracetylacji wg procedury Hakomori.	143
69.	Widmo mas i schemat fragmentacji 1,5- <i>O</i> -Ac ₂ -2,3,4,6- <i>O</i> -Me ₄ -heksitolu <i>O. lupini</i> LUP1 ^T .	145
70.	Widmo mas i schemat fragmentacji 1,2,5- <i>O</i> -Ac ₃ -3,4,6- <i>O</i> -Me ₃ -heksitolu otrzymanego z EPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T w wyniku zastosowania procedury metylacji (t _R =13.579 min).	146
71.	Widmo mas i schemat fragmentacji 1,3,5- <i>O</i> -Ac ₃ -2,4,6- <i>O</i> -Me ₃ -heksitolu otrzymanego z EPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T w wyniku zastosowania procedury metylacji (t _R =13.672 min).	146

72.	Widmo mas i schemat fragmentacji 1,2,5,6- <i>O</i> -Ac ₄ -3,4- <i>O</i> -Me ₂ -heksitolu otrzymanego z EPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T w wyniku zastosowania procedury metylacji (<i>t_R</i> =16.191 min.).	147
73.	Widmo 1D H-NMR EPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T rozpuszczonego w D ₂ O.	148
74.	Wpływ stężenia soli kadmu (CdSO ₄) na wzrost <i>O. lupini</i> LUP21 ^T w zmodyfikowanym podłożu 79CA.	149
75.	Wpływ stężenia Pb(CH ₃ COO) ₂ na wzrost <i>O. lupini</i> LUP21 ^T w zmodyfikowanym podłożu 79CA.	150
76.	Wpływ stężenia jonów kadmu i ołowiu na właściwości sorpcyjne <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	151
77.	Wpływ pH środowiska na sorpcje jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd <i>O. lupini</i> .	152
78.	Kinetyka wiązania jonów kadmu i ołowiu przez egzopolisacharyd <i>O. lupini</i> .	153
79.	Widma FT-IR preparatów EPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	154

TABELA		
LP	Tytuł	Strona
1.	Przemiany azotu w biosferze.	10
2.	Czynniki i geny <i>nod</i> ryzobiów.	23
3.	Składniki lipidu A w różnych szczepach bakteryjnych.	35
4.	Składniki cukrowe regionu rdzeniowego u różnych szczepów <i>Sinorhizobium</i> .	39
5.	Struktury powtarzających się podjednostek polisacharydu O-swoistego wybranych bakterii.	42
6.	Klasyfikacja peryplazmatycznych glukanów syntetyzowanych przez <i>Proteobacteria</i> .	53
7.	Struktura wybranych antygenów K u ryzobiów.	64
8.	Wydajność ekstrakcji lipopolisacharydów <i>Ochrobactrum cytisi</i> i <i>O. lupini</i> .	100
9.	Skład węglowodanowy preparatów LPS szczepu <i>Ochrobactrum cytisi</i> ESC1 ^T .	103
10.	Skład węglowodanowy preparatów LPS szczepu <i>Ochrobactrum lupini</i> LUP 21 ^T .	105
11.	Zawartość kwasów tłuszczowych w preparacie LPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T .	107
12.	Zawartość kwasów tłuszczowych w preparatach LPS <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	109
13.	Główne składniki zidentyfikowane w preparacie peretylowanych octanów alditoli otrzymanego z frakcji wysokocząsteczkowej degradowanego polisacharydu <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T .	112
14.	Wartości przesunięć chemicznych [δ , ppm] oraz stałych sprzężeń [$J_{C1,H1}$, Hz] dla poszczególnych atomów H i C w polisacharydzie O-swoistym <i>Ochrobactrum cytisi</i> ESC1 ^T .	116
15.	Główne składniki zidentyfikowane w preparatach degradowanego polisacharydu <i>O. lupini</i> LUP21 ^T otrzymanych w wyniku rozdziału na kolumnie Sephadex G50 fine.	121
16A.	Protonowe i węglowe przesunięcia chemiczne (ppm) dla wybranych związków zawartych we frakcji C.	123
16B.	Protonowe i węglowe przesunięcia chemiczne (ppm) dla wybranych związków zawartych we frakcji A (wysokocząsteczkowej).	127

16C.	Sygnały korelacyjne dla protonów anomerycznych z preparatu frakcji A zaobserwowane na widmach NOESY i HMBC.	127
17.	Ilość materiału glukanowego uzyskanego na drodze rozdziału i oczyszczania preparatu z fazy wodnej uzyskanej w trakcie delipidacji bakterii metodą Bligh-Dyer'a.	128
18.	Wartości mas cząsteczkowych dla poszczególnych pierścieni glukanowych <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T i <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	135
19.	Wartości przesunięć chemicznych protonów i atomów węgla dla reszt glukozy oraz stałych sprzężenia $J_{C1/H1}$ i $J_{H1/H2}$ z preparatów glukanowych <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T i <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	139
20.	Ilości egzopolisacharydów uzyskanych z płynu pochodzącego z <i>Ochrobactrum</i> .	140
21.	Skład węglowodanowy preparatów EPS <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T i <i>O. lupini</i> LUP21 ^T .	142
22.	Główne składniki zidentyfikowane w preparacie metylowanych octanów alditoli otrzymanych z preparatów egzopolisacharydowych <i>O. cytisi</i> ESC1 ^T .	143
23.	Główne składniki zidentyfikowane w preparacie metylowanych octanów alditoli otrzymanych z preparatów egzopolisacharydowych <i>O. lupini</i> LUP1 ^T .	144