

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ГЕНА AZOBR_p60123, КОДИРУЮЩЕГО БЕЛОК Wzt,
НА СИНТЕЗ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ И ФОРМИРОВАНИЕ
БИОПЛЕНОК У БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BALDANIORUM* Sp245

© 2023 г. Л. П. Петрова^a, *, С. С. Евстигнеева^a, Ю. А. Филипьевичева^a, И. В. Волохина^a,
Г. Л. Бурьгин^a, Л. Ю. Матора^a, А. В. Шелудько^a, **

^aИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов,
ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”, Саратов, 410049 Россия

*e-mail: petrova_lp@mail.ru

**e-mail: shel71@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.12.2022 г.

После доработки 27.01.2023 г.

Принята к публикации 30.01.2023 г.

Инактивация одного из генов (CDS AZOBR_p60123) АТФ-связывающего белка Wzt ABC-транспортера у р60123::aphAI мутанта *Azospirillum baldaniorum* Sp245, введение в родительский или мутантный штаммы дополнительной копии этого гена оказывали влияние на гетерогенность длин цепей О-специфических полисахаридов (ОПС) липополисахаридов (ЛПС), их иммунохимические характеристики, свойства штаммов, связанные с продукцией полисахаридов (строительство биопленок). Биопленки р60123::aphAI мутанта Sp245.4-1-1 накапливали в два раза меньше биомассы, чем Sp245. Введение рRK415-р60123 в клетки Sp245.4-1-1 или Sp245 приводило у полученных производных, соответственно, к повышению или снижению способности накапливать биомассу в биопленках, по сравнению с исходными штаммами.

Ключевые слова: *Azospirillum baldaniorum*, липополисахариды, ген wzt, ABC-транспортеры, биопленки

DOI: 10.31857/S002636562260081X, **EDN:** FWBWKP

Бактерии, принадлежащие к роду *Azospirillum*, являются свободноживущими микробами, способствующими росту растений (PGPB). Сообщалось о 29 видах *Azospirillum*, выделенных из разных ниш в разнообразных климатических поясах. Большинство этих видов было выделено из корней дикорастущих растений, из водной среды и загрязненных территорий. Они влияют на рост и урожайность многочисленных видов растений, многие из которых имеют агрономическое и экологическое значение, широко используются в качестве биоудобрений (Hendriksen, 2022). Основные поверхностные гликополимеры — липополисахариды (ЛПС), капсульные полисахариды (КПС) и экзополисахариды (ЭПС) — поддерживают структурную и функциональную целостность клеток азоспирилл, необходимы для формирования биопленок и роения, обеспечивают взаимодействие бактерий с другими организмами (Шелудько и соавт., 2008, 2018; Zdorovenko et al., 2015; Petrova et al., 2020). У ряда штаммов *Azospirillum baldaniorum* и *Azospirillum brasilense* ЭПС и КПС могут содержать О-полисахариды ЛПС (Матора, Щеголев, 2002; Евстигнеева и соавт., 2016).

Факультативный эндофит пшеницы *A. baldaniorum* Sp245 (ранее *A. brasilense*) (Dos Santos Ferreira et al., 2020) — один из наиболее активно исследуемых штаммов азоспирилл. Его ЛПС состоит из LpsI и LpsII с тонкими различиями в структуре и заряде ОПС и/или кора, детектируемыми посредством иммунохимических реакций и ионообменной хроматографии (Katzy et al., 1998; Fedonenko et al., 2002; Федоненко и соавт., 2004; Petrova et al., 2020). Повторяющимся звеном ОПС, входящим в состав LpsI (отрицательно заряжен) и LpsII (не заряжен), является пентасахарид, состоящий из остатков D-рамнозы (Fedonenko et al., 2002; Федоненко и соавт., 2004). Синтез гомополимерного ОПС, характерного для ЛПС *A. baldaniorum* Sp245, предполагает сборку ОПС на липидном носителе из активированных предшественников, осуществляемую гликозилтрансферазами на цитоплазматической стороне внутренней мембраны; перенос ОПС в периплазму с помощью ABC-транспортера (от англ. ATP-binding cassette (ABC) transporter); лигирование липида А—корового олигосахаарида с ОПС и перенос ЛПС на внешнюю мембрану клетки (Valvano et al., 2011). Известно, что ABC-транс-

портеры, участвующие в экспорте ЛПС, а также КПС и ЭПС, состоят из трансмембранной пермеазы Wzm и АТФ-связывающего белка Wzt (Valvano et al., 2011; Liston et al., 2017). В геноме штамма Sp245 предсказанные CDS (кодирующая последовательность ДНК — от англ. coding DNA sequence; CDS) для ферментов углеводного обмена разбросаны по хромосоме и несколькими крупными плазидами. Только несколько плазмидных генов *A. balduaniorum* Sp245 и *A. brasilense* Sp7, участвующих в продукции полисахаридов клеточной поверхности, были проанализированы экспериментально (Lerner et al., 2009; Petrova et al., 2020). Плазида AZOBR_p6 Sp245 насыщена генами, предположительно кодирующими белки биосинтеза полисахаридов, многие из которых, возможно, были получены путем горизонтального переноса от других бактерий (Wisniewski-Dyé et al., 2011). Она содержит не менее двух предполагаемых генов *wzm* (AZOBR_p60016 и AZOBR_p60122) и *wzt* (AZOBR_p60017 и AZOBR_p60123). Ранее показано, что в геномах штаммов *A. brasilense* SR15 и SR75, имеющих гомополимерный ОПС, также присутствуют по два предполагаемых гена *wzm* и *wzt*, обладающих очень высоким сходством с генами AZOBR_p60016/AZOBR_p60017 и AZOBR_p60122/AZOBR_p60123 (Петрова и соавт., 2017). В геноме *A. brasilense* Sp7, в ОПС которого выявлены не менее пяти видов повторяющихся звеньев (для бактерий с гетерополимерными ОПС Wzm/Wzt-зависимый путь биосинтеза ЛПС не характерен), обнаружены только по одному из каждой пары предполагаемых генов ABC-транспортера, идентичные AZOBR_p60017 и AZOBR_p60122 (Петрова и соавт., 2017).

Для подтверждения участия в биосинтезе липополисахаридов одного из предполагаемых генов *wzt* *A. balduaniorum* Sp245 мы инактивировали CDS AZOBR_p60123 и охарактеризовали фенотип полученного мутанта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы: выделенный в Бразилии из корней пшеницы штамм *A. balduaniorum*: Sp245 (IBPPM 219) (Dos Santos Ferreira et al., 2020), полученные в данной работе его производные Sp245(pRK415) и Sp245(pRK415–p60123), мутант Sp245.4-1-1 (содержит вставку *aphAI* (Km^R кассеты) из pUC4K в CDS AZOBR_p60123), Sp245.4-1-1(pRK415) и Sp245.4-1-1(pRK415–p60123). Использованные в работе плазмиды и праймеры представлены в табл. 1. Для поддержания созданных плазмид использован штамм *Escherichia coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Sambrook et al., 1989)). Плазмиду pRK2013 поддерживали в *E. coli* K802 (*supE hsdR gal metB* (Sambrook et al., 1989)).

Азоспириллы выращивали на малатно-солевой среде (Döbereiner, Day, 1976) с NH₄Cl (МСС) при 28°C, кишечную палочку — на среде Luria-Bertani (LB) при 37°C (Sambrook et al., 1989). Концентрация Бакто агара в плотных средах составляла 20 г/л; pH питательных сред доводили до 6.8–7.0. Жидкие бактериальные культуры инкубировали на платформе шейкера-инкубатора Excella E24 (“New Brunswick Scientific”, США) при 140 об./мин. При необходимости в среды вносили канамицин (Km) (30 мкг/мл), тетрациклин (Tc) (25 мкг/мл), прижизненный флуоресцентный краситель калькофлуор (Fluorescent Brightener 28; “Sigma-Aldrich”, США) (1 мг/мл).

Для постановки ПЦР использовали геномную ДНК, выделенную из жидких бактериальных культур с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (“ThermoScientific”, США). Праймеры (табл. 1) и бактериальную ДНК, растворенные в стерильной воде Milli-Q, добавляли в ПЦР-смеси до концентрации 0.5 мкМ и 0.5–1 мкг/50 мкл соответственно. Для амплификации ДНК использовали готовую для употребления смесь экстра-микс для ПЦР HS-Taq PCR (“Диа-эм”) или высокоточную ДНК полимеразу iProof High-Fidelity DNA Polymerase (“Bio-Rad”).

ПЦР ставили в термоциклере T100 (“BioRad Laboratories”, США) не менее чем в трех независимых повторностях. Продукты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в гелях, содержащих 1.2–2% агарозы в стандартных условиях (Sambrook et al., 1989). Ампликоны и плазмиды очищали с использованием наборов GeneJet PCR Purification и GeneJet Plasmid Miniprep Kits (“ThermoScientific”, США) соответственно.

Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции, разделение фрагментов ДНК в агарозном геле, лигирование ДНК, клонирование рекомбинантных ДНК в клетках *E. coli* осуществляли общепринятыми методами (Sambrook et al., 1989). Для анализа нуклеотидных последовательностей использовали базы данных и программы, представленные на серверах Национального центра биотехнологической информации США (NCBI).

Для выделения РНК бактериальные клетки из жидкой культуры собирали, отмывали 50 мМ фосфатным буфером (ФБ, pH 7) и суспендировали в нем до ОП₅₉₀ = 1. РНК выделяли из клеток с использованием NucleoZOL (“Macherey-Nagel”, Германия), обрабатывали ДНКазой I (NEB) 30 мин при 37°C, инактивировали 10 мин при 65°C. Концентрацию РНК определяли с помощью набора Qubit RNA BR Assay Kits на флуориметре Qubit 4 (“ThermoFS”, США). кДНК синтезировали из 1 мкг РНК с использованием набора MMLV RT kit (“Евроген”, Россия) с добавлением ингибитора рибонуклеаз Ribolock (“Thermo FS”, США). Чистоту РНК проверяли постановкой ПЦР на об-

разцах РНК и полученной кДНК с использованием специфических праймеров (праймеры rpoD-118-rt-F и rpoD-118-rt-R (табл. 1) для амплификации гена домашнего хозяйства (ген *rpoD*, кодирующий фактор σ^{70} ; Kumar et al., 2012). Наличие *RPOD*-специфического ампликона в случае образцов кДНК и отсутствие какого-либо ампликона в образцах РНК свидетельствовало, что экстрагированная РНК не содержала примесей ДНК (данные не показаны). ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) проводили в 25 мкл смеси с использованием набора для ПЦР qPCRmix-HS SYBR + HighROX (“Евроген”, Россия) на приборе Applied Biosystems 7300 (“Applied Biosystems”, США). В смесь для ПЦР в реальном времени добавляли 4 мкл кДНК, по 0.5 мкл праймеров (финальная концентрация 50 нМ). Условия включали начальную стадию инкубации 5 мин при 95°C, затем 40 циклов амплификации по 15 с при 95°C, 30 с при 60°C и 30 с при 72°C. Для амплификации генов *wzt* использовали специфические праймеры (табл. 1) (AZOBR_p60123 (праймеры p60123-rt-F и p60123-rt-R) и AZOBR_p60017 (праймеры p60017-rt-F и p60017-rt-R)). Ген домашнего хозяйства *rpoD* (праймеры rpoD-118-rt-F и rpoD-118-rt-R; табл. 1) использовали в качестве эндогенного контроля (Kumar et al., 2012). Профили экспрессии генов-мишеней определяли относительно уровня экспрессии гена домашнего хозяйства *rpoD* с использованием метода 2- $\Delta\Delta CT$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Процедура получения мутанта состояла из следующих этапов: наработка в ПЦР центрального 556-п.н. сегмента CDS AZOBR_p60123 (использовали праймеры p6_160686F и p6_161241R (табл. 1); клонирование этого ампликона в векторе pJET1.2/blunt (получение pJET1.2-p60123); клонирование по имеющемуся в ампликоне BamHI сайту рестрикции гена устойчивости к канамицину из pUC4K (*aphAI*) (получение pJET1.2-p60123::*aphAI*); переклонирование полученной конструкции из pJET1.2-p60123::*aphAI* в pEX18Tc (получение pEX18Tc-p60123::*aphAI* и трансформация этой плазмидой *E. coli* DH5a); использование pEX18Tc-p60123::*aphAI* для инактивации и маркирования CDS AZOBR_p60123 штамма Sp245 с отбором предполагаемых двойных рекомбинантов и их проверкой. Для этого скрещивали штаммы *E. coli* DH5a(pEX18Tc-p60123::*aphAI*), *E. coli* K802(pRK2013) и *A. balduaniorum* Sp245. Отбирали устойчивые к канамицину, но чувствительные к тетрациклину клоны азоспирилл (клоны, в которых прошла двойная рекомбинация между плазмидой pEX18Tc-p60123::*aphAI* и целевой ДНК азоспирилл). Для подтверждения вставки гена устойчивости к канамицину в CDS AZOBR_p60123 штамма Sp245, использовали праймеры к Km-кассете pUC4K (Km-F и Km-R) в парах с праймерами к гену AZOBR_p60123 Sp245 (табл. 1), гибридизацию колоний и плазмид азоспирилл с ме-

ченным биотином (Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit, “ThermoFS”, США) геном устойчивости к канамицину, а также секвенирование фрагментов ДНК, прилегающих к гену устойчивости к Km.

Для комплементации *wzt::aphAI* мутации в ПЦР был наработан ампликон, содержащий 1224-п.н. CDS AZOBR_p60123 штамма Sp245 (плюс 66 п.н. до и 81 п.н. после этой CDS). Для его получения разработали прямой (p160123-PF) и обратный (p160123-ER) праймеры (табл. 1), содержащие сайты рестрикции *Pst*I (P) или *Eco*RI (E), подходящие для клонирования ампликона в экспрессионном векторе pRK415 под контролем его *lac* промотора (этот промотор является конститутивным у неиспользующих лактозу *A. brasilense* и *A. balduaniorum*; Holguin, Glick, 2001). После клонирования была получена плазида pRK415-p60123, которую трансформировали в *E. coli* DH5a. Корректность всех полученных конструкций проверяли с помощью секвенирования ДНК в компании “Евроген” (г. Москва, Россия). Для мобилизации плазмид pRK415 или pRK415-p60123 из клеток *E. coli* DH5a в клетки азоспирилл использовали трехродительские скрещивания и плазмиду-помощник pRK2013. Трансформантов, приобретших плазмиду pRK415 или pRK415-p60123, отбирали и расщипали на плотной среде LB способом, описанным ранее (Petrova et al., 2020).

Для выделения ЛПС бактерии культивировали 18 ч в жидкой МСС. Затем клетки осаждали и отмывали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ; pH 6.8) от капсулы, осаждали центрифугированием и экстрагировали ЛПС в течение 30 мин при комнатной температуре в буфере с pH 8.5, содержащем 0.1 М Трис-HCl, 10 мМ ЭДТА, 0.1 мМ фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ) и 1% тритона X-100 (концентрация ЭДТА составляла 0.05 мМ на 1 г влажных клеток). Экстракт освобождали от клеток центрифугированием. Электрофорез ЭДТА-экстрактов клеток, обработанных протеиназой К, проводили в 15% полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE), визуализацию углеводных компонентов выполняли окрашиванием гелей серебром (Hitchcock, Brown, 1983). Линейный иммуноэлектрофорез проводили по Оухтерлони и Нильсону (Ouchterlony, Nilsson, 1979) с помощью прибора Multiphor II (“LKB”, Швеция) в 1% агарозных гелях. Окрашивали гели Кумасси бриллиантовым синим R250. Поликлональные кроличьи антитела на ЛПС получали как описано ранее (Матора и соавт., 1998).

Образование биопленок штаммами *A. balduaniorum* исследовали в плоскостонных 96-луночных полистироловых планшетах и в стеклянных пробирках. 18-часовые жидкие культуры разводили до ОП₅₉₀ = 0.05–0.10 в LB или МСС. Суспензии вносили по 2 мл в пробирку или по 200 мкл в лунку планшета и инкубировали 6 сут в статических

Таблица 1. Плазмиды и олигонуклеотидные праймеры

Плазмида или праймер	Характеристика	Источник
Плазмиды: pRK415	Производный от RK2 низкокопийный экспрессионный вектор широкого круга хозяев, 10.7 т.п.н., Mob ⁺ , Tc ^R	(Keen et al., 1980)
pRK2013	Плазмида-помощник узкого круга хозяев, repColE1, Tra ⁺ , 48 т.п.н., Km ^R	(Figurski, Helinski, 1979)
pJET1.2/blunt	Линеаризованный вектор для клонирования 6-п.н.—10-т.п.н. продуктов ПЦР; rep(pMB1), Ap ^R , 2974 п.н.	CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, США)
pUC4K	Ap ^R Km ^R , источник гена <i>aphAI</i> (Km ^R кассеты), Km ^R	(Vieira, Messing, 1982)
pEX18Tc	Tc ^R ; <i>oriT</i> ⁺ <i>sacB</i> ⁺ , плазмида для направленного мутагенеза	(Hoang et al., 1998)
pEX18 Tc(p60123:: <i>aphAI</i>)	pEX18Tc, содержащая вставку 556-п.н. ампликона центральной части CDS AZOBR_p60123 Sp245 со вставкой гена <i>aphAI</i> , в ампликон по BamHI-сайту	Данная работа
pRK415-p60123	pRK415, содержащая 1371-п.н. <i>Pst</i> I– <i>Eco</i> RI фрагмент ДНК с 1224-п.н. CDS AZOBR_p60123 из Sp245 плюс 66 п.н. до и 81 п.н. после этой CDS; Tc ^R	
Праймеры для амплификации сегментов генов Sp245: p6_160686F p6_161241R p60123-rt-F p60123-rt-R p60017-rt-F p60017-rt-R rpoD-118-rt-F rpoD-118-rt-R	5'-GCTCTGCGCGGCGTGTCTTTTC-3' 5'-GCAGCAGCCGGCCCTTCTCCA-3' 5'-CTGTGACCGGGCTATCCTTC-3' 5'-GGTTCGACATCCACGAGTT-3' 5'-GAGATCGAGCGCAAGATGGA-3' 5'-CATGGTCGAGCCACAGGATT-3' 5'-CGTCACCTATGACGAGCTGA-3' 5'-CTCTTCCGATTGACGATGT-3'	Данная работа (Kumar et al., 2012)
Праймеры* для амплификации CDS AZOBR_p60123 Sp245: p160123-PF p160123-ER	5'-CGTGCTGCAGCTGTTTTTG-3' 5'-CGCACCGAATTCGATGTAGAA-3'	Данная работа
Праймеры к Km-кассете: Km-F Km-R	5'-CATCGGGCTTCCCATACA-3' 5'-TGCCATTCTACCGGATT-3'	Данная работа

* В прямой (F) и обратный (R) праймеры были включены сайты рестрикции *Pst*I (P) или *Eco*RI (E) (выделены курсивом), подходящие для клонирования ампликона в векторе pRK415. Праймеры синтезировали в компаниях “Синтол” и “Евроген” (г. Москва, Россия).

условиях. Для оценки относительных количеств биомассы в биопленках их окрашивали 1% водным раствором кристаллического фиолетового и

обрабатывали, как описано в работе (Петрова и соавт., 2017). Оценку биомассы биопленок каждого штамма выполняли не менее шести раз.

Каждый раз окрашивали биопленки, сформировавшиеся в пяти стеклянных пробирках или восьми лунках планшетов. Результаты обрабатывали с использованием пакета Microsoft Office Excel 2010; доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости. Для выявления статистически значимых различий между средними значениями использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) при уровне значимости 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ влияния CDS AZOBR_p60123 на характеристики поверхностных гликополимеров азоспирилл. В результате проведенного сайт-направленного мутагенеза был получен мутант *A. baldaniorum* Sp245.4-1-1, который содержал вставку гена устойчивости к канамицину в центральной части CDS AZOBR_p60123 предполагаемого гена *wzt* АТФ-связывающего белка ABC-транспортера (Л)ПС. Мутант не отличался от родительского штамма скоростью роста на плотных и жидких средах, жгутикованием и подвижностью клеток. Он, как и родительский штамм, синтезировал полисахариды, связывающие прижизненный краситель калькофлуор (Cal⁺ фенотип).

Для подтверждения влияния направленной мутации в гене *wzt* на фенотип *A. baldaniorum* Sp245 была проведена генетическая комплементация *wzt::aphAI* мутанта Sp245.4-1-1 с помощью полученной конструкции pRK415-p60123. С целью выявления возможного влияния повышения дозы исследуемого *wzt* гена на фенотип штамма Sp245, плазида pRK415-p60123 была введена и в его клетки.

На рис. 1а приведены результаты SDS-PAGE препаратов ЛПС Sp245, Sp245(pRK415-p60123), Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) и Sp245.4-1-1. По сравнению со штаммом Sp245 (рис 1а, трек 1), у мутанта Sp245.4-1-1 (рис. 1а, трек 4) наблюдается сокращение количества и снижение интенсивности полос в области ОПС2 (зона локализации данного полисахарида штамма Sp245 была определена в работе (Katzy et al., 1998) с использованием соответствующих мутантов по структуре ЛПС). В электрофоретическом профиле препаратов ЛПС комплементированного мутанта Sp245.4-1-1 (pRK415-p60123) (рис. 1а, трек 3), по сравнению с мутантом Sp245.4-1-1, появляются дополнительные полосы по всей длине треков. В верхней части зоны “а” (высокомолекулярная фракция ЛПС) у штамма Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) появляются полосы, отсутствующие у Sp245.4-1-1, но присутствующие у Sp245. Введение дополнительной копии гена *wzt* в родительский штамм Sp245 также приводит к изменениям в электрофоретическом профиле препаратов ЛПС полученного производного Sp245(pRK415-p60123) (рис. 1а, трек 2). В частности, в верхней части зо-

ны “а” выявляется большее количество материала по сравнению с диким типом.

Как было отмечено выше, штамм Sp245 синтезирует два высокомолекулярных ЛПС (ОПС1 и ОПС2), содержащие идентичный D-рамнанный О-полисахарид, но имеющие разный заряд и антигенные свойства (Katzy et al., 1998; Fedonenko et al., 2002; Федоненко и соавт., 2004; Petrova et al., 2020). Для подтверждения влияния направленной мутации в AZOBR_p60123 на особенности структуры ЛПС был проведен сравнительный иммунохимический анализ препаратов ЛПС всех исследуемых вариантов методом линейного иммуноэлекторофореза с антителами на ЛПС родительского штамма. На рис. 1б можно видеть, что антитела на Sp245 формируют две линии преципитации с гомологичным ЛПС, соответствующие отрицательно заряженному ОПС1 и нейтральному ОПС2 (рис. 1б, лунка 1), тогда как с ЛПС мутанта Sp245.4-1-1 — только одну полосу преципитации, соответствующую ОПС1 (рис. 1б, лунка 4). При этом у комплементированного мутанта Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) восстанавливались антигенные характеристики ЛПС, свойственные родительскому штамму (рис. 1б, лунка 3). Вероятно, инактивация CDS AZOBR_p60123 приводит к дефектам в образовании нейтрального ОПС2, которые устраняются у Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) в результате комплементации. Таким образом, использование иммунохимического подхода позволило получить дополнительную информацию, свидетельствующую о синтезе комплементом Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) липополисахаридов, гетерогенность которых не отличается от таковой родительского штамма. Стоит отметить, что введение пустого вектора pRK415 в бактерии не влияло на электрофоретический профиль и иммунохимические характеристики препаратов ЛПС Sp245 (Petrova et al., 2020) или Sp245.4-1-1.

Анализ влияния инактивации CDS AZOBR_p60123 на экспрессию CDS AZOBR_p60017. В плазмиде AZOBR_p6 штамма *A. baldaniorum* Sp245 есть еще одна копия гена *wzt* (CDS AZOBR_p60017). Анализ уровня транскриптов второго гена *wzt* (CDS AZOBR_p60017) с помощью ПЦР в реальном времени показал, что в клетках p60123::*aphAI* мутанта Sp245.4-1-1 этот показатель в 2.5 раза превышал значения, характерные для родительского штамма. Введение pRK415-p60123 в Sp245.4-1-1 приводило к значительному снижению транскрипции CDS AZOBR_p60017 в клетках комплемента Sp245.4-1-1(pRK415-p60123) до значений в 1.7 раз меньше уровня характерного для Sp245 (рис. 2а). В случае производного Sp245 с дополнительной копией гена AZOBR_p60123 (Sp245(pRK415-p60123)) транскрипция CDS AZOBR_p60017 снижается в 2.0 раза (рис. 2а). Таким образом, повышение экспрессии CDS AZOBR_p60017 могло частично компенсировать мутацию CDS AZOBR_p60123

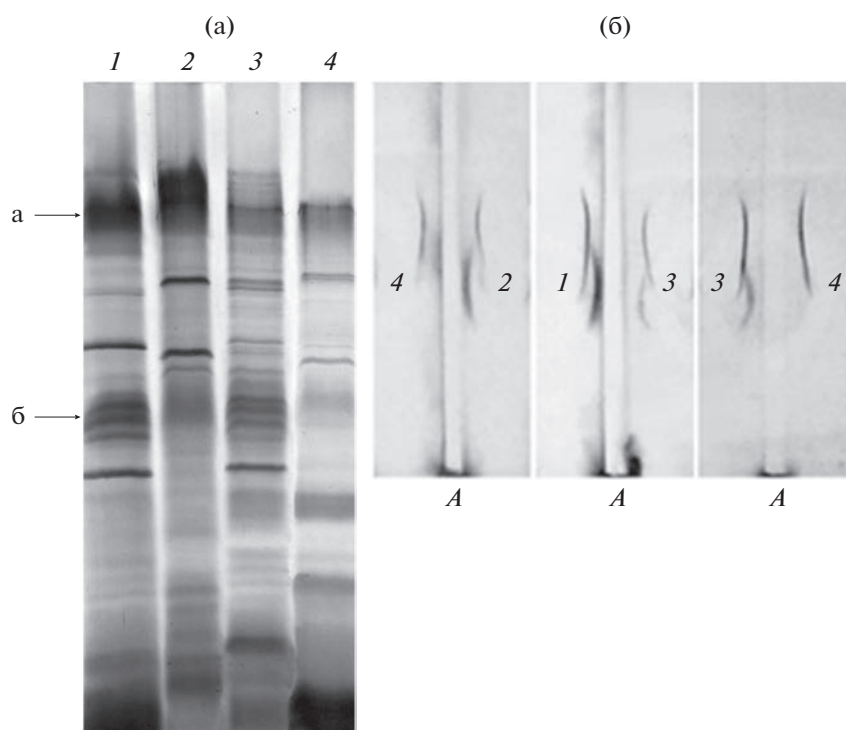


Рис. 1. Характеристика электрофоретических профилей и иммунохимических свойств препаратов ЛПС *A. baldaniorum*: (а) — результаты SDS-PAGE ЛПС штаммов Sp245 (1), Sp245(pRK415–p60123) (2), Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) (3), Sp245.4-1-1 (4); (б) — результаты линейного иммуноэлектрофореза экстрактов ЛПС штаммов Sp245 (1), Sp245(pRK415–p60123) (2), Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) (3), Sp245.4-1-1 (4) с анти-ЛПС антителами. В центральную траншею (А) вносили поликлональные кроличьи антитела на ЛПС штамма Sp245 (как показано ранее (Dos Santos Ferreira et al., 2020), LpsI и LpsII содержат общие эпитопы).

у p60123::aphAI мутанта Sp245.4-1-1. В то же время введение CDS AZOBR_p60123, клонированной в pRK415 (pRK415–p60123), в клетки этого мутанта или Sp245 приводит к снижению в 1.7–2.0 раза показателей, характеризующих экспрессию CDS AZOBR_p60017 (по сравнению с уровнем экспрессии в клетках родительского штамма) (рис. 2).

Анализ влияния CDS AZOBR_p60123 на накопление азоспириллами биомассы в биопленках. Анализ накопления биомассы в биопленках показал, что все исследованные штаммы не различались в способности формировать биопленки на стекле (рис. 3). На полистироле выявлено статистически значимое снижение относительного количества биомассы в биопленках штамма Sp245.4-1-1 по сравнению со штаммом Sp245. В то же время у комплементанта Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) наблюдалось повышение относительного количества биомассы в биопленках по сравнению с мутантом Sp245.4-1-1 (рис. 3). В биопленках штамма Sp245(pRK415–p60123) с искусственно повышенной дозой исследуемого гена *wzt* накапливалось в два раза меньше биомассы, чем в биопленках штамма Sp245 (рис. 3). Введение плазмиды pRK415 в Sp245 и Sp245.4-1-1 не влияло на количественные характеристики биопленок.

ЛПС обладают большим диапазоном длин цепей ОПС, что приводит к характерной лестничной структуре, когда молекулы исследуются с помощью SDS-PAGE (Holguin, Glick, 2001). Характерное для каждой бактерии распределение длин ОПС определяется регуляторными механизмами в путях сборки и, в некоторых случаях, непосредственно транспортерами ABC (Liston et al., 2017). У мутантного штамма Sp245.4-1-1 с инактивированным геном AZOBR_p60123 при SDS-PAGE препаратов ЛПС выявлено сокращение количества и интенсивности полос в области высокомолекулярной фракции, содержащей ОПС2, по сравнению с Sp245. Введение экспрессионной плазмиды pRK415–p60123 в мутантный и родительский штаммы привело к появлению дополнительных полос по всей длине треков в SDS-PAGE профиле препаратов ЛПС. Несмотря на то, что в зоне высокомолекулярной фракции ЛПС у комплементированного мутанта Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) нет такой интенсивности полос, как у штамма Sp245, у него появляется большее количество полос в зоне более коротких ОПС (сопоставимое с профилем ЛПС Sp245 в этой зоне). В электрофоретическом профиле ЛПС Sp245(pRK415–p60123) происходит значительное увеличение интенсив-

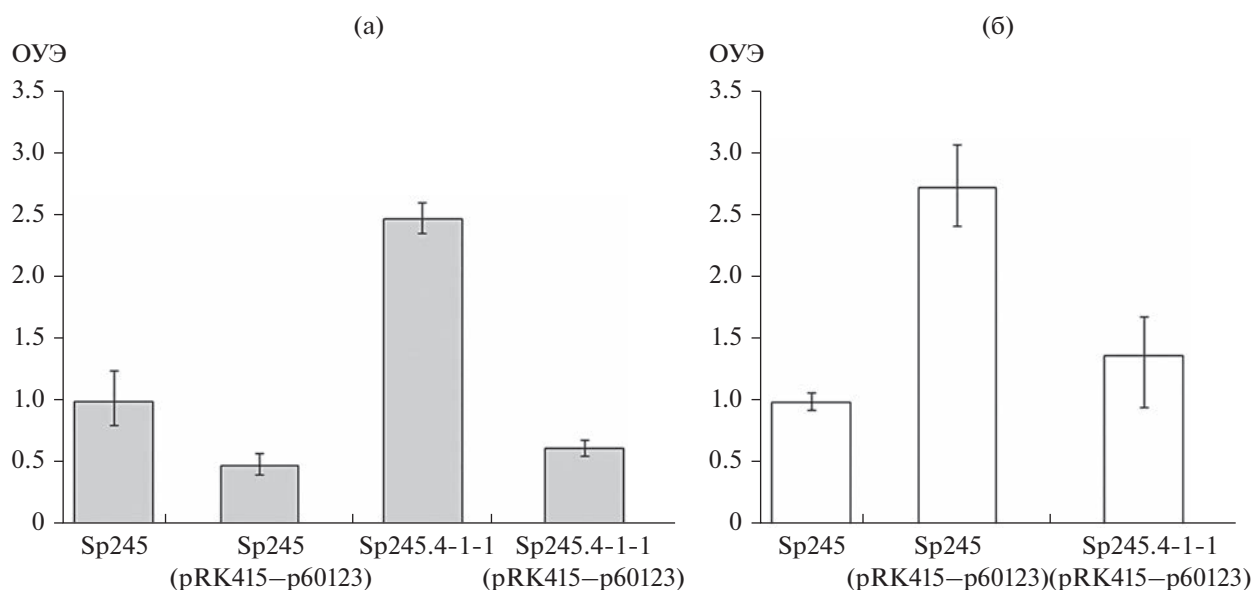


Рис. 2. Результаты анализа экспрессии CDS AZOBR_p60017 (а) и CDS AZOBR_p60123 (б) в клетках *A. baldaniorum*. Относительный уровень экспрессии (ОУЭ) – отношение результатов ПЦР в реальном времени с кДНК AZOBR_p60017 и AZOBR_p60123 штаммов Sp245(pRK415–p60123), Sp245.4-1-1 и Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) к аналогичным результатам Sp245.

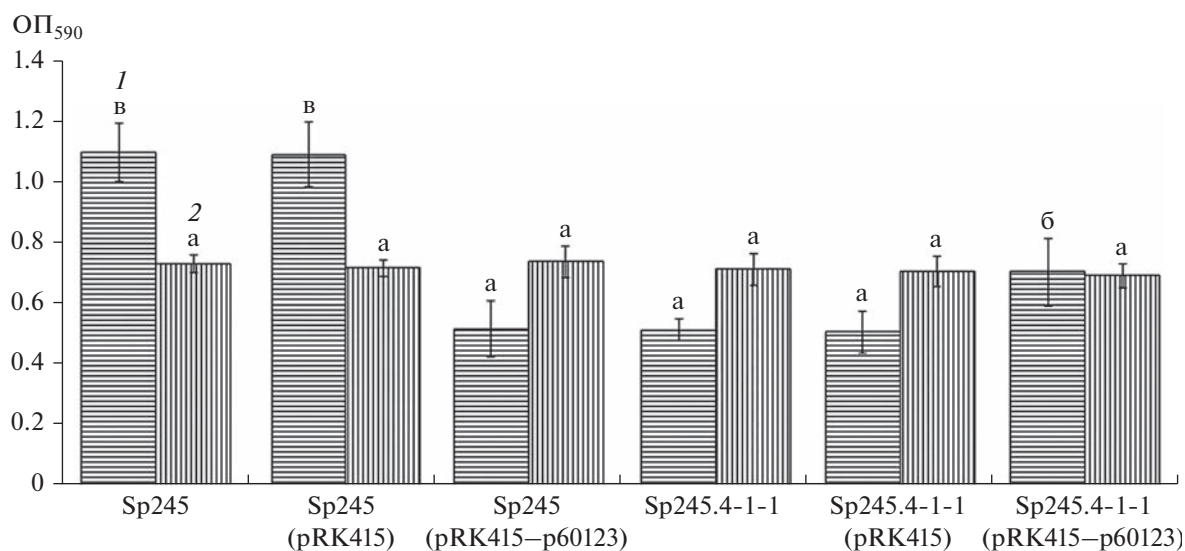


Рис. 3. Относительное количество биомассы в биопленках азоспирилл, сформированных за 6 сут культивирования на поверхности полистирола (1) или стекла (2) под жидкой средой МСС. ОП₅₉₀ – десорбированного кристаллического фиолетового после окрашивания биопленок.

ности и плотности полос в зоне высокомолекулярной фракции по сравнению с Sp245, что, по всей видимости, вызвано введением дополнительной копии гена *wzt* (AZOBR_p60123).

В работе (Nakao et al., 2006) было показано, что мутация гена *wzt* у бактерии *Porphyromonas gingivalis* не оказывала влияния на профиль ЛПС. Авторы предположили, что, поскольку *P. gingivalis* обладает двумя предполагаемыми генами *wzt*, синтезируется

альтернативный генный продукт, который компенсирует потерю функции мутантного гена. В плазмиде AZOBR_p6 *A. baldaniorum* Sp245 (Wisniewski-Dyé et al., 2011) есть еще одна копия гена *wzt* (CDS AZOBR_p60017), увеличение экспрессии которого мы наблюдали у мутанта, что, очевидно, частично компенсировало мутацию в CDS AZOBR_p60123 у Sp245.4-1-1. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что

после введения в Sp245.4-1-1 дополнительной копии гена p60123 происходило восстановление синтеза ОПС, но неполное. При этом восстанавливались иммунохимические характеристики ЛПС, свойственные родительскому штамму. Вероятно, низкий уровень экспрессии CDS AZOBR_p60017 по сравнению с Sp245 у Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) или Sp245 (pRK415–p60123) на фоне экспрессии CDS AZOBR_p60123 с плазмиды pRK415–p60123 влиял на уровень гетерогенности длин цепей ОПС этих штаммов, определяемых, в том числе, АВС-транспортерами (Liston et al., 2017). В случае Sp245(pRK415–p60123) уровень экспрессии CDS AZOBR_p60123 был повышенным, что могло также отразиться на фенотипических характеристиках этого штамма.

Мембранные ЛПС, экскретируемые полисахариды (КПС и ЭПС) бактерий, в том числе, у азоспирилл, фиксируют зрелые биопленки на твердых поверхностях, стабилизируют биомассу биопленок, выполняя каркасную функцию, и необходимы для коллективной подвижности бактерий (Шелудько и соавт., 2018; Petrova et al., 2020). Нарушения в синтезе полисахаридов часто приводят к изменениям в формировании биопленок и подвижности роящихся азоспирилл (Шелудько и соавт., 2007; Petrova et al., 2020). Результаты данного исследования показали, что на гидрофобной поверхности биопленки мутанта Sp245.4-1-1 накапливали в два раза меньше биомассы, чем Sp245, введение pRK415–p60123 в клетки Sp245.4-1-1 или Sp245 приводило у полученных производных, соответственно, к повышению или снижению способности накапливать биомассу в биопленках по сравнению с исходными штаммами. Поскольку все исследованные штаммы не различались по скорости роста в жидких планктонных культурах и на плотных средах, формировали на гидрофильной поверхности биопленки с одинаковым количеством биомассы, можно полагать, что деление клеток не является параметром, лимитирующим накопление биомассы в биопленках.

Сохранение полярного жгутика (Fla) на клетках Sp245, интегрированных в зрелую биопленку, способствует поддержанию ее целостности и повышает ее устойчивость в условиях гидродинамического сдвига (Шелудько и соавт., 2015). Клетки изучаемых штаммов синтезировали полярный жгутик и плавали в жидкой среде с одинаковой скоростью. ЛПС могут способствовать дополнительному включению подвижных бактерий из планктонной культуры в сформированную пленку, однако на гидрофильной поверхности все штаммы создавали одинаковые биопленки, а на гидрофобной пленки у них различались. Таким образом, дополнительное включение бактерий из планктонной культуры в уже образованную биопленку вряд ли играет значимую роль, вероятно, различия начинают проявляться уже на ранних стадиях форми-

рования пленок. На начальных этапах образования биопленок подвижные бактерии формировали тонкие пленки, при микроскопии которых просматривались разрозненные клеточные агрегаты, легко смываемые с поверхности при аспирации суспензий и промывании водой. На данном этапе клетки штаммов Sp245, Sp245(pRK415–p60123), Sp245.4-1-1 и Sp245.4-1-1(pRK415–p60123), различающиеся гетерогенностью ЛПС, могут по-разному взаимодействовать с колонизируемой поверхностью и между собой. Гетерогенность ЛПС, определяемая, в том числе, размером молекулярных масс О-полисахаридов, коррелирует с силами адгезии и прилипания как на уровне отдельной бактерии, так и популяции бактериальных клеток (Jucker et al., 1997; Camesano, Abu-Lail, 2002; Atabek, Camesano, 2007). Длина цепей ОПС опосредует гидрофобность и заряд бактериальных клеток и самих полисахаридов (Atabek, Camesano, 2007). В случае клеток каждого из штаммов эти параметры были, очевидно, индивидуальны. Бактерии по-разному перемещались на разделе жидкая среда/твердая поверхность, взаимодействовали друг с другом или с колонизируемой поверхностью (гидрофобной или гидрофильной), что, вероятно, оказывало влияние на следующие этапы процесса формирования биопленок: процесс прочной адгезии бактерий на поверхности, начало прироста и стабилизации биомассы, характерные для *A. baldaniorum* Sp245 (Шелудько и соавт., 2015).

Можно предположить, что фенотипические различия (иммунохимические характеристики и изменения в формировании биопленок) *A. baldaniorum* Sp245, Sp245(pRK415–p60123), Sp245.4-1-1 и Sp245.4-1-1(pRK415–p60123) обусловлены гетерогенностью ЛПС этих штаммов, опосредованной активностью гена *wzt* (AZOBR_p60123).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность Центру коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии “Симбиоз” ИБФРМ РАН (Саратов, Россия).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евстигнеева С.С., Сигида Е.Н., Федоненко Ю.П., Коннова С.А., Игнатов В.В. Структурные особенности капсульных и О-полисахаридов бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 при изменении условий культивирования // Микробиология. 2016. Т. 85. С. 643–651. <https://doi.org/10.7868/S0026365616060094>
- Yevstigneyeva S.S., Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Konnova S.A., Ignatov V.V. Structural properties of capsular and O-specific polysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp245 under varying cultivation conditions // Microbiology (Moscow). 2016. V. 85. P. 664–671. <https://doi.org/10.1134/S0026261716060096>
- Матора Л.Ю., Шварцбург Б.И., Щеголев С.Ю. Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 1998. Т. 67. С. 815–820.
- Matora L.Yu., Shvartsburd B.I., Shchegolev S.Yu. Immunochemical analysis of O-specific polysaccharides from the soil nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 1998. V. 67. P. 677–681.
- Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Антигенная идентичность липополисахаридов, капсулы и экзополисахаридов *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2002. Т. 71. С. 211–214.
- Matora L.Y., Shchegolev S.Y. Antigenic identity of the capsule lipopolysaccharides, exopolysaccharides, and O-specific polysaccharides in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 178–181. <https://doi.org/10.1023/A:1015146104397>
- Петрова Л.П., Прилипов А.Г., Кацы Е.И. Выявление предполагаемых генов биосинтеза полисахаридов у штаммов *Azospirillum brasilense* из серогрупп I и II // Генетика. 2017. Т. 53. С. 31–42. <https://doi.org/10.7868/S0016675816110102>
- Petrova L.P., Prilipov A.G., Katsy E.I. Detection of putative polysaccharide biosynthesis genes in *Azospirillum brasilense* strains from serogroups I and II // Russ. J. Genet. 2017. V. 53. P. 39–48. <https://doi.org/10.1134/S1022795416110107>
- Шелудько А.В., Кулибякина О.В., Широков А.А., Петрова Л.П., Матора Л.Ю., Кацы Е.И. Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2008. Т. 77. С. 358–363.
- Sheludko A.V., Kulibyakina O.V., Shirokov A.A., Petrova L.P., Matora L.Yu., Katsy E.I. The effect of mutations affecting synthesis of lipopolysaccharides and calcofluor-binding polysaccharides on biofilm formation by *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2008. V. 77. P. 313–317. <https://doi.org/10.1134/S0026261708030107>
- Шелудько А.В., Филиппева Ю.А., Телешева Е.М., Буров А.М., Евстигнеева С.С., Бурегин Г.Л., Петрова Л.П. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 // Микробиология. 2018. Т. 87. С. 483–494. <https://doi.org/10.1134/S0026365618050166>
- Shelud'ko A.V., Filip'icheva Y.A., Telesheva E.M., Burov A.M., Evstigneeva S.S., Burygin G.L., Petrova L.P. Characterization of carbohydrate-containing components of *Azospirillum brasilense* Sp245 biofilms // Microbiology (Moscow). 2018. V. 87. P. 610–620. <https://doi.org/10.1134/S0026261718050156>
- Шелудько А.В., Филиппева Ю.А., Шумилова Е.М., Хлебцов Б.Н., Буров А.М., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиология. 2015. Т. 84. С. 175–183. <https://doi.org/10.7868/s0026365615010127>
- Shelud'ko A.V., Filip'icheva Y.A., Shumilova E.M., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Petrova L.P., Katsy E.I. Changes in biofilm formation in the nonflagellated *flhB1* mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Microbiology (Moscow). 2015. V. 84. P. 144–151. <https://doi.org/10.1134/S0026261715010129>
- Федоненко Ю.П., Здорovenko Э.Л., Коннова С.А., Игнатов В.В., Шляхтин Г.В. Сравнительная характеристика липополисахаридов и О-специфических полисахаридов *Azospirillum brasilense* Sp245 и его омегон-Км мутантов КМ018 и КМ252 // Микробиология. 2004. Т. 73. С. 180–187.
- Fedonenko Yu.P., Zdrovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Shlyakhtin G.V. A comparison of the lipopolysaccharides and O-specific polysaccharides of *Azospirillum brasilense* Sp245 and its Omegon-Km mutants КМ018 and КМ252 // Microbiology (Moscow). 2004. V. 73. P. 143–149.
- Atabek A., Camesano T.A. Atomic force microscopy study of the effect of lipopolysaccharides and extracellular polymers on adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. 2007. V. 18. P. 8503–8509. <https://doi.org/10.1128/JB.00769-07>
- Camesano T.A., Abu-Lail N.I. Heterogeneity in bacterial surface polysaccharides, probed on a single-molecule basis // Biomacromolecules. 2002. V. 3. P. 661–667. <https://doi.org/10.1021/bm015648y>
- Döbereiner J., Day J.M. Associative symbiosis in tropical grass: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // Symposium on Nitrogen Fixation / Ed. Newton W.E., Nijmans C.J. Pullman: Washington State University Press, 1976. P. 518–538. <https://doi.org/10.12691/aees-4-4-1>
- Dos Santos Ferreira N., Sant'Anna F.H., Reis V.M., et al. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2020. V. 70. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
- Fedonenko Y.P., Zatonsky G.V., Konnova S.A., Zdrovenko E.L., Ignatov V.V. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245 // Carbohydr. Res. 2002. V. 337. P. 869–872. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(02\)00061-7](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(02)00061-7)
- Figurski D.H., Helinski D.R. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979 V. 76. P. 1648–1652. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>
- Hendriksen N.B. Microbial biostimulants – the need for clarification in EU regulation // Trends Microbiol. 2022. V. 30. P. 311–313. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.01.008>
- Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in sil-

- ver-stained polyacrylamide gels // J. Bacteriol. 1983. V. 154. P. 269–277.
<https://doi.org/10.1128/jb.154.1.269-277.1983>
- Hoang T.T., Karkhoff-Schweizer R.R., Kutchma A.J., Schweizer H.P. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants // Gene. 1998. V. 212. P. 77–86.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(98\)00130-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(98)00130-9)
- Holguin G., Glick B.R. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense* // Microb. Ecol. 2001. V. 41. P. 281–288.
<https://doi.org/10.1007/s002480000040>
- Jucker B.A., Harms H., Hug S.J., Zehnder A.J.B. Adsorption of bacterial surface polysaccharides on mineral oxides is mediated by hydrogen bonds // Colloids Surf. B Biointerfaces. 1997. V. 9. P. 331–343.
[https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(97\)00038-6](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(97)00038-6)
- Katzy E.I., Matora L.Y., Serebrennikova O.B., Sheludko A.V. Involvement of a 120-MDa plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp245 in production of lipopolysaccharides // Plasmid. 1998. V. 40. P. 73–83.
<https://doi.org/10.1006/plas.1998.1353>
- Keen N.T., Tamaki S., Kobayashi D., Trollinger D. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria // Gene. 1980. V. 70. P. 191–197.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90117-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90117-5)
- Kumar S., Rai A.K., Mishra M.N., Shukla M., Singh P.K., Tripathi A.K. RpoH2 sigma factor controls the photooxidative stress response in a nonphotosynthetic rhizobacterium, *Azospirillum brasilense* Sp7 // Microbiology (SGM). 2012. V. 158. P. 2891–2902.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.062380-0>
- Lerner A., Okon Y., Burdman S. The *wzm* gene located on the pRhico plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp7 is involved in lipopolysaccharide synthesis // Microbiology (SGM). 2009. V. 155. P. 791–804.
<https://doi.org/10.1099/mic.0.021824-0>
- Liston S.D., Mann E., Whitfield C. Glycolipid substrates for ABC transporters required for the assembly of bacterial cell-envelope and cell-surface glycoconjugates // Biochim. Biophys. Acta. 2017. V. 1862. P. 1394–1403.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.008>
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method // Methods. 2001. V. 25. P. 402–408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Nakao R., Senpuku H., Watanabe H. *Porphyromonas gingivalis* *galE* is involved in lipopolysaccharide O-antigen synthesis and biofilm formation // Infect. Immun. 2006. V. 74. P. 6145–6153.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00261-06>
- Ouchterlony O., Nilsson L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis // Handbook of Experimental Immunology / Ed. Weiz D.M. Oxford: Alden Press, 1979. V. 1. P. 19–33.
- Petrova L.P., Yevstigneeva S.S., Borisov I.V., Shelud'ko A.V., Burygin G.L., Katsy E.I. Plasmid gene AZOBR_p60126 impacts biosynthesis of lipopolysaccharide II and swarming motility in *Azospirillum brasilense* Sp245 // J. Basic Microbiol. 2020 V. 60. P. 613–623.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201900635>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edn. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- Valvano M.A., Furlong S.E., Patel K.B. Genetics, biosynthesis and assembly of O-antigen // Bacterial Lipopolysaccharides: Structure, Chemical Synthesis, Biogenesis and Interaction with Host Cells / Eds. Knirel Y.A., Valvano M.A. Wien: Springer, 2011. P. 275–310.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2003.07.009>
- Vieira J., Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers // Gene. 1982. V. 19. P. 259–268.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90015-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90015-4)
- Wisniewski-Dyé F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., et al. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments // PLoS Genet. 2011. V. 7. P. e1002430.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>
- Zdorovenko E.L., Shashkov A.S., Zhurina M.V., Plakunov V.K., Knirel Y.A. Structure of the O-specific polysaccharides from planktonic and biofilm cultures of *Pseudomonas chlororaphis* 449 // Carbohydr. Res. 2015. V. 404. P. 93–97.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.10.020>

Effect of the AZOBR_p60123 Plasmid Gene, Encoding the Wzt Protein, on Lipopolysaccharide Synthesis and Biofilm Formation in the Bacterium *Azospirillum baldaniorum* Sp245

L. P. Petrova¹*, S. S. Evstigneeva¹, Y. A. Filip'echeva¹, I. V. Volokhina¹, G. L. Burygin¹, L. Y. Matora¹, and A. V. Shelud'ko¹,**

¹ Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia

*e-mail: petrova_lp@mail.ru

**e-mail: shel71@yandex.ru

Received December 6, 2022; revised January 27, 2023; accepted January 30, 2023

Abstract—Inactivation of one of the genes (CDS AZOBR_p60123) of the ABC transporter ATP-binding protein Wzt in the p60123::aphAI mutant of *Azospirillum baldaniorum* Sp245 and the introduction of an addition-

al copy of this gene into the parent or mutant strain affected the chain-length heterogeneity of O polysaccharides (OPSs) and lipopolysaccharides (LPSs), the OPS and LPS immunochemical characteristics, and the strain properties related to polysaccharide production (biofilm construction). Biofilms of the p60123::*aphA1* mutant Sp245.4-1-1 accumulated two times less biomass than those of Sp245. Introduction of pRK415-p60123 into the cells of Sp245.4-1-1 or Sp245 resulted in a respective increase or decrease in the ability of the resulting derivative strains to accumulate biofilm biomass, as compared with the original strains.

Keywords: *Azospirillum baldaniorum*, lipopolysaccharides, *wzt* gene, ABC transporters, biofilms