

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ О-ПОЛИСАХАРИДОВ НА УСПЕШНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. Г. Л. Бурьгин^{a, b, c, *}, А. А. Ханина^c, М. В. Филиппова^c

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

^bСаратовский исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, 410012, Россия

^cСаратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова, Саратов, 410012, Россия

*e-mail: burygingl@gmail.com

Поступила в редакцию 16.10.2023 г.

После доработки 07.11.2023 г.

Принята к публикации 08.11.2023 г.

О-полисахариды грамотрицательных бактерий — высоко вариабельный компонент молекул липополисахаридов, расположенных на поверхности клеточной стенки и вовлеченных во взаимодействия микроорганизмов с клетками животных и растений. Активность генов профагов часто приводит к различным нестехиометрическим модификациям (метилованию, ацетилированию и другим) гликанов поверхности бактериальных клеток. Доля модифицированных О-полисахаридов возрастает в стационарной фазе роста культуры и приводит к повышению гидрофобности поверхности микробов. Клетки бактерий, различающиеся по гидрофобности, с разной интенсивностью прикрепляются к корням растений. Установлено, что повышение индекса гидрофобности клеток значительно повышает количество адсорбированных микроорганизмов на единицу длины корня. Таким образом, предполагается опосредованное участие генов ацетилтрансфераз и метилтрансфераз вирусного происхождения на успешность колонизации ризосферными бактериями корней растений.

Ключевые слова: липополисахарид, О-полисахарид, профаги, ацетилирование, гидрофобность клеток, PGPR, растительно-микробные взаимодействия, бактериальная колонизация корней

DOI: 10.31857/S0026365624020148

Грамотрицательные бактерии на поверхности наружной мембраны содержат липополисахаридные молекулы (ЛПС), занимающие большую часть поверхности клеточной стенки (Lerouge, Vanderleyden, 2002). В состав ЛПС входит липид А, связывающий олигосахарид (кор) и высоко вариабельный О-полисахарид (ОПС). ОПС представляет собой полимер повторяющихся олигосахаридных звеньев, различающихся по моносахаридному составу, гликозидным связям и физико-химическим свойствам. При этом за счет своей экспонированности на поверхности клетки ОПС вовлечен во взаимодействия бактерий с клетками животных и растений (Alexander, Rietschel, 2001).

Почвенные и ризосферные бактерии почти всегда содержат в своем геноме большое количество профагов и других генов, имеющих вирусное происхождение (Roy et al., 2020; Sigida et al., 2020). Активность генов фагов в бактериальных клетках может приводить к модификации ОПС через их нестехиометрическое метилирование,

ацетилирование, глюкозилирование или другие реакции (Lerouge, Vanderleyden, 2002; Sigida et al., 2020; Teh et al., 2020). Подобные изменения поверхностных полисахаридов защищают бактериальные клетки от новых бактериофагов, для которых молекулами узнавания являются немодифицированные ОПС. В свою очередь, введение метильных или ацильных групп в ОПС приводит к повышению гидрофобности бактериальной поверхности и, соответственно, изменению физико-химических свойств клеток. Отражением активности вирусных механизмов модификации бактериальных ОПС может служить преобладание “R-формы” колоний у почвенных грамотрицательных бактерий. Ранее у ризосферного штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 была продемонстрирована R-S-диссоциация без характерной для этого процесса у энтеробактерий утраты ОПС (Матора и соавт., 2003). Анализ структуры повторяющихся звеньев ОПС штамма Sp7 показал присутствие нестехиометрического метилирования одного из остатков рамнозы (Sigida et al.,

2013). Таким образом, повышение степени метилирования ОПС приводит к гидрофобному фенотипу “R-форма”, а снижение — к гидрофильному фенотипу “S-форма”.

Целью данной работы было изучить связь между гидрофобностью бактериальных клеток и их адсорбцией на поверхности корней картофеля, а также рассмотреть возможность участия генов профагов нестехиметрического ацетилирования ОПС в повышении активности колонизации ризосферными бактериями растения-партнера.

В работе были использованы микрорастения картофеля сорта Невский. Штаммы ризобактерий родов *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Ensifer*, *Ochrobactrum* и *Pseudomonas* были получены из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН. Бактериальные культуры выращивали на малатно-солевой среде (Tkachenko et al., 2015) в течение 18 ч при 35°C. Клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS; pH 7.2). Для определения гидрофобности бактериальных клеток использовали тест сродства к н-гексадекану (Krepesky et al., 2003).

Адсорбцию на корнях растений оценивали для бактериальных суспензий с оптической плотностью $A_{600} = 0.1$ при 600 нм. Десятисуточные микрорастения картофеля (*Solanum tuberosum* L. сорт Невский) из культуры *in vitro* на 30 мин погружали в суспензию бактерий, после чего дважды по 10 мин при встряхивании 120 об./мин отмывали в стерильном PBS. Для каждого варианта для анализа отбирали 10 см корней, из которых получали гомогенат в 1 мл стерильного PBS. Готовили серию десятикратных разведений с последующим высевом на агаризованную малатно-солевою среду. Чашки Петри инкубировали в течение 3 сут при

35°C, после чего подсчитывали количество сформированных колоний для различных разведений.

Результаты соотнесения гидрофобности бактериальных клеток с уровнем их адсорбции на корнях микрорастений картофеля приведены на рис. 1.

Установлена прямая зависимость количества прикрепляемых за 30 мин бактерий от индекса гидрофобности. Так, клетки штаммов с гидрофильной поверхностью (*Ensifer adhaerens* T1Ks14 и *Pseudomonas chlororaphis* K3) адсорбировались на корнях в незначительном количестве (менее 10^3 КОЕ на 1 см корня). Для штаммов со слабогидрофобной поверхностью клеток (*Enterobacter ludwigii* K7, *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2, *Azospirillum lipoferum* SR65 и *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02) выявлено до 10^4 КОЕ/см корня. Адсорбция среднегидрофильных штаммов (*Azospirillum brasilense* Sp7 и *Azospirillum lipoferum* SR66) на корнях картофеля была еще выше и составила 1.3×10^4 и 2.2×10^4 КОЕ/см. И максимальное количество КОЕ на корнях было выявлено для штамма с сильногидрофобными клетками (*Azospirillum brasilense* Jm6B2) — 8×10^4 КОЕ/см. Следует отметить, что штаммы *Azospirillum brasilense* Sp7, *A. lipoferum* SR66 и *A. brasilense* Jm6B2 в составе повторяющихся звеньев О-полисахаридов (дополнительные материалы, табл. S1) содержат нестехиометрическое метилирование (Sp7 и Jm6B2) или ацетилирование (SR66) остатков L-рамнозы (Fedonenko et al., 2015), что увеличивает гидрофобность поверхности клеток этих штаммов и повышает адсорбцию на корнях растений.

В литературе описано, что ацетилирование О-полисахарида грамтрицательных ризосферных бактерий снижает активность запуска иммунных реакций растительного партнера при формировании растительно-микробного взаимодействия (Vanasoge et al., 2022). Это может приводить к большей выживаемости адсорбированных на поверхности корней бактерий и, как следствие, к более успешной колонизации растений. В связи с тем, что степень метилирования или ацетилирования О-полисахаридов штаммов IPA7.2, Sp7, Jm6B2 и SR66 составляет от 40 до 65% (Fedonenko et al., 2015; Sigida et al., 2020), мы предполагаем, что в оптимальных условиях культивирования бактерий активность модификации гликанов ниже скорости биосинтеза новых О-полисахаридов. Причинами для этого могут быть как недостаток восстановительных субстратов для модификаций, так и сниженная активность генов профагов. Однако при снижении скорости роста бактериальной культуры из-за неоптимальных или стрессовых условий биосинтез О-полисахарида должен замедляться или останавливаться, что даже при сохранении активности профаговых генов модификации поверхностных гликанов должно приводить к повышению процента модифицированных повторяющихся звеньев.

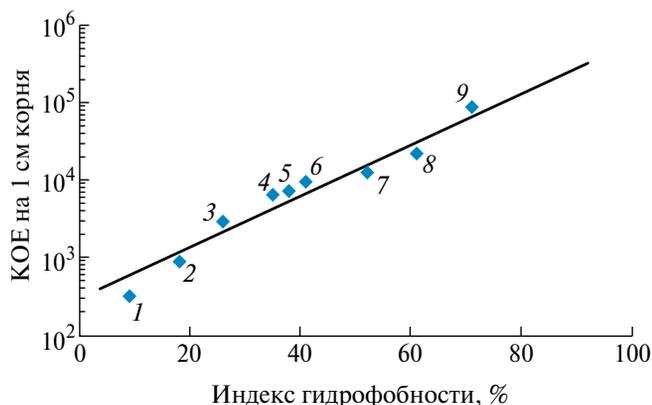


Рис. 1. Зависимость адгезивной активности ризосферных штаммов на корнях картофеля от индекса гидрофобности бактериальных клеток. 1 — *Ensifer adhaerens* T1Ks14; 2 — *Pseudomonas chlororaphis* K3; 3 — *Enterobacter ludwigii* K7; 4 — *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2; 5 — *Azospirillum lipoferum* SR65; 6 — *Ochrobactrum quorumnocens* T1Kr02; 7 — *Azospirillum brasilense* Sp7; 8 — *Azospirillum lipoferum* SR66; 9 — *Azospirillum brasilense* Jm6B2.

Тем более что абиотический стресс может быть активатором генов профагов (Choi et al., 2010). Таким образом, бактерии в оптимальных условиях имеют более гидрофильный О-полисахарид, что снижает адсорбцию микробных клеток на корнях растений, а при контакте с растительными клетками активизирует запуск фитоиммунных реакций, приводящих к подавлению бактериальной колонизации поверхности корней. В стрессовых же для бактерий условиях модификации О-полисахаридов приводят к повышению гидрофобности поверхности клеток, что способствует адсорбции бактерий на корнях и снижает уровень фитоиммунных реакций. В итоге бактериальная колонизация растений проходит более успешно. Информация о генетике и физико-химических свойствах клеток ризосферных штаммов должна учитываться при внедрении ризобактерий в качестве биоудобрений в тех вариантах, когда предполагается прикрепление вегетативных бактериальных клеток к растениям.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность О.В. Ткаченко за предоставление растительного материала микроклонов картофеля из *in vitro*-коллекции кафедры “Растениеводство, селекция и генетика” Агрономического факультета Саратовского государственного университета генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-26-00293).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Матора Л.Ю., Серебренникова О.Б., Петрова Л.П., Бурьгин Г.Л., Щеголев С.Ю. Нетипичный характер R-S диссоциации *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2003. Т. 72. С. 60–63.
 Матора Л.Ю., Серебренникова О.Б., Петрова Л.П., Бурьгин Г.Л., Щеголев С.Ю. Atypical R–S dissociation in *Azospirillum brasilense* // Microbiology (Moscow). 2003. V. 72. P. 48–51.

Alexander C., Rietschel E.T. Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity // J. Endotoxin Res. 2001. V. 7. P. 167–202.

Choi J., Kotay S.M., Goel R. Various physico-chemical stress factors cause prophage induction in *Nitrosospora multiformis* 25196—an ammonia oxidizing bacteria // Water Res. 2010. V. 44. P. 4550–4558.

Fedonenko Y.P., Sigida E.N., Konnova S.A., Ignatov V.V. Structure and serology of O-antigens of nitrogen-fixing rhizobacteria of the genus *Azospirillum* // Russ. Chem. Bull. 2015. V. 64. P. 1024–1031.

Krepesky N., Ferreira R.B.R., Nunes A.P.F., Lins U.G.C., e Silva Filho F.C., de Mattos-Guaraldi A.L., Netto Santos K.R. Cell surface hydrophobicity and slime production of *Staphylococcus epidermidis* Brazilian isolates // Curr. Microbiol. 2003. V. 46. P. 280–286.

Lerouge I., Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions // FEMS Microbiol. Rev. 2002. V. 26. P. 17–47.

Roy K., Ghosh D., DeBruyn J.M., Dasgupta T., Womack K.E., Liang X., Wagner R.E., Radosevich M. Temporal dynamics of soil virus and bacterial populations in agricultural and early plant successional soils // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 1494.

Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Knirel Y.A. Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7 // Carbohydr. Res. 2013. V. 380. P. 76–80.

Sigida E.N., Kargapolova K.Y., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Ponomaryova T.S., Meshcheryakova A.A., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Knirel Y.A. Structure, gene cluster of the O-antigen and biological activity of the lipopolysaccharide from the rhizospheric bacterium *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 154. P. 1375–1381.

Teh M.Y., Furevi A., Widmalm G., Morona R. Influence of *Shigella flexneri* 2a O-antigen acetylation on its bacteriophage Sf6 receptor activity and bacterial interaction with human cells // J. Bacteriol. 2020. V. 202. Art. e00363-20.

Tkachenko O.V., Evseeva N.V., Boikova N.V., Matora L.Y., Burygin G.L., Lobachev Y.V., Shchyogolev S.Y. Improved potato microclonal reproduction with the plant-growth promoting rhizobacteria *Azospirillum* // Agron. Sustain. Develop. 2015. V. 35. P. 1167–1174.

Vanacore A., Vitiello G., Wanke A., Cavasso D., Clifton L.A., Mahdi L., Campanero-Rhodes M.A., Solís D., Wuhrer M., Nicolardi S., Molinaro A. Lipopolysaccharide O-antigen molecular and supramolecular modifications of plant root microbiota are pivotal for host recognition // Carbohydr. Polym. 2022. V. 277. Art. 118839.

Effect of O-Polysaccharide Modifications on Successful Plant Colonization by Bacteria

G. L. Burygin^{1, 2, 3, *}, A. A. Khanina³, and M. V. Filippova³

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

²*Saratov State University, Saratov, 410012 Russia*

³*Saratov State University of Genetics, Biotechnology, and Engineering named after N.I. Vavilov, Saratov, 410012 Russia*
**e-mail: burygingl@gmail.com*

Received October 16, 2023; revised November 7, 2023; accepted November 8, 2023

Abstract—O-polysaccharides of gram-negative bacteria are a highly variable component of the lipopolysaccharide molecules located at the cell wall surface and involved in microbial interaction with plant and animal cells. Activity of prophage genes often results in various non-stoichiometric modifications (methylation, acetylation, etc.) of glycans at bacterial cell surface. The share of modified O-polysaccharides increases during the stationary growth phase and results in increased hydrophobicity of microbial surface. Bacterial cells with different hydrophobicity showed difference in attachment to plant roots. Increased cell hydrophobicity index was found to result in a significant increase in the number of adsorbed microorganisms per unit root length. Thus, acetyl transferase and methyl transferase genes of viral origin may be indirectly involved in successful colonization of plant roots by rhizosphere bacteria.

Keywords: lipopolysaccharide, O-polysaccharide, prophages, acetylation, cell hydrophobicity, PGPR, plant-microbial interactions, bacterial root colonization

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ О-ПОЛИСАХАРИДОВ НА УСПЕШНОСТЬ
БАКТЕРИАЛЬНОЙ КОЛОНИЗАЦИИ РАСТЕНИЙ© 2024 г. Г. Л. Бурьгин^{a, b, c, *}, А. А. Ханина^c, М. В. Филиппова^c^aИнститут биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ “Саратовский научный центр РАН”,
Саратов, 410049, Россия^bСаратовский научно-исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского,
Саратов, 410012, Россия^cСаратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии им. Н.И. Вавилова,
Саратов, 410012, Россия

*e-mail: burygingl@gmail.com

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Федоненко Ю.П., Бойко А.С., Здорovenko Э.Л., Коннова С.А., Шашков А.С., Игнатов В.В., Книрель Ю.А. Структурные особенности О-специфических полисахаридов бактерий *Azospirillum* серогруппы III // Биохимия. 2011. Т. 76. № 7. С. 976–982.

Fedonenko Y.P., Boiko A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Shashkov A.S., Ignatov V.V., Knirel Y.A. Structural peculiarities of the O-specific polysaccharides of *Azospirillum* bacteria of serogroup III // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 797–802.

Boyko A.S., Dmitrenok A.S., Fedonenko Y.P., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Knirel Y.A., Ignatov V.V. Structural analysis of the O-polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Azospirillum brasilense* Jm6B2 containing 3-O-methyl-D-rhamnose (D-acofriose) // Carbohydr. Res. 2012. V. 355. P. 92–95.

Fedonenko Y.P., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Kachala V.V., Ignatov V.V. Structural analysis of the O-antigen of

the lipopolysaccharide from *Azospirillum lipoferum* SR65 // Carbohydr. Res. 2008. V. 343. P. 2841–2844.

Filatov A.V., Perepelov A.V., Shashkov A.S., Burygin G.L., Gogoleva N.E., Khlopko Y.A., Grinev V.S. Structure and genetics of the O-antigen of *Enterobacter cloacae* K7 containing di-N-acetylpsseudaminic acid // Carbohydr. Res. 2021. V. 508. Art. 108392.

Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Konnova S.A., Ignatov V.V., Knirel Y.A. Structural studies of the O-specific polysaccharide(s) from the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* type strain Sp7 // Carbohydr. Res. 2013. V. 380. P. 76–80.

Sigida E.N., Kargapolova K.Y., Shashkov A.S., Zdorovenko E.L., Ponomaryova T.S., Meshcheryakova A.A., Tkachenko O.V., Burygin G.L., Knirel Y.A. Structure, gene cluster of the O antigen and biological activity of the lipopolysaccharide from the rhizospheric bacterium *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 154. P. 1375–1381.

Таблица S1. Структуры повторяющихся олигосахаридных звеньев O-полисахаридов использованных в работе штаммов.

Штамм	Структура повторяющихся звеньев O-полисахарида	Примечание
<i>Ensifer adhaerens</i> T1Ks14	Нет данных	
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> K3	$\begin{array}{c} \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpNAc-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-QuipNAc-(1}\rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow \\ \beta\text{-D-GlcNAc-(1}\rightarrow 3) \end{array}$	Предварительные неопубликованные данные
<i>Enterobacter ludwigii</i> K7	$\rightarrow 8)\text{-}\beta\text{-Psep5Ac7Ac-(2}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow$	Filatov et al., 2021
<i>Ochrobactrum cytisi</i> IPA7.2	$\begin{array}{c} \rightarrow 6)\text{-}\alpha\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-ManpNAcA-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \\ \sim 50\% \text{ 6OAc} \\ \beta\text{-D-Glcp-(1-3)} \\ \text{3OAc} \end{array}$	Sigida et al., 2020
<i>Azospirillum lipoferum</i> SR65	$\begin{array}{c} \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow \\ \beta\text{-D-Glcp-(1-3)} \end{array}$	Fedonenko et al., 2008
<i>Ochrobactrum quorupocens</i> T1Kr02	$\begin{array}{c} \rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Fucf-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Fucp-(1}\rightarrow 2)\text{-}\beta\text{-D-Fucf(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Fucp-(1}\rightarrow \\ \text{OAc} \end{array}$	Предварительные неопубликованные данные
<i>Azospirillum brasiliense</i> Sp7	$\begin{array}{c} \rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-D-GlcpNAc-(1}\rightarrow \alpha\text{-D-Rhap} \\ \text{O}Me \sim 40\% \\ \begin{array}{c} \uparrow \\ \text{O}Me \\ \uparrow \\ \alpha\text{-L-Fucp} \end{array} \end{array}$	Sigida et al., 2013
<i>Azospirillum lipoferum</i> SR66	$\begin{array}{c} \beta\text{-D-Glcp} \\ \downarrow \\ \rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow \\ \text{OAc} \sim 60\text{--}65\% \\ \begin{array}{c} \downarrow \\ \text{OAc} \\ \downarrow \\ \alpha\text{-L-Fucp} \end{array} \end{array}$	Федоненко с соавт., 2011
<i>Azospirillum brasiliense</i> Jm6B2	$\begin{array}{c} \alpha\text{-D-Rhap3OMe} \sim 50\% \\ \begin{array}{c} \downarrow \\ \downarrow \\ \downarrow \end{array} \\ \rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-Fucp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Xylp-(1}\rightarrow \end{array}$	Boyko et al., 2012