

УДК 581.1:581.577:579.6

ЛІПОПОЛІСАХАРИДНИЙ СКЛАД І МЕТАБОЛІЗМ ВУГЛЕВОДІВ ТА ЇХ ПОХІДНИХ КОНТРАСТНИХ ЗА СИМБІОТИЧНИМИ ВЛАСТИВОСТЯМИ ШТАМІВ ТА Tn5-МУТАНТІВ *V. JAPONICUM*

**П.М. МАМЕНКО¹, Г.М. ДРОЗДЕНКО², Н.А. ВОРОБЕЙ¹,
Ю.Ю. КОНДРАТЮК¹, С.Я. КОЦЬ¹,**

¹*Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17*

²*Уманський державний педагогічний університет ім. П.Г. Тичини 20300
Умань, вул. Садова, 2*

У лабораторних умовах досліджували особливості метаболізму вуглеводів та структуру ліпополісахаридного складу штамів і траспозонових мутантів *Bradyrhizobium japonicum* із контрастними симбіотичними властивостями. Показано, що неактивний штам і мутанти активного штаму ризобій сої, які після траспозонового мутагенезу втратили здатність ефективно фіксувати азот, здатні метаболізувати ширший спектр вуглеводвмісних сполук порівняно з активними. При цьому спостерігаються зміни їх ліпополісахаридного складу. Зроблено припущення про можливість використання досліджуваних критеріїв для розробки експрес-методу відбору перспективних штамів бульбочкових бактерій в умовах *ex planta*.

Ключові слова: Tn5-мутанти, ліпополісахариди, вуглеводи, метаболізм, *Bradyrhizobium japonicum*

Вступ

Ліпополісахариди ризобій (ЛПС) – складні біологічні полімери, які містять у своєму складі гідрофобну частину (ліпід А), яка заякорює ЛПС у мембрані мікроорганізму, та гідрофільну ділянку (полісахарид), яка контактує з оточуючим середовищем [14].

Прикладом структури ліпополісахаридів повільно рослих ризобій може бути ЛПС *V. japonicum* USDA 110, полісахаридна частина якого містить

фукозу, ксилозу, арабінозу, манозу, глюкозу, фукозамін, квіновозамін, глюкозамін, уронові кислоти, 2-кето-3-дезоксиктулозонову кислоту, ліпідна частина –манозу і глюкозамін.

Порівняльний аналіз цукрів, що входять до складу ЛПС бульбочкових бактерій сої *Bradyrhizobium japonicum* 634б, люпину *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) 359, 371a, 191 і 400 з різними симбіотичними характеристиками, а також штаму *B. japonicum* 631, який перехресно інфікує і сою, і люпин, показав, що ці штами за якісним складом відрізняються між собою. Найбільш схожими виявилися високоактивні і висококонкурентні штами *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) 359a і 371a. Штами бульбочкових бактерій сої 634б і 631 були також подібними за структурою. *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) 191, який є малоактивним, займав проміжне положення між ЛПС активних люпинових і соєвих штамів. ЛПС *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) 400 (неактивний) значно відрізнявся від інших [9].

Припускається, що, як і Nod-фактори, ЛПС ризобій можуть відігравати роль сигнальної молекули при формуванні бобово-ризобіального симбіозу [15]. При цьому Nod-фактори запускають нодуляцію та інвазивну програму, в той час як ЛПС сприяють продовженню симбіотичної взаємодії і розвитку функціональної азотфіксуючої зони [15].

При цьому значимість ПС у процесі формування бобово-ризобіального симбіозу може істотно відрізнитися у різних видів бульбочкових бактерій [11, 12]. На прикладі мутантних штамів бульбочкових бактерій, які продукували змінені ПС, було показано, що їх найменші структурні відмінності можуть призвести до дефектів у формуванні бобово-ризобіального симбіозу.

Наприклад, структура ЛПС I у *B. japonicum* є визначальною при інфікуванні рослин сої [16]. Було показано, що у ненодулюючого мутанту *B. japonicum* JS314 в структурі високомолекулярної фракції ЛПС – ЛПС I відсутні 2,3-ди-О-метилрамноза, 3-О-метилрамноза, фукоза і квіновозамін. Однак мікроорганізми викликали появу бульбочкоподібних структур, які не

були колонізовані бактеріями та мали локальне розташування відмерлих епідермальних клітин, що вказує на важливість ЛПС I для інфікування сої бактеріями *B. japonicum* [16].

У результаті електрофоретичного розділення ліпополісахаридів *R. leguminosarum* bv. *viciae* показано, що співвідношення ЛПС I до низькомолекулярних ЛПС II було набагато більшим у ефективного штаму в порівнянні з неефективним. [3, 6]. Крім того, було показано, що ЛПС можуть розділятися на два електрофоретично швидких компоненти і один з низькою електрофоретичною рухливістю [3, 6].

Таким чином, вплив структурної організації ЛПС ризобій на ефективність формування функціонування симбіозу є беззаперечним. Проте, мало дослідженими залишаються фактори, які впливають на їх біосинтез і, тим самим, визначають структурні особливості.

Тому мета даної роботи полягала у вивченні в умовах чистої культури особливостей метаболізму вуглеводів штамами та Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* із контрастними симбіотичними властивостями та їх впливу на формування ЛПС профілю ризобій.

Методика

Для проведення аналізу були відібрані штами *B. japonicum* 634б, 646 – високоактивні, 604к – малоактивний і Tn5-мутанти 9-1, 21-2 – високоактивні, 107, 113 - малоактивні, ефективність і симбіотичні характеристики яких попередньо вивчені нами в лабораторних, вегетаційних та польових дослідах [1, 7, 8].

Культури повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на манітно-дріжджовому середовищі протягом 8 діб при температурі 27–28 °С. Кількість клітин у культуральному середовищі вирівнювали за оптичною густиною та доводили до 10^8 кл/мл.

Для дослідження метаболізму вуглеводів та їх похідних грамнегативними мікроорганізмами *V. japonicum* використовували методи експериментальної медичної бактеріології із застосуванням ідентифікаційної тест-системи API.

Для цього мікропробірки стандартних біохімічних тестів системи API 20E інокулювали суспензією бульбочкових бактерій *V. japonicum*, виготовленою на основі 0,85 % фізіологічного розчину (хлорид натрію – 8,5 г, демінералізована вода – 1000 мл). Попередньо перевіряли чистоту культур на наявність сторонньої мікрофлори. Облік результатів проводили після чотирьох діб інкубації бульбочкових бактерій при 28 °С. Здатність бульбочкових бактерій утилізувати той чи інший вуглевод фіксували за зміною кольору індикатора у мікропробірці.

Ліпополісахариди отримували методом [10] та розділяли за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі за методикою Леммлі (12,5 % розділяючий гель) [13]. Після розділення ЛПС візуалізували за допомогою реагенту «PAGE Silver Protein Staining Kit» (Fermentas). Аналіз гелів проводили за допомогою програми Total Lab версії 2.1.

Результати та обговорення

Дослідження здатності ризобій у чистій культурі використовувати вуглеводи показало, що всі активні штами і Tn5-мутанти однаковою мірою здатні засвоювати лише глюкозу, арабінозу, сахарозу та ескулін (табл. 1). Лише Tn5-мутант 9-1, який набув властивості фіксувати азот атмосфери у більш пізній період, порівняно з іншими активними ризобіями [2], додатково метаболізував N-ацетил-глюкозамін.

У той же час мутанти штаму 646 *V. japonicum*107 і 113, які після траспозонового мутагенезу втратили здатність до активної фіксації азоту, крім попередньо перерахованих вуглеводів, використовували як субстрат дисахариди мальтозу і мелібіозу. Крім того, мутант 107 у якості джерела

Таблиця 1

вуглецю досить активно утилізував глікозид амігдалин. Особливістю неактивного штаму 604к, який практично не фіксує атмосферний азот, була здатність до редукування не лише вище зазначених вуглеводів, але й ряду сахароспиртів – сорбітолу, інозітолу, маннітолу та моносахариди рамнози.

Здатність малоактивних ризобій використовувати як субстрат нехарактерні для активних повільнорослих бульбочкових бактерій вуглеводи вказує на наявність у них альтернативних шляхів метаболізму даних сполук, що на нашу думку може обумовлювати полісахаридний склад бактерій, який, у свою чергу, визначає ступінь ефективності взаємодії партнерів симбіозу.

На прикладі бульбочкових бактерій гороху Косенко зі співавторами показано [4, 5], що симбіотичні властивості ризобій – вірулентність, конкурентоспроможність, азотфіксувальна активність – залежать від особливостей хімічного складу та структури екзополісахаридів (ЕПС) і ЛПС штамів ризобій.

Тому наступним етапом наших досліджень була перевірка особливостей складу ЛПС високо- та малоактивних штамів і транспозонових мутантів *V. jaronicum*.

Рис. 1

Електрофоретичні дослідження структури ЛПС штамів і Tn5-мутантів *V. jaronicum* проводили у фазу інтенсивного розмноження ризобій (5-та доба росту культури) та в період виходу культури у стаціонарну фазу розвитку (9-та доба) (рис. 1. 2).

Рис. 2

При аналізі кількісного співвідношення отриманих ЛПС було відмічено, що їх вміст у клітинах бульбочкових бактерій сої є різним. Клітини малоактивних ризобій містили приблизно удвічі меншу кількість ЛПС, порівняно із високоактивними штамми і транспозоновими мутантами. Найбільша кількість полісахаридів була характерна для вихідного штаму 646 та його активних мутантів 9-1 та 21-2, а найменша – для штаму 604к, який у симбіозі характеризувався низькою азотфіксувальною активністю.

У результаті проведених нами досліджень показано, що ЛПС ризобій сої чітко поділяються на дві зони – високомолекулярну (ЛПС I), і

низькомолекулярну (ЛПС II). Кожна зона містила 3 електрофоретично рухливих компоненти. При цьому якщо у зоні ЛПС I домінував компонент із найбільшою молекулярною масою, то у зоні ЛПС II – з найменшою. Необхідно зауважити, що у ризобій сої співвідношення ЛПС I до ЛПС II було однаковим і не залежало від ефективності азотфіксації мікроорганізмом.

За результатами електрофорезу ЛПС 5-добових культур ризобій сої (рис. 1) встановлено подібність кількісного і якісного складу ЛПС I та ЛПС II у активних штамів і мутантів. Неактивний штам 604к і малоактивні мутанти 107 та 113 *B. japonicum* відрізнялись від активних ризобій за структурою ЛПС. Крім того, кожен із них відзначався характерними особливостями будови ліпополісахаридів. Так, у штаму 604к був відсутній середній компонент у зоні ЛПС I, а у мутантів 107 і 113 – легкий компонент даної зони. У всіх трьох досліджуваних малоактивних ризобій у зоні ЛПС II був відсутній середній компонент.

Ймовірно, що у період активного поділу клітин (5 доба) не всі компоненти ліпополісахаридного складу можуть бути повністю сформовані. Тому нами проведено електрофоретичне розділення ЛПС у період виходу культури на стаціонарну фазу розвитку (9 доба).

Так, показано (рис. 2), що структура зони ЛПС I усіх досліджуваних штамів і Tn5-мутантів на 9 добу розвитку культури була схожою. Проте профіль зони ЛПС II досліджуваних ризобій відрізнявся. Активні мутанти 21-2 і 9-1 мали однаковий вміст легкого та важкого компонентів на відміну від штамів 634б і 646, у яких легкий компонент був у більшій кількості. У неактивного штаму і малоактивних мутантів спостерігали відмінності в зоні ЛПС II, яка, як уже було відмічено, відповідає за ефективність симбіотичної взаємодії і розвиток функціональної азотфіксуючої зони. Так, у штаму 604к був відсутній середній компонент. На відміну від результатів досліджень 5-добової культури у малоактивних мутантів на 9-ту добу з'являвся середній компонент зони ЛПС II і її профіль відповідав будові зони ЛПС II у високоактивних штамів. Разом із тим, за кількісним вмістом ЛПС

малоактивні мутанти 107 та 113 були більше схожі до неактивного штаму 604к, ліпополісахаридні профілі якого за відношенням до активних штамів і мутантів характеризувалися меншим вмістом як ЛПС I, так і ЛПС II.

Таким чином, отримані результати дозволяють припустити, що точкові мутації геному бульбочкових бактерій сої призводять до суттєвих змін у їх здатності метаболізувати вуглеводи, внаслідок чого може порушуватися структура ліпополісахаридного складу мікросимбіонта і знижуватись ефективність його симбіотичної взаємодії з рослиною-хазяїном. Підтвердженням цього слугує той факт, що набір вуглеводів, які здатні засвоювати активні ризобії, а також якісний і кількісний склад їх ліпополісахаридів є ідентичним. У той же час ліпополісахаридні профілі неактивного штаму 604к і малоактивних мутантів 107 і 113 та спектр засвоєваних ними вуглеводів є індивідуальними для кожного з вказаних мікроорганізмів. На нашу думку при вивченні ширшого спектру мікросимбіонтів із контрастними симбіотичними характеристиками, відзначені критерії можуть бути потенційними маркерами ефективності штамів бульбочкових бактерій.

Список літератури

1. Дрозденко Г.М., Маменко П.М., Маліченко С.М., Коць С.Я. Особливості білкового складу штамів і Tn5-мутантів *Bradyrhizobium japonicum* різної активності // Физиология и биохимия культ. растений. – 2009. – **41**, № 5. – С. 423 – 429.
2. Дрозденко Г.М., Маменко П.М., Коць С.Я. Активність окисно-відновних ферментів і білковий склад коренів сої у період формування та на початку функціонування симбіотичних систем соя – *Bradyrhizobium japonicum* // Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 1 (28). – С. 18-26.

3. Ковалевская Е.М., Косенко Л.В., Воцелко С.К. Гетерогенность липополисахаридов *Rhizobium leguminosarum*// Микробиол. журн. – 1984. – **46**, № 6. –С. 14–18.
4. Косенко Л.В., Пацева М.А., Захарова И.Я. Моносахаридный состав поверхностно локализованных полисахаридов клубеньковых бактерий гороха // Микробиология. – 1990. – **59**, № 2. – С. 289–293.
5. Косенко Л.В. Лектин-углеводные взаимодействия клубеньковых бактерий кормовых бобов и *Vicia faba* как фактор специфичности и эффективности их симбиоза // Микробиология. – 1992. – **61**, № 6. –С. 1043–1050.
6. Косенко Л.В. Функціональна роль полісахаридів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* в бобово-ризобіальному симбіозі: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. –К., 1995. – 50 с.
7. Коць С.Я., Маліченко С.М., Маменко П.М., Дрозденко Г.М. Перспективність використання Tn5-мутантів ризобій при виготовленні бактеріальних добрив // Сільськогосподарська мікробіологія. – 2008. – Вип. 8. – С. 32 – 38.
8. Маменко П.М., Коць С.Я., Дрозденко Г.М., Жемойда А.В. Білковий склад бульбочок сої, інокульованої штамми та Tn5-мутантами *Bradyrhizobium japonicum* різної ефективності // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – **40**, № 6. – С. 525–531.
9. Мельникова Н.М. Фактори, що визначають розпізнавання партнерів зрізними симбіотичними властивостями при формуванні азотфіксувальних систем: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. –К., 1998. – 16 с.
10. de Maagd R, van Rossum C, Lugtenberg B.J. Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides // J.Bacteriol. – 1988. – **170**, № 8. – P. 3782–3785.
11. Fraysse N., Couderc F., Poinsot V. Surface polysaccharide in volvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis // Eur. J. Biochem. – 2003. – **270**. – P. 1365–1380.

12. *Hotter G.S., Scott D.B.* Exopolysaccharide mutants of *Rhizobium loti* are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminate nodulating host // *J. Bacteriol.* – 1991. – **173**. – P. 851–859.
13. *Laemmly U.K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**. – P. 680–685.
14. *Lugtenberg B., van Alphen L.* Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *E. coli* and other Gram-negative bacteria // *BBA.* – 1983. – **737**. – P. 51–115.
15. *Mathis R., Van Gijsegem F., De Rycke R., D'Haese W.* Lipopolysaccharides as a communication signal for progression of legume endosymbiosis // *PNAS.* – 2005. – **102**, N 7. – P. 2655–2660.
16. *Stacey G., So J.S., Roth L.E., Lakshmi S.K.B, Carlson R.W.* A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation // *MPMI.* – 1991. – **4**, N 4. – P. 332–340.

ЛИПОПОЛИСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ И МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ КОНТРАСТНЫХ ЗА СИМБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ШТАММОВ И Tn5-МУТАНТОВ *V. JAPONICUM*

П.Н. МАМЕНКО¹, Г.Н. ДРОЗДЕНКО², Н.А. ВОРОБЕЙ¹, Ю.Ю. КОНДРАТЮК¹, С.Я. КОЦЬ¹,

¹*Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины 03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17*

²*Уманський державний педагогічний університет ім. П.Г. Тичини 20300 Умань, ул. Садовая, 2*

В лабораторних умовах досліджували особливості метаболізму вуглеводів і структуру ліпополісахаридного складу штамів і транспозонових мутантів *Bradyrhizobium japonicum* із контрастними симбіотическими властивостями. Показано, що неактивний штам і мутанти активного штаму ризобій сої, які після транспозонового мутагенезу втратили здатність ефективно фіксувати азот, здатні метаболізувати більш широкий спектр вуглеводосодержащих сполучень в порівнянні з активними. При цьому спостерігаються зміни їх ліпополісахаридного складу. Зроблено припущення про можливість використання досліджуваних критеріїв для розробки експрес-методу відбору перспективних штамів клубенькових бактерій в умовах *ex planta*.

Ключевые слова: Tn5-мутанти, ліпополісахариди, вуглеводи, метаболізм, *Bradyrhizobium japonicum*

LIPOPOLYSACCHARIDE COMPOSITION AND CARBOHYDRATE METABOLISM AND THEIR DERIVATIVES CONTRAST OF PROPERTIES SIMBIOTICHESKIMI STRAINS AND TN5-MUTANTS OF *B. JAPONICUM*

P.M. MAMENKO¹ , G.M. DROZDENKO², N.A. VOROBEJ¹, YU. YU. KONDRATJUK¹, S.YA. KOTS¹

¹*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine 31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine*

²*Pavlo Tychyna Uman State Pedagogical University 2 Sadova Str. Uman, Cherkasy Region, 20300, Ukraine*

The features of carbohydrate metabolism and the structure of lipopolysaccharide composition of strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with symbiotic contrasting properties were studied in the laboratory. It was shown that inactive strain and active strain mutants of soybean nodule bacteria which lost the capacity of fixing nitrogen effectively after Tn5-mutagenesis can metabolize a wider range of carbohydrate compounds comparing to active. We can also observe the changes in their lipopolysaccharide composition. The assumption about the opportunity of using the experimented criteria for creating the express-method of selection of promising strains of rhizobia in ex planta conditions was made.

Keywords: Tn5-mutants, lipopolysaccharide, carbohydrate, metabolism, *Bradyrhizobium japonicum*