

УДК 581.1:581.577:579.6

ЛІПОПОЛІСАХАРИДНИЙ СКЛАД І МЕТАБОЛІЗМ ВУГЛЕВОДІВ У Контрастних за симбіотичними властивостями штамів і Tn5-мутантів *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

П.М. МАМЕНКО¹, Г.М. ДРОЗДЕНКО², Л.Ю. СОБОЛЕНКО², Н.А. ВОРОБЕЙ¹, Ю.Ю. КОНДРАТЮК¹

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

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

У лабораторних умовах досліджували особливості метаболізму вуглеводів, склад ліпополісахаридів у штамів і транспозонових мутантів *Bradyrhizobium japonicum* із контрастними симбіотичними властивостями. Встановлено, що неактивний штам і мутанти активного штаму ризобій сої, які після транспозонового мутагенезу втратили здатність ефективно фіксувати азот, метаболізують ширший спектр вуглеводовмісних сполук порівняно з активними. При цьому їх ліпополісахаридний склад різнився. Зроблено припущення про можливість використання досліджених критеріїв для розробки експрес-методу добору перспективних штамів бульбочкових бактерій в умовах *ex planta*.

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

Ліпополісахариди (ЛПС) ризобій — складні біологічні полімери, до складу яких входить гідрофобна частина (ліпід А), що закріплює ЛПС у мембрані мікроорганізму, та гідрофільна ділянка (полісахарид), яка контактує з довколишнім середовищем [14].

Прикладом структури ліпополісахаридів повільнорослих ризобій може бути ЛПС *B. japonicum* USDA 110, полісахаридна частина якого містить фукозу, ксилозу, арабінозу, манозу, глюкозу, фукозамін, хіновозамін, глюкозамін, уронові кислоти, 2-кетоглюкозу, 2-кетоглюкозу, 2-кетоглюкозу, ліпідна частина — манозу і глюкозамін.

Порівняльним аналізом цукрів, що входять до складу ЛПС бульбочкових бактерій сої *B. japonicum* 634б, люпину *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 359а, 371а, 191 і 400 з різними симбіотичними характеристиками, а також штаму *B. japonicum* 631, який перехресно інфікує і сою, і люпин, доведено, що ці штами відрізняються за якісним складом. Найподібнішими виявились високоактивні й висококонкурентні штами *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 359а і 371а. Штами бульбочкових бактерій сої 634б і 631 подібні за складом. Малоактивний *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 191 займав проміжне положення між ЛПС активних люпинових і соєвих штамів. Неактивний ЛПС *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) 400 значно відрізнявся від інших [9].

Зроблено припущення, що ЛПС ризобій, як і Nod-фактори, можуть відігравати роль сигнальних молекул при формуванні бобово-ризобіаль-

ного симбіозу [15]. При цьому Nod-фактори запускають нодуляцію та інвазивну програму, а ЛПС сприяють продовженню симбіотичної взаємодії і розвитку функціональної азотфіксувальної зони [15].

Значущість полісахаридів (ПС) у процесі формування бобово-ризобіального симбіозу може істотно відрізнятись у різних видів бульбочкових бактерій [11, 12]. На прикладі мутантних штамів бульбочкових бактерій, які продукували змінені ПС, доведено, що їх найменші структурні відмінності здатні призвести до дефектів у формуванні бобово-ризобіального симбіозу.

Наприклад, структура ЛПС I у *B. japonicum* є визначальною при інфікуванні рослин сої [16]. Установлено, що в ненодулювального мутанта *B. japonicum* JS314 у структурі високомолекулярної фракції ЛПС I відсутні 2,3-ди-О-метилрамноза, 3-О-метилрамноза, фукоза і хіновозамін. Ці мікроорганізми викликали появу бульбочкоподібних структур, які не були колонізовані бактеріями і мали локальне розміщення відмерлих епідермальних клітин, що вказує на важливість ЛПС I для інфікування сої бактеріями *B. japonicum* [16].

У результаті електрофоретичного розділення ЛПС *R. leguminosarum* bv. *viciae* показано, що співвідношення ЛПС I і низькомолекулярних ЛПС II набагато більше в ефективного штаму порівняно з неефективним [3, 6]. Крім того, було доведено, що ЛПС можуть розділятися на два електрофоретично швидкі компоненти й один — з низькою електрофоретичною рухливістю [3, 6].

Отже, вплив структурної організації ЛПС ризобій на ефективність формування і функціонування симбіозу є беззаперечним. Проте малодослідженими залишаються чинники, які впливають на їх біосинтез і тим самим визначають структурні особливості.

Метою нашої роботи було вивчення в умовах чистої культури особливостей метаболізму вуглеводів штамми й 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 [2, 7, 8].

Культури повільнорослих бульбочкових бактерій вирощували на манітно-дріжджовому середовищі протягом 8 діб за температури 27—28 °С. Кількість клітин у культуральному середовищі вирівнювали за оптичною густиною й доводили до 10⁸ кл/мл.

Метаболізм вуглеводів та їхніх похідних грамнегативними мікроорганізмами *B. japonicum* досліджували методами експериментальної медичної бактеріології із застосуванням ідентифікаційної тест-системи АРІ. Для цього мікропробірки стандартних біохімічних тестів системи АРІ 20Е інокулювали суспензією бульбочкових бактерій *B. japonicum*, виготовленою на основі 0,85 %-го фізіологічного розчину (хлорид натрію — 8,5 г, демінералізована вода — 1000 мл). Попередньо перевіряли чистоту культур на наявність побічної мікрофлори. Результати визначали після 4 діб інкубації бульбочкових бактерій за 28 °С. Здатність бульбоч-

кових бактерій утилізувати той чи інший вуглевод фіксували за зміною кольору індикатора у мікропробірці.

Ліпополісахариди отримували методом [10], розділяли електрофорезом у поліакриламідному гелі за методикою Леммлі (12,5 %-й гель) [13]. Після розділення ЛПС візуалізували реагентом «PAGE Silver Protein Staining Kit» (Fermentas). Гелі аналізували за програмою TotalLab версії 2.1.

Результати та обговорення

Дослідження здатності ризобій у чистій культурі використовувати вуглеводи показало, що всі активні штами і Tn5-мутанти однаковою мірою засвоюють лише глюкозу, арабінозу, сахарозу та ескулін (таблиця). Лише Tn5-мутант 9-1, який набуває здатності фіксувати азот атмосфери у пізніший період порівняно з іншими активними ризобіями [1], додатково метаболізував N-ацетилглюкозамін.

Мутанти штаму 646 *B. japonicum* 107 і 113, які після транспозонового мутагенезу втратили здатність до активної фіксації азоту, крім перелічених вище вуглеводів використовували як субстрат дисахариди мальтозу і мелібіозу. Мутант 107 як джерело вуглецю доволі активно утилізував також глікозид амідгалактин. Особливістю неактивного штаму 604к, який практично не фіксував атмосферного азоту, була здатність до засвоєння не лише вищезазначених вуглеводів, а й низки сахароспиртів — сорбітолу, інозитолу, манітолу та моносахариду рамнози.

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

На прикладі бульбочкових бактерій гороху Косенко та співавт. [4, 5] показали, 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 *B. japonicum*.

Електрофоретичні дослідження складу ЛПС штамів і Tn5-мутантів *B. japonicum* проводили у фазу інтенсивного розмноження ризобій (5-та доба росту культури) та в період виходу культури на стаціонарну фазу розвитку (9-та доба) (рисунок).

Під час аналізу кількісного співвідношення отриманих ЛПС виявлено, що їх вміст у клітинах бульбочкових бактерій сої різний. Клітини малоактивних ризобій містили приблизно вдвічі меншу кількість ЛПС порівняно із високоактивними штамами і транспозоновими мутантами. Найбільша кількість полісахаридів була характерна для вихідного штаму 646 та його активних мутантів 9-1, 21-2, найменша — для штаму 604к, який у симбіозі виявляв низьку азотфіксувальну активність.

У результаті проведених нами досліджень встановлено, що ЛПС ризобій сої чітко поділяються на дві зони: високомолекулярну (ЛПС I) і низькомолекулярну (ЛПС II). Кожна зона містила по три електрофоретично рухливих компоненти. При цьому у зоні ЛПС I домінував компо-

Метаболізація вуглеводів та їхніх похідних ітамами й Th5-мутантами В. жарописит

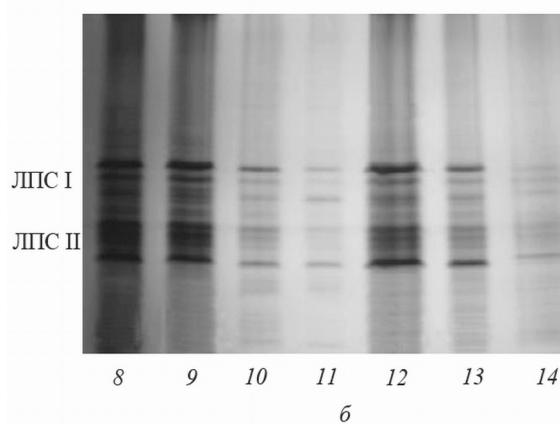
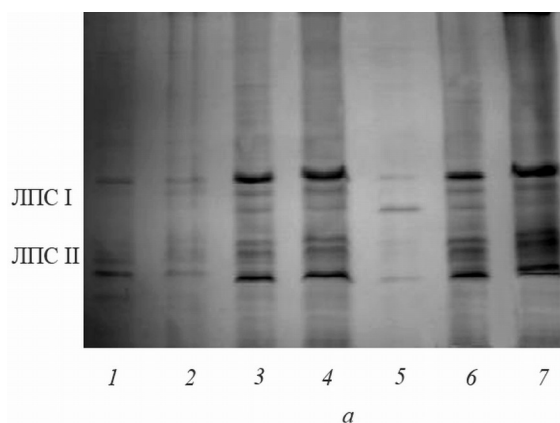
Штам, Th5- мутант	Моносахарид			Дисахарид			Похідні цукрів						
	Глюкоза	Арабіно- за		Рамноза	Мальто- за	Сахароза	Мелібіо- за	Амігдалин	Ескулін	N- Ацетил- глюко- замін	Манітол	Інозитол	Сорбітол
		Галактоза	Фукоза										
6346	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
646	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
604к	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
21-2	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
9-1	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
107	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
113	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Примітка. «+» — позитивна реакція, «-» — негативна реакція.

нент із найбільшою молекулярною масою, а в зоні ЛПС II — з найменшою. Слід зауважити, що у ризобій сої співвідношення ЛПС I і ЛПС II було однаковим і не залежало від ефективності азотфіксації мікроорганізмом.

Згідно з результатами електрофорезу ЛПС 5-добових культур ризобій сої (див. рисунок, а), кількісний і якісний склад ЛПС I та ЛПС II в активних штамів і мутантів подібний. Неактивний штам 604к і малоактивні мутанти 107, 113 *B. japonicum* відрізнялись від активних ризобій за спектром ЛПС. Крім того, кожен із них мав характерні особливості спектра ЛПС. Так, у штаму 604к був відсутній середній компонент у зоні ЛПС I, у мутантів 107 і 113 — легкий компонент цієї зони. В усіх трьох досліджуваних малоактивних ризобій у зоні ЛПС II був відсутній середній компонент.

Ймовірно, що в період активного поділу клітин (5-та доба) не всі компоненти ліпополісахаридного складу повністю сформовані. Тому ми провели електрофоретичне розділення ЛПС у період виходу культури на стаціонарну фазу розвитку (9-та доба). Встановлено (див. рисунок, б), що спектри зони ЛПС I усіх досліджуваних штамів і Tn5-мутантів на 9-ту добу розвитку культури були подібними, а спектри зони ЛПС II досліджуваних ризобій відрізнялися. Активні мутанти 21-2, 9-1 мали однаковий вміст легкого й важкого компонентів на відміну від штамів 634б, 646, у яких легкого компонента було більше. В неактивного штаму і малоактивних мутантів спостерігали відмінності в зоні ЛПС II, що, як уже зазначалось, відповідають за ефективність симбіотичної взаємодії і розвиток функціональної азотфіксувальної зони. Так, у штаму 604к був відсутній середній компонент. На відміну від результатів досліджень 5-добової культури в малоактивних мутантів на 9-ту добу з'являвся середній компонент зони ЛПС II, а її профіль був подібним до зони ЛПС II у високоактивних штамів. Разом з тим за кількісним вмістом ЛПС малоактивні мутанти 107, 113 були більш подібними до неактивного



Електрофореграми ліпополісахаридів, екстрагованих із культуральних клітин штамів і Tn5-мутантів бульбочкових бактерій *Bradyrhizobium japonicum*:

а — 5-добова культура; б — 9-добова культура; штам: 634б (7, 13), 646 (3, 12); 604к (5, 11), Tn5-мутанти: 21-2 (4, 9); 9-1 (6, 8); 107 (1, 10); 113 (2, 14)

штаму 604к, ліпополісахаридні профілі якого за відношенням до активних штамів і мутантів характеризувались меншим вмістом як ЛПС I, так і ЛПС II.

Отже, отримані результати дають підставу припустити, що точкові мутації геному бульбочкових бактерій сої істотно змінюють їх здатність метаболізувати вуглеводи, внаслідок чого може порушуватись структура ліпополісахаридного складу мікосимбіонта, знижуватись ефективність його симбіотичної взаємодії з рослиною-хазяїном. Це підтверджує той факт, що набір вуглеводів, здатних засвоюватися активними ризобіями, а також якісний і кількісний склад їх ліпополісахаридів однакові. Водночас ліпополісахаридні спектри неактивного штаму 604к і малоактивних мутантів 107, 113 та набір засвоєваних ними вуглеводів є індивідуальними для кожного із зазначених мікроорганізмів. На нашу думку, при вивченні ширшого спектра мікосимбіонтів із контрастними симбіотичними характеристиками вказані критерії можуть бути потенційними маркерами ефективності штамів бульбочкових бактерій.

1. 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. аграр. ун-ту. Сер. Біологія. — 2013. — Вип. 1 (28). — С. 18—26.
2. 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.
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. Лектин-углеводные взаимодействия клубеньковых бактерий кормовых бобов и *Vicia faba* как фактор специфичности и эффективности их симбиоза // Микробиология. — 1992. — 61, № 6. — С. 1043—1050.
5. Косенко Л.В., Пацева М.А., Захарова И.Я. Моносахаридный состав поверхностно локализованных полисахаридов клубеньковых бактерий гороха // Там же. — 1990. — 59, № 2. — С. 289—293.
6. Косенко Л.В. Функціональна роль полісахаридів *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* в бобово-ризобіальному симбіозі: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — Київ, 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 // С.-г. 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 з різними 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, N 8. — P. 3782—3785.
11. Fraysse N., Couderc F., Poinsot V. Surface polysaccharide involvement 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 USA. — 2005. — 102, N 7. — P. 2655—2660.

16. Stacey G., So J.S., Roth L.E. et al. A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation // Mol. Plant-Microbe Interact. — 1991. — 4, N 4. — P. 332–340.

Отримано 28.05.2013

ЛИПОПОЛИСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ И МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ У
КОНТРАСТНЫХ ПО СИМБИОТИЧЕСКИМ СВОЙСТВАМ ШТАММОВ
И Tn5-МУТАНТОВ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*

П.Н. Маменко¹, Г.Н. Дрозденко², Л.Ю. Соболенко², Н.А. Воробей¹, Ю.Ю. Кондратюк¹

¹Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины,
Киев

²Уманский государственный педагогический университет им. П.Г. Тычины

В лабораторных условиях исследовали особенности метаболизма углеводов, состав липополисахаридов у штаммов и транспозоновых мутантов *B japonicum* с контрастными симбиотическими свойствами. Установлено, что неактивный штамм и мутанты активного штамма ризобий сои, которые после транспозонового мутагенеза потеряли способность эффективно фиксировать азот, метаболизируют более широкий спектр углеводсодержащих соединений по сравнению с активными. При этом их липополисахаридный состав различался. Сделано предположение о возможности использования исследованных критериев для разработки экспресс-метода отбора перспективных штаммов клубеньковых бактерий в условиях ex planta.

LIPOPOLYSACCHARIDE COMPOSITION AND METABOLISM OF CARBOHYDRATES
AND THEIR DERIVATIVES OF STRAINS AND Tn5-MUTANTS OF *BRADYRHIZOBIUM
JAPONICUM* WITH CONTRASTING SYMBIOTIC PROPERTIES

P.M. Mamenko¹, G.M. Drozdenko², L.Yu. Sobolenko², N.A. Vorobey¹, Yu.Yu. Kondratiuk¹

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

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

The features of carbohydrate metabolism and the composition of lipopolysaccharides of strains and Tn5-mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with contrasting symbiotic properties were studied. It was shown that inactive strain and mutants of active strain of soybean rhizobia which in result of Tn5-mutagenesis lost the capacity to fix nitrogen effectively can to metabolize a wider range of carbohydrate compounds comparing to active. Their lipopolysaccharide composition differed also. It was made the assumption about the possibility of using the investigated criteria for creating the express-method of selection of perspective nodule bacteria strains in ex planta conditions.

Key words: *Bradyrhizobium japonicum*, Tn5-mutants, lipopolysaccharides, carbohydrates, metabolism.