



ИССЛЕДОВАНИЕ МАЖОРНЫХ АНТИГЕНОВ КЛЕТочНОЙ ПОВЕРХНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА *AZOSPIRILLUM* И ИХ ВКЛАД В РАСТИТЕЛЬНО-МИКРОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Бурыгин Г.Л., Матора Л.Ю., Евсеева Н.В., Широков А.А., Красов И.А.,
Филиппьчева Ю.А., Буданова А.А., Попова И.А., Щеголев С.Ю.

Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН
410049, Саратов, просп. Энтузиастов 13, email: burygingl@gmail.com

Резюме

Структура и свойства поверхностных антигенов ризосферных бактерий составляют основной предмет исследований лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН с использованием антител к белковым и углеводным бактериальным структурам – ключевым участникам растительно-микробных взаимодействий при ассоциативном симбиозе в ризосфере растений. Получены антитела к поверхностным структурам 27 штаммов 11 видов 7 родов ассоциативных бактерий. Для ряда штаммов *Azospirillum* продемонстрирована структурная и антигенная гетерогенность их О-антигена, показано отсутствие индивидуального антигена капсулы. С 74 штаммами данного рода разработана тест-система серотипирования азоспирилл. В составе гликозилированного флагеллина полярного жгутика типового штамма *Azospirillum brasilense* Sp7 установлено наличие нескольких полисахаридных цепей, иммунохимически идентичных липополисахариду данных бактерий. На основе иммуноферментного анализа проведено изучение распространенности азоспирилл в образцах почв, оценена динамика численности интродуцированных в почву бактерий и выявлено наличие антигенов азоспирилл в течение вегетативного сезона в 6 типах почв Саратовской области. Охарактеризована способность штаммов к колонизации корней растений, выявлены стимулирующие эффекты бактерий и их изолированных поверхностных компонентов на растения по морфометрическим и цитологическим показателям. Показан и оценён вклад липополисахарида, флагеллина и белковых пилеподобных структур азоспирилл в бактериальную колонизацию растений и индукцию рост-стимулирующих эффектов. Проводятся работы по выделению и идентификации новых ризосферных бактериальных штаммов-симбионтов растений (представителей родов *Enterobacter*, *Ochrobactrum*, *Ensifer*, *Acinetobacter*, *Kocuria* и др.) с оценками их рост-стимулирующего потенциала.

Ключевые слова: *Azospirillum*; растительно-микробные взаимодействия; ассоциативный симбиоз; углеводные и белковые антигены; пилеподобные структуры; бактериальная колонизация; рост-стимулирующие эффекты.

Цитирование: Бурыгин Г.Л., Матора Л.Ю., Евсеева Н.В., Широков А.А., Красов И.А., Филиппьчева Ю.А., Буданова А.А., Попова И.А., Щеголев С.Ю. Исследование мажорных антигенов клеточной поверхности бактерий рода *Azospirillum* и их вклад в растительно-микробные взаимодействия. *Биомика*. 2018. Т.10(2). С. 169-174. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-23

MAJOR ANTIGENS IN THE CELL SURFACE OF *AZOSPIRILLUM* BACTERIA AND THEIR CONTRIBUTION TO PLANT-MICROBE INTERACTIONS

Burygin G.L., Matora L.Yu., Evseeva N.V., Shirokov A.A., Krasov A.I.,
Filip'cheva Yu.A., Budanova A.A., Popova I.A., Shchyogolev S.Yu.

Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences
13 Prospekt Entuziastov, 410049, Saratov, Russia. Email: burygingl@gmail.com

Resume

Structure and properties of the surface antigens of rhizosphere bacteria is the major scope of research of the IBPPM RAS Laboratory of Immunochemistry. We use antibodies raised to bacterial protein and carbohydrate structures – the surface structures of 27 strains belonging to 11 species of 7 genera of associative bacteria – that play a key part in associative plant-microbe interactions in the plant rhizosphere. While using a variety of *Azospirillum* strains, we showed that their O antigens were structurally and antigenically heterogeneous and several *Azospirillum* strains lacked an individual capsular antigen. We developed a test system for *Azospirillum* serotyping with the use of 74 *Azospirillum* strains. Glycosylated flagellin of the polar flagellum from *A. brasilense* type strain Sp7 was shown to contain several polysaccharide chains that are immunochemically identical to the lipopolysaccharide of this bacterium. Enzyme-linked immunosorbent assay was used as the basis for analyzing the occurrence of *Azospirillum* in soil samples, allowing us to assess the population dynamics of soil-introduced bacteria and to detect *Azospirillum* antigens in six types of soil in Saratov Oblast during the vegetative season. The strains' abilities to colonize plant roots were assessed. Plants' morphometric and cytological variables were used to detect promoting effect of bacteria and their isolated surface components. We showed the contribution of *Azospirillum* lipopolysaccharide, flagellin, and proteinaceous pilus-like structures to the bacterial colonization of plants and to the induction of growth promotion. We are now isolating and identifying new rhizospheric strains that engage in symbiosis with plants (members of the genera *Enterobacter*, *Ochrobactrum*, *Ensifer*, *Acinetobacter*, *Kocuria*, etc.), with assessment of their growth-promoting potential.

Keywords: *Azospirillum*; plant-microbe interactions; associative symbiosis; carbohydrate and protein antigens; pilus-like structures; bacterial colonization; plant growth promoting effects.

Citation: Burygin G.L., Matora L.Yu., Evseeva N.V., Shirokov A.A., Krasov A.I., Filip'echeva Yu.A., Budanova A.A., Popova I.A., Shchyogolev S.Yu. Major antigens in the cell surface of *Azospirillum* bacteria and their contribution to plant-microbe interactions. *Biomics*. 2018. V.10(2). P. 169-174. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-23 [In Russian]

Литературные данные и наши результаты изучения структуры и свойств поверхностных антигенов ризосферных бактерий позволяют констатировать высокую эффективность иммунохимического анализа не только в традиционной для него области биомедицинских исследований, но также и для изучения фундаментальных основ взаимодействий между растениями и почвенными микроорганизмами, участниками других коммуникаций, представляющих интерес для биотехнологии, ветеринарии и др. Его главным инструментом являются высоко специфичные антитела (Ат), получению которых, начиная с работы [Матора и др. (Matora et al.), 1998], посвящен ряд наших исследований, в том числе с применением нанобиотехнологий [Dykman, Khlebtsov, 2017]. В них используются активные взаимодействия с клетками иммунной системы конъюгатов наночастиц с различными антигенами, проявляющиеся, в частности, в обнаруженных адьювантных свойствах коллоидного золота [Dykman et al., 2010]. Этот эффект находит применение, прежде всего, для решения проблем получения Ат на слабоиммуногенные бактериальные, растительные и

животные антигены, но имеет также перспективу в развитии нанобиотехнологий получения вакцин нового поколения [Dykman, Khlebtsov, 2017].

В настоящее время мы располагаем Ат к поверхностным компонентам 27 штаммов 11 видов 7 родов ассоциативных бактерий – белковым и углеводным бактериальным структурам, выполняющим ключевую роль в растительно-микробных взаимодействиях на стадии формирования и функционирования ассоциативного симбиоза в ризосфере растений. Разработанная серологическая тест-система [Bogatyrev et al., 1992] обеспечивает создание системы серотипирования *Azospirillum*, на данном этапе с 74 штаммами бактерий этого рода, распределенными по трем серогруппам. Изучаются корреляции серологических данных с результатами анализа химического строения О-специфического полисахарида [Сигида и др. (Sigida et al.), 2014], таксономическими характеристиками штаммов [Щеголев (Shchyogolev), 2018], что может стать важным этапом их системного анализа, отражающим связь установленных фено(серо)типов с эволюционной историей бактерий рода азоспирилл.

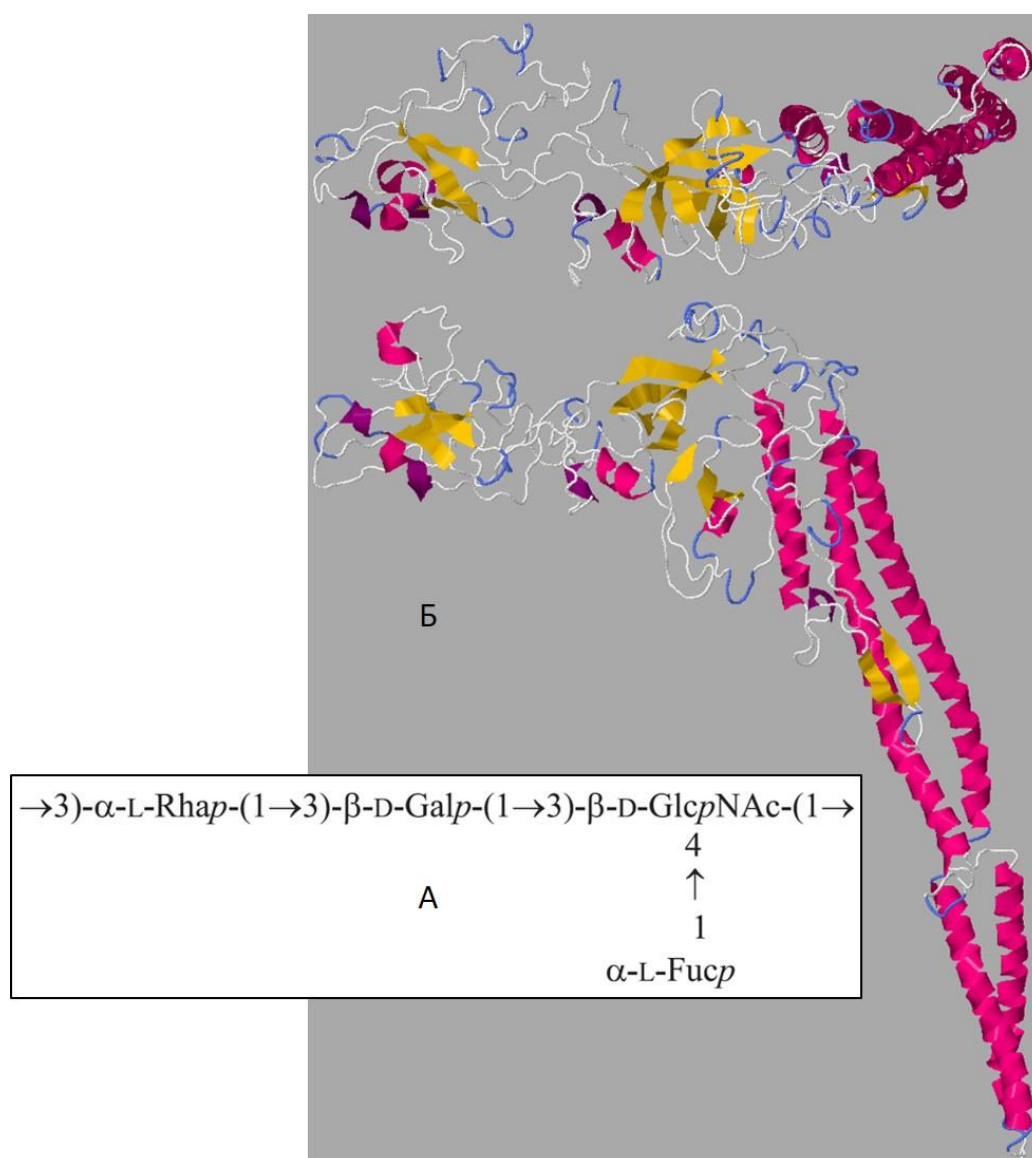


Рис. 1. Структура повторяющегося звена полисахаридного фрагмента (А) [Belyakov et al., 2012] и фолдинг полипептидной основы (Б) флагеллина полярного жгутика *A. brasilense* Sp7.
 Fig. 1. Structure of the repeating unit of the polysaccharide fragment (A) [Belyakov et al., 2012] and the main polypeptide chain folding (Б) of the *A. brasilense* Sp7 polar flagellum flagellin.

Для модельных штаммов *A. brasilense* продемонстрирована структурная и антигенная гетерогенность их О-антигена [Матора и др. (Matora et al.), 2008], у ряда штаммов азоспирилл констатировано отсутствие индивидуального капсульного антигена [Матора, Щеголев (Matora, Shchyogolev), 2002]. Анализ химического строения гликозилированного флагеллина полярного жгутика типового штамма *A. brasilense* Sp7 показал наличие в его составе нескольких полисахаридных цепей, иммунохимически идентичных липополисахариду (ЛПС) данных бактерий [Belyakov et al., 2012].

Методом гомологичного моделирования (zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER) впервые определена 3D структура протеиновой основы флагеллина азоспирилл (рис. 1Б) с использованием аминокислотной последовательности белка (www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_059398886.1). Впервые методом иммуноэлектронной микроскопии на поверхности бактерий рода *Azospirillum* выявлены белковые пилепоподобные структуры, см. пример на рисунке 2 для штамма SK048, являющегося мутантом *A. brasilense* Sp245, лишенным полярного жгутика.

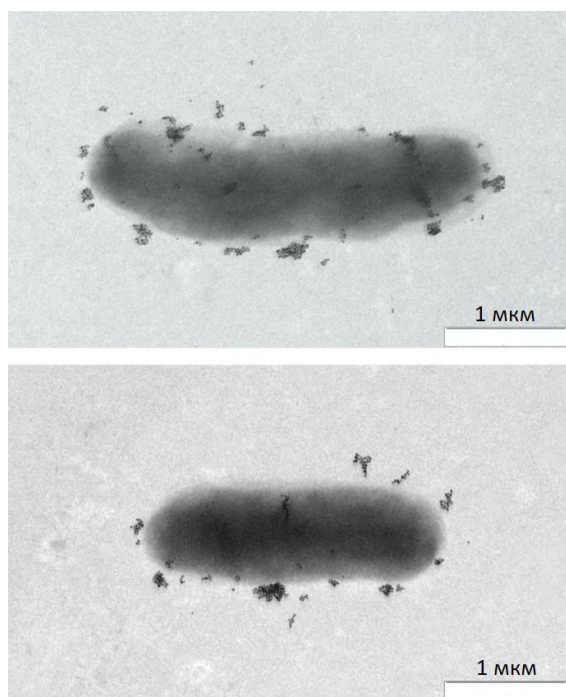


Рис. 2. Иммуноэлектронная микроскопия клеток Gri⁺ мутанта *A. brasilense* SK048 с использованием родоспецифичных Ат на поверхностные белковые детерминанты, меченных сферическими наночастицами золота (диаметр 15 нм)

Fig. 2. Immune electron microscopy of the *A. brasilense* SK048 Gri⁺ mutant cells made with the use of the genus specific antibodies to protein surface determinants labelled with the gold spherical nanoparticles (diameter 15 nm).

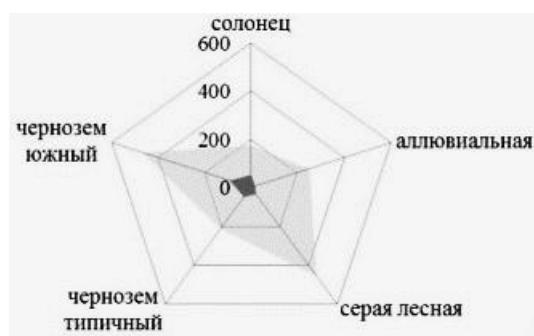


Рис. 3. ИФА образцов почв Саратовской области с антителами на ЛПС *A. brasilense* штаммов Sp245 (светлая окраска) и Sp7 (темная окраска).

Fig. 3. The enzyme immunoassay of the soil samples from Saratov region with the use of antibodies to *A. brasilense* lipopolysaccharides of Sp245 (light dye) and Sp7 (dark dye) strains.

На основе иммуноферментного анализа (ИФА) с полученными специфическими Ат разработаны приемы определения распространенности азоспирилл в образцах почв [Красов и др. (Krasov et al.), 2009; Широков и др. (Shirokov et al.), 2015], позволившие оценить динамику численности интродуцированных в почву бактерий и выявить наличие антигенов азоспирилл в течение вегетативного сезона в 6 типах почв Саратовской области. Оценка их распространенности в различных почвах (рис. 3) впервые выявила более значительный вклад серотипа Sp245 по сравнению с серотипом Sp7 среди азоспирилл, представленных в микробиоме почв Саратовской области. Была исследована способность разных штаммов к колонизации корней растений, выявлены стимулирующие эффекты бактерий и их изолированных поверхностных компонентов по морфометрическим и цитологическим показателям растений. Продемонстрирована роль и оценён вклад ЛПС, флагеллина и белковых пилеподобных структур азоспирилл в бактериальную колонизацию растений и индукцию рост-стимулирующих эффектов [Evseeva et al., 2011]. Впервые для ассоциативных бактерий обнаружено положительное влияние изолированного флагеллина полярного жгутика *A. brasilense* Sp245 на пролиферативную активность проростков пшеницы, что иллюстрируют результаты, представленные в таблице 1.

Таблица 1.

Митотический индекс проростков пшеницы, обработанных препаратом изолированного флагеллина полярного жгутика штамма *A. brasilense* Sp245

Обработка	Митотический индекс, %		
	Время после инокуляции, сутки		
	1	3	7
Препаратом флагеллина Sp245	5,6±0,6	6,3±0,6	6,7±0,6
Контроль (без добавок)	3,7±0,4	3,9±0,4	5,2±0,6

Проводятся работы по выделению и идентификации новых ризосферных бактериальных штаммов-симбионтов растений (представителей родов *Ochrobactrum*, *Acinetobacter*, *Ensifer*, *Enterobacter*, *Kocuria* и др.) с оценками их рост-стимулирующего потенциала [Бурыгин и др. (Burygin et al.), 2017; Щеголев, Бурыгин (Shchyogolev, Burygin), 2018].

Литература

1. Бурьгин Г.Л., Попова И.А., Каргаполова К.Ю., Ткаченко О.В., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Бактериальный изолят из ризосферы картофеля (*Solanum tuberosum* L.), идентифицированный как *Ochrobactrum lupini* IPA7.2. *Сельскохозяйственная биология*. 2017. Т. 52, №1. С. 105-115.
2. Красов А.И., Попова И.А., Филипьева Ю.А., Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю. Применение иммуноферментного анализа для выявления азотфиксирующих бактерий рода *Azospirillum* в почвенных суспензиях. *Микробиология*. 2009. Т.78, № 5. С. 662-666.
3. Матора Л.Ю., Шварцбург Б.И., Щеголев С.Ю. Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense*. *Микробиология*. 1998. Т. 67(6). С. 815-820.
4. Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Антигенная идентичность липополисахаридов, капсулы и экзополисахаридов *Azospirillum brasilense*. *Микробиология*. 2002. Т. 71, №2. С. 211-214.
5. Матора Л.Ю., Бурьгин Г.Л., Щеголев С.Ю. Исследование иммунохимической гетерогенности липополисахаридов *Azospirillum brasilense*. *Микробиология*. 2008. Т. 77, № 2. С. 196-200.
6. Сигида Е.Н., Федоненко Ю.П., Здоровенко Э. Л., Бурьгин Г.Л., Коннова С.А., Игнатов В.В. Характеристика липополисахаридов бактерий рода *Azospirillum*, отнесенных к серогруппе II. *Микробиология*. 2014. Т. 83. №. 4. С. 416-416.
7. Широков А.А., Красов А.И., Селиванов Н.Ю., Бурьгин Г.Л., Щеголев С.Ю., Матора Л.Ю. Иммунохимическое выявление бактерий рода *Azospirillum* в почве с помощью родоспецифичных антител. *Микробиология*. 2015. Т. 84, № 2. С. 244-249.
8. Щеголев С.Ю. О систематике прокариот: актуальные проблемы и пути выхода из кризиса. *Вестник физико-химической биологии и биотехнологии*. 2018. Т. 14(1). С.5-14.
9. Щеголев С.Ю., Бурьгин Г.Л. Опыт применения современных подходов к геносистематике прокариот в таксономических исследованиях ризосферной микрофлоры. *Биомика*. 2018. Т. 10(2). С.156-160. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-21
10. Belyakov A.Ye., Burygin G.L., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Selivanov N.Y., Matora L.Y., Knirel Y.A., Shchyogolev S.Y. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Carbohydr. Res.* 2012. V. 361. P. 127-132. DOI: 10.1016/j.carres.2012.08.019
11. Bogatyrev V.A. Dykman L.A., Matora L.Yu., Schwartzburd B.I. The serotyping of *Azospirillum* spp. by cell-gold immunoblotting. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. Vol. 96. P. 115-118. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05402.x
12. Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Yu. Gold nanoparticles as an antigen carrier and an adjuvant. New-York: Nova Sci. Publ., 2010. 54 p.
13. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications. Boca Raton: CRC Press, 2017. 332 p.
14. Evseeva N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Dmitrienko V.V., Shchyogolev S.Yu. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells. *Plant Soil.* 2011. V. 346. P. 181-188. DOI: 10.1007/s11104-011-0808-9

References

1. Belyakov A.Ye., Burygin G.L., Arbatsky N.P., Shashkov A.S., Selivanov N.Y., Matora L.Y., Knirel Y.A., Shchyogolev S.Y. Identification of an O-linked repetitive glycan chain of the polar flagellum flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7. *Carbohydr. Res.* 2012. V. 361. P. 127-132. DOI: 10.1016/j.carres.2012.08.019
2. Bogatyrev V.A. Dykman L.A., Matora L.Yu., Schwartzburd B.I. The serotyping of *Azospirillum* spp. by cell-gold immunoblotting. *FEMS Microbiol. Lett.* 1992. Vol. 96. P. 115-118. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05402.x
3. Burygin G.L., Popova I.A., Kargapolova K.Yu., Tkachenko O.V., Matora L.Yu., Shchyogolev S.Yu. A bacterial isolate from the rhizosphere of potato (*Solanum tuberosum* L.) identified as *Ochrobactrum lupini* IPA7.2. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* 2017. Vol. 52, № 1. P. 105-115. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.1.105rus (In Russian).
4. Dykman L.A., Staroverov S.A., Bogatyrev V.A., Shchyogolev S.Yu. Gold nanoparticles as an antigen carrier and an adjuvant. New-York: Nova Sci. Publ., 2010. 54 p.
5. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications. Boca Raton: CRC Press, 2017. 332 p.
6. Evseeva N.V., Matora L.Yu., Burygin G.L., Dmitrienko V.V., Shchyogolev S.Yu. Effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 lipopolysaccharide on the functional activity of wheat root meristematic cells. *Plant Soil.* 2011. V. 346. P. 181-188. DOI: 10.1007/s11104-011-0808-9
7. Krasov A.I., Popova I.A., Filip'echeva Y.A., Burygin G.L., Matora L.Y. Application of enzyme immunoassay for detection of the nitrogen-fixing bacteria of the genus *Azospirillum* in soil suspensions. *Microbiology. (Microbiologiya)* 2009. V. 78. P. 598-602. DOI: 10.1134/S0026261709050117 (In Russian).
8. Matora L.Yu., Shvartsburd B.I., Shchyogolev S.Yu. Immunochemical analysis of O-specific polysaccharides of soil nitrogen-fixing bacteria *Azospirillum brasilense*.

- Mikrobiologiya*. 1998. V. 67. P. 815-820. DOI: 10.1023/A:1015146104397 (In Russian).
9. Matora L.Yu., Shchegolev S.Yu. Antigenic identity of the capsule lipopolysaccharides, exopolysaccharides, and O-specific polysaccharides in *Azospirillum brasilense*. *Microbiology (Microbiologiya)*. 2002. V. 71. P. 178-181. doi: 10.1023/A:1015146104397 (In Russian).
10. Matora L.Yu, Burygin G.L., Shchyogolev S.Yu. Study of immunochemical heterogeneity of *Azospirillum brasilense* lipopolysaccharides. *Microbiology (Microbiologiya)*. 2008. V. 77. P. 166-170.] DOI: 10.1134/S0026261708020070 (In Russian).
11. Sigida E.N., Fedonenko Y.P., Zdorovenko E.L., Burygin G.L., Konnova S.A., Ignatov V.V. Characterization of the lipopolysaccharides of serogroup II *Azospirillum* strains. *Microbiology (Microbiologiya)*. 2014. V.83. P.326-334. DOI: 10.7868/S0026365614040156 (In Russian).
12. Shirokov A.A., Krasov A.I., Selivanov N.Y., Burygin G.L., Shchyogolev S.Y., Matora L.Y. Immunochemical detection of *Azospirilla* in soil with genus-specific antibodies. *Microbiology (Microbiologiya)*. 2015. V. 84. P. 263-267. DOI: 10.7868/S0026365615020135 (In Russian).
13. Shchyogolev S.Yu. On prokaryote systematics: topical problems and ways out of the crisis. *Yu.A. Ovchinnikov bulletin of biotechnology and physical and chemical biology*. 2018. V.14(1). P.5-14. (In Russian).
14. Shchyogolev S.Yu., Burygin G.L. Application of modern approaches to genetic systematics of prokaryotes in taxonomic studies of rhizosphere microflora. *Biomics*. 2018. V.10(2). P.156-160. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-20 (In Russian)