DOI 10.37882/2223-2966.2024.11-2.32

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ НАТИВНОЙ И МОДИФИЦИРОВАННОЙ ДНК НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ XANTHOMONAS CAMPESTRIS

RESEARCHING THE INFLUENCE OF NATIVE AND MODIFICATED DNA ON VIABILITY OF XANTHOMONAS CAMPESTRIS

V. Trofimov
K. Pankina
Yu. Yushina
A. Lomakin

Summary. In this work *X. campestris* strain M28 was exposed to modified and non-modified DNA (under UV-light and hydrogen peroxide) to study the influence on the viability and xanthan-producing activity of bacteria. It was shown that the cultivation of bacterial cells with modified DNA has a suppressive effect on *X. campestris* M28 culture. This effect leading to decrease in biomass and viability of cells as a stress response to the damaging factor.

The addition of native (non-modicated) DNA did not contribute to an increase in xanthan gum yield, but at the same time, CFU and viability decreased. An increase in the level of extracellular DNA can act as a stress-factor, since it indicates the cell death and need to respond to the influencing factor.

Keywords: Xanthomonas campestris, DNA, genome, Gum-operon, strain-producer, xanthan, biosynthesis.

Трофимов Владимир Александрович
Доктор биол. наук, профессор, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва (Саранск)
geneticlab@yandex.ru
Панькина Кира Юрьевна
Аспирант, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва (Саранск)
panki.kira@yandex.ru
Юшина Юлия Константиновна
Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва (Саранск)
gagarka.09@mail.ru
Ломакин Александр Александрович
Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва (Саранск)
alexandrlom2000@mail.ru

Аннотация. В настоящей работе штамм *X. campestris* M28, был подвергнут воздействию модифицированной и немодифицированной ДНК с целью изучения их влияния на жизнеспособность и ксантан-продуцирующую активность бактерий.

Показано, что внесение в питательные среды модифицированной ДНК оказывает угнетающий эффект на культуру *X. campestris* M28, приводя к уменьшению биомассы и снижению жизнеспособности, как стресс-реакция на действие повреждающего фактора. Добавление нативной ДНК не способствовало увеличению выхода ксантана, однако при этом КОЕ и жизнеспособность понижалась. Повышение уровня внеклеточной ДНК может выступать как стресс-фактор, поскольку свидетельствует о гибели бактерий и необходимости отвечать на воздействующий фактор.

Ключевые слова: Xanthomonas campestris, ДНК, геном, Gum-оперон, штамм-продуцент, ксантан, биосинтез.

Введение

Xanthomonas campestris — фитопатогенная грамотрицательная бактерия, продуцирующая ксантановую камедь. Ксантан представляет собой водорастворимый внеклеточный гетерополисахарид, широко применяемый в производстве пищевых продуктов, лекарственных препаратов, а также в строительстве и бурении нефтяных скважин [1, 4, 8].

Биологическая роль ксантана заключается в формировании защитной биопленки, необходимая для защиты колоний от излучения, перепадов влажности, а также участвует в прикреплении бактерий к растениям и в их эпифитном выживании [2]. Помимо этого, в состав матрикса биопленки входит внеклеточная или экстраклеточная ДНК, которая совместно с белковыми и липидными биомолекулами участвует в поддержании стабильности структуры, а также выступает как возможный генетический материал для трансформации и горизонтального переноса генов.

Биосинтез ксантана протекает по Wzx/Wzy-зависимому пути [9], в который вовлечены 12 генов (*gumB, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K, -L* и *–M*), образующие оперон [6, 9]. Гены *gum D,-M, -H, -K и –I* участвуют в синтезе повторяющейся единицы пентосахарид, в то время как гены *gumB, -C, -E* и *–J* участвуют в полимеризации

и экспорте полисахарида [5, 9, 10]. Индуцированная УФ-облучением и перекисью водорода мутационная изменчивость Gum-оперона лежит в основе отбора наиболее продуктивных колоний бактерий [7]. При этом ультрафиолетовый мутагенез приводит к различным типам мутаций ДНК, связанным со сдвигом рамки считывания (делеции и инсерции), заменам оснований (трансверсии и транзиции), а также образованию фотодимеров, которые приводят к мутациям в 5–12 % случаев [3]. Пероксид водорода вызывает достаточно широкий спектр окислительных модификаций ДНК и его генотоксичность во многом связана с образованием гидроксид-радикала, воздействующего на азотистые основания, прежде всего на остатки тимина и цитозина, а также на остатки дезоксирибозы.

Данная работа посвящена изучению влияния на жизнеспособность и продуктивность штамма *X. campestris* M28 нативной и модифицированных УФ-облучением и пероксидом водорода препаратов тотальной бактериальной ДНК.

Материалы и методы

Штамм *X. campestris* M28 получен селекционным путем из штамма, выделенного в 2012 г. на кафедре биотехнологии, биоинженерии и биохимии МГУ им. Н.П. Огарёва и депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов (B-3503D) [1]. Для культивирования использовали жидкую и агаризованную среды с сахарозой следующего состава (г/л): сахароза — 20,0; дрожжевой экстракт — 5,0; пептон — 10,0; агар-агар — 20,0; pH 6,8–7,0. Морфологию клеток изучали с использованием светового микроскопа DM2500 M («Leica», Швейцария), а морфологию колоний — с помощью стереомикроскопа Stemi DV4 («Carl Zeiss», Германия). Жизнеспособность клеток определяли по методу Коха. Количество биомассы микроорганизмов определяли весовым методом, пробы культуральной жидкости отбирали после 3, 24, 48, 72 ч культивирования. Для получения ксантана, бактерии культивировали в жидкой среде с сахарозой в течение 7 дней при 28°C и 250 об/мин (в колбах Эрленмейера на 250 мл). Количество ксантана определяли весовым методом, используя бумажные фильтры и осаждение 96 % спиртом.

ДНК из клеток *X. campestris* M28 выделяли фенол-хлороформным методом. Для количественной и качественной оценки препаратов ДНК использовали спектрофотометр NanoDrop 2000/2000c. Электрофорез ДНК проводили в 1 % агарозном геле.

Перед посевом бактерий в среды добавляли растворы нативной и модифицированной ДНК в разных концентрациях. В качестве мутагенных факторов применяли 100 и 500 мкМ H_2O_2 и УФ-свет (λ = 254 нм). Облучение ДНК ультрафиолетом проводили в течение 5, 10 и 15 мин.

Статистический анализ проводился с использованием программы MS Office Excel. Полученные данные объединяли в вариационные ряды и проводили расчет средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD).

Результаты и их обсуждение. Влияние вкДНК на морфологию и жизнеспособность X. campestris M28

Результаты микроскопического анализа не выявили каких-либо морфологических отличий у бактерий, культивируемых в различных условиях. Клетки *X. campestris* представляли собой закругленные прямые палочки, размером 0,5–0,8 х 1,0–2,0 мкм (рис. 1). Колонии образовывались слизистые, гладкие, с ровным краем, блестящие, круглые с диаметром 4–7 мм. Цвет колоний — светло-желтый, по периферии наблюдалась прозрачная зона.

Результаты влияния нативной и модифицированной ДНК на жизнеспособность бактериальных клеток представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Количество колониеобразующих единиц в образцах

Добавочные компоненты среды	Количество колониеобразующих единиц, КОЕ/мл
контрольная среда	$5{,}80\times10^8$
тотальная нативная ДНК (100 нг/мкл)	$2{,}03\times10^8$
тотальная нативная ДНК (150 нг/мкл)	$3{,}20\times10^8$
тотальная нативная ДНК (200 нг/мкл)	$3{,}50\times10^8$
ДНК, модифицированная перекисью водорода (100 мкМ)	$3{,}25\times10^8$
ДНК, модифицированная перекисью водорода (500 мкМ)	$3{,}07\times10^8$
ДНК, модифицированная перекисью водорода (1000 мкМ)	$2{,}61\times10^8$
ДНК, модифицированная УФ-облучением, 5 мин	$3{,}60\times10^8$
ДНК, модифицированная УФ-облучением, 10 мин	$4{,}00\times10^8$
ДНК, модифицированная УФ-облучением, 15 мин	$4{,}60\times10^8$

Из полученных данных видно, что при всех видах воздействий на *X. campestris* величина КОЕ снижалось, что может указывать на снижение жизнеспособности бактерий. В среднем количество колониеобразующих единиц культуры *X. campestris*, выращенной на модифицированных средах, ниже на 46 % по сравнению с контрольной культурой. Наиболее выраженный эффект был вызван на-

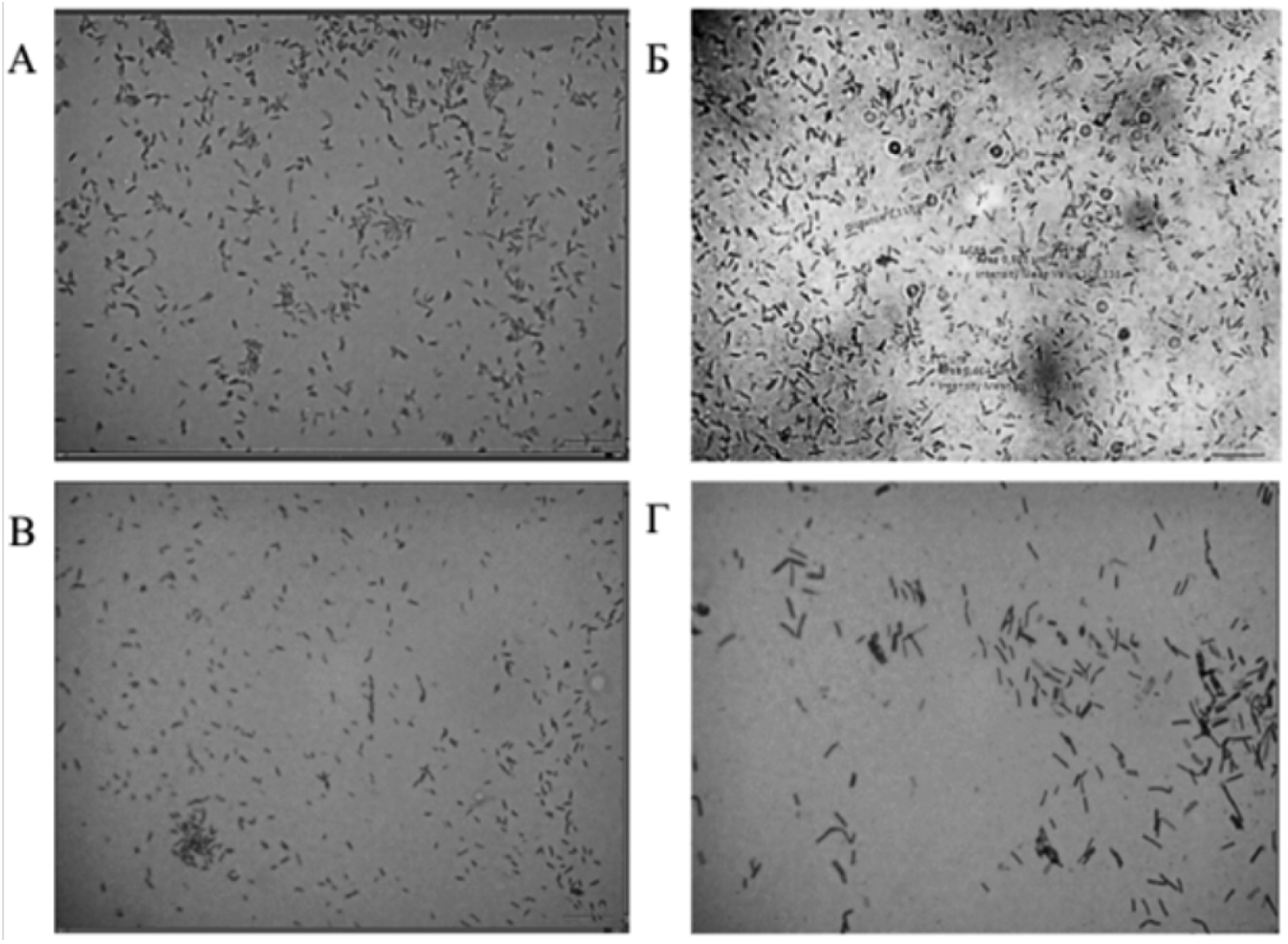

Рис. 1. Фотографии микропрепаратов *X. campestris* M28
А — контрольный образец, Б — с добавлением в среду нативной ДНК в концентрации 100 нг/мкл, В — с добавлением в среду ДНК, модифицированной 500 мкМ перекисью водорода, Г — с добавлением в среду УФ-облученной ДНК в течение 5 мин

тивной чДНК с концентрацией 100 нг/мкл (снижение КОЕ на 65 %). Также ДНК, модифицированная перекисью водорода, вызвала снижение жизнеспособности бактерий.

Стоит отметить пониженное влияние УФ-модифицированной ДНК на жизнеспособность в сравнении с другими препаратами ДНК (жизнеспособность снизилась на 21 % в сравнении с контролем).

Для выявления специфических особенностей генома бактерий *X. campestris* M28, выращенных на модифицированных средах, проводили выделение ДНК и электрофорез.

Под влиянием УФ-облучения и перекиси водорода разной концентрации, наблюдали неспецифическую фрагментацию ДНК бактерий (рис. 2). В дорожках с ДНК бактерий, выращенных на средах с добавлением нативной ДНК и перекиси водорода, по сравнению с ДНК контрольной культуры отличий не наблюдается.

Влияние модифицированной и немодифицированной ДНК на биомассу

Добавление как модифицированной, так и немодифицированной внеклеточной ДНК в среду для культивирования снижало количество биомассы (рис. 3).

Значительное снижение биомассы наблюдается при добавлении нативной ДНК (рис. 3, а). При добавлении в среду перекись водорода в концентрациях 100 мкМ, 500 мкМ и 1000 мкМ без добавления внеклеточной ДНК было отмечено снижение биомассы (рис. 3, б). Окисленная ДНК бактерий перекисью водорода в разных концентрациях также снижала биомассу (рис. 3, в). Наименьшее снижение биомассы наблюдается при добавлении УФ-модифицированной внеклеточной ДНК относительно контроля (рис. 3, г). При увеличении времени выдержки ДНК до 15 минут под УФ-излучением, наблюдается увеличение количества биомассы до 5,02 г/л за 72 часа культивирования.

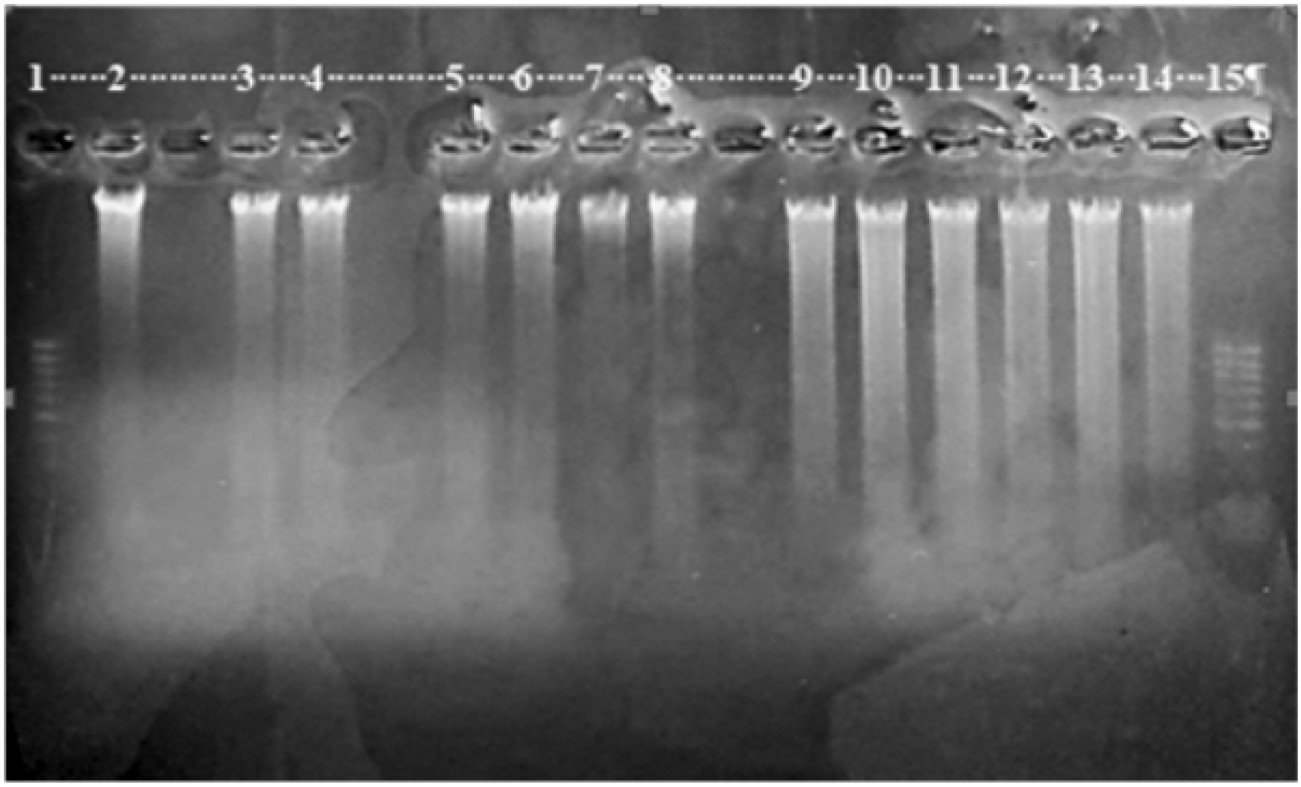

Рис. 2. Электрофореграмма ДНК, выделенной из *X. campestris*

1, 15 — маркер; 2 — ДНК контрольной культуры; 3, 4, 5 — ДНК культуры, выращенной на средах с добавлением нативной ДНК с концентрацией 100, 150, 200 нг/мкл, соответственно; 6, 7, 8 — ДНК культуры, выращенной на средах с добавлением растворов перекиси водорода с концентрацией 100, 500, 1000 мкМ соответственно; 9, 10, 11 — ДНК культуры, выращенной на средах с добавлением растворов ДНК, модифицированной перекисью водорода с концентрацией 100, 500, 1000 мкМ соответственно, 12, 13, 14 — ДНК культуры, выращенной на средах с добавлением растворов ДНК, модифицированной ультрафиолетовым облучением в течение 5, 10, 15 минут соответственно

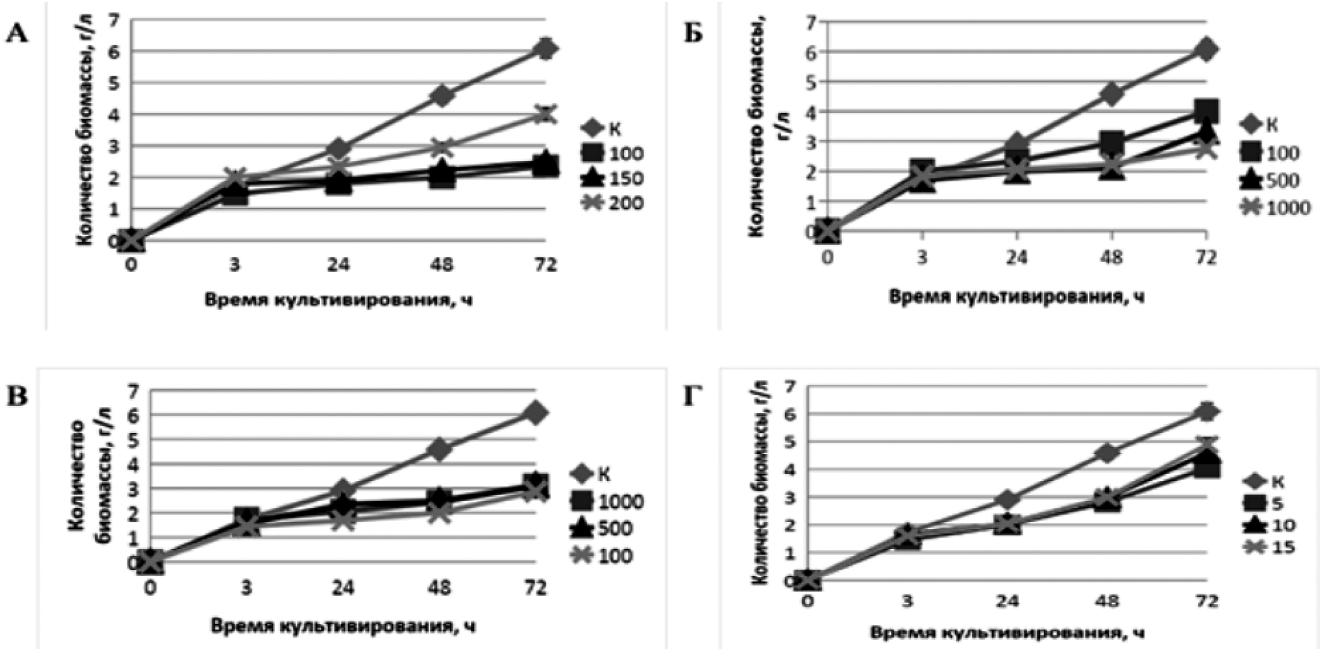

Рис. 3. Влияние внеклеточной ДНК на количество биомассы *X. campestris* M28

А — количество биомассы при добавлении в среду нативной ДНК в концентрации 100, 150 и 200 нг/мкл; Б — количество биомассы при добавлении в среду перекиси водорода в концентрации 100, 500 и 1000 мкМ; В — количество биомассы при добавлении в среду ДНК, модифицированной перекисью водорода в концентрации 100, 500 и 1000 мкМ; Г — количество биомассы при добавлении в среду ДНК, модифицированной УФ-излучением в течении 5, 10 и 15 минут

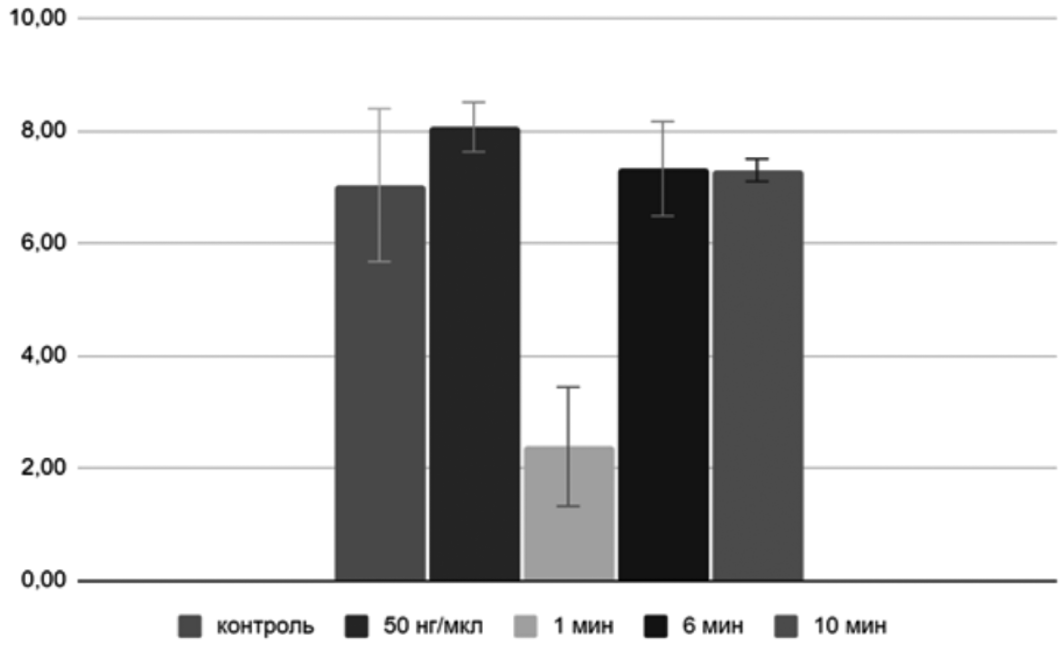

Рис. 4. Влияние УФ-модифицированной и нативной внеклеточной ДНК (в течение 1, 6 и 10 минут) на продуктивность *Xanthomonas campestris* M28

В целом внесение чужеродной ДНК оказало негативное влияние на жизнеспособность бактерий. В среднем показатели конечной биомассы бактерий *X. campestris*, выращенных на модифицированных средах, ниже на 44 % по сравнению с показателями контрольной культурой. Наибольшее отклонение наблюдалось у бактерий, выращенных на среде с добавлением нативной ДНК с концентрацией 100 нг/мкл. Показатели биомассы бактерий оказались ниже на 61 % по сравнению с контрольной культурой. Наименьшее отклонение наблюдалось у бактерий, выращенных на среде с добавлением ДНК, модифицированной ультрафиолетовым облучением в течение 15 минут. Показатели биомассы бактерий оказались ниже на 19,5 % по сравнению с контрольной культурой.

Влияние модифицированной и немодифицированной ДНК на выход ксантана

Продуктивность контрольного образца штамма *Xanthomonas campestris* M28 на среде с сахарозой в среднем составила 7,03±1,36 г/л (рис. 4).

Добавление немодифицированной бактериальной ДНК в концентрации 50 нг/мкл продуктивность бактерий незначительно возросла на 1,03 г/л и составила 8,07 ±0,44 г/л. Добавление УФ-модифицированной ДНК снизило продуктивность штамма. При добавлении препарата ДНК, облученного УФ-светом в течение 1 минуты, продуктивность ксантана снизилась до 2,53±1,02 г/л. При добавлении ДНК, облученной УФ-светом в течении 5 и 10 минут продуктивность бактерий незначительно снизилась — до 6,77±0,29 г/л и 6,10±1,40 г/л, соответственно.

Заключение

Из всех приведенных выше результатов ясно, что штаммы *Xanthomonas campestris* M28 проявили низкую биосинтетическую активность, что вероятно связано с появлением под действием обработки УФ-излучением и перекисью водорода неспецифических разрывов ДНК. Модификация питательных сред чужеродными ДНК и перекисью водорода оказывает угнетающий эффект на культуру *Xanthomonas campestris* M28. Образование неспецифических разрывов ДНК препятствуют росту бактерий, количество жизнеспособных бактерий уменьшается и, как следствие, уменьшается биомасса культуры. Стоит отметить пониженное влияние УФ-модифицированной ДНК на жизнеспособность и продуктивность бактерий в сравнении с перекисью водорода.

Таким образом, нативная и модифицированная ДНК оказывает отрицательное воздействие на жизнеспособность культуры *Xanthomonas campestris.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Ревин В.В. Характеристика нового штамма Xanthomonas campestris M 28— продуцента ксантана, исследование генома, условий культивирования и физико-химических и реологических свойств полисахарида / В.В. Ревин, Е.В. Лияськина, Б.В. Покидько, Н.В. Пименов, А.В. Марданов, Н.В. Равин. — Текст: электронный // Прикладная биохимия и микробиология, 2021, том 57, № 3, с. 251–261. — URL: DOI: 10.31857/S0555109921030107
2. An, S. Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F.J., He, Y.Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L., & Tang, J.L. (2020). Mechanistic insights into host adaptation, virulence and epidemiology of the phytopathogen Xanthomonas. FEMS microbiology reviews, 44(1), 1–32. https://doi.org/10.1093/femsre/fuz024
3. Crossman, L., & Dow, J. M. (2004). Biofilm formation and dispersal in Xanthomonas campestris — Microbes and Infection. — № 6(6). — P. 623–629. — URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15158198/
4. Gansbiller M. In-depth rheological characterization of genetically modified xanthan-variants / M. Gansbiller, J. Schmid, V. Sieber. — Текст: электронный // Carbohydrate Polymers. V. 213, 1 June 2019, P. 236–246. — URL: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.055
5. Ielpi L. Xanthan cum biosynthesis pyruvic acid acetal residues are transferred from phosphoenolpyruvate to the pentasaccharide-P-P-lipid / L. Ielpi, R.O. Couso, M.A. Dankert. — Текст: электронный // Biochemical and Biophysical Research Communications. V. 102, I. 4, 30 October 1981, P. 1400–1408. — URL: https://doi.org/10.1016/S0006-291X(81)80167-2
6. Katzen F. Promoter analysis of the Xanthomonas campestris pv. campestris gum operon directing biosynthesis of the xanthan polysaccharide / F. Katzen, A. Becker, A. Zorreguieta, A. Pühler, L. Ielpi. — Текст: электронный // J Bacteriol. Июль 1996, 178(14). 4313–4318. — doi: 10.1128/jb.178.14.4313-4318.1996
7. Oppezzo O.J. Inhibition of sulfur incorporation to transfer RNA by ultraviolet-A radiation in Escherichia coli / O.J. Oppezzo, R.A. Pizarro. — Текст: электронный // J Photochem Photobiol B. 2003 Oct 1. — URL: DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2003.08.004
8. Palaniraj A. Production, recovery and applications of xanthan gum by Xanthomonas campestris / Aarthy P., Vijayakumar J. — Текст: электронный // Journal of Food Engineering. V. 106, I. 1, September 2011, P. 1–12. — URL: https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.035
9. Schmid J. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies / J. Schmid, V. Sieber, B. Rehm. — Текст: электронный // Front Microbiol. May 2015. — DOI: 10.3389/fmicb.2015.00496.
10. Vorhölter F-J. The genome of Xanthomonas campestris pv. campestris B100 and its use for the reconstruction of metabolic pathways involved in xanthan biosynthesis / F-J Vorhölter, S. Schneiker, A. Goesmann, L. Krause, T. Bekel, O. Kaiser, B. Linke, T. Patschkowski, C. Rückert, J. Schmid, V. K. Sidhu, V. Sieber, A. Tauch, S. A. Watt, B. Weisshaar, A. Becker, K. Niehaus, A. Pühler. — Текст: электронный // J Biotechnol 20 Mar, 2008. — URL: 10.1016/j.jbiotec.2007.12.013.

© Трофимов Владимир Александрович (geneticlab@yandex.ru); Панькина Кира Юрьевна (panki.kira@yandex.ru);
Юшина Юлия Константиновна (gagarka.09@mail.ru); Ломакин Александр Александрович (alexandrlom2000@mail.ru)
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»