

## Белок SrfN с доменом DUF1471 необходим для биопленкообразования и подвижности *Serratia marcescens* SM6

Анна Анатольевна Елистратова<sup>1</sup>, Татьяна Владимировна Ширшикова<sup>1</sup>, Наиля Наилевна Хабипова<sup>1</sup>, Лидия Михайловна Богомольная<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань

<sup>2</sup>Университет Маршалла, Медицинская школа Джоан С. Эдвардс, отделение биомедицинских наук, США

**Аннотация.** Семейство низкомолекулярных белков с доменом DUF1471, выполняющих неизвестную функцию, было открыто более 20 лет назад [1], но в силу их маленького размера (менее 100 аминокислотных остатков), их обнаружение и функциональная характеристика были затруднены. На настоящий момент было проведено несколько исследований таких белков. Сообщается, что белки с доменом DUF1471 вовлечены в адаптацию к неблагоприятным условиям окружающей среды (в частности, они синтезируются в ответ на оксидативный стресс или понижения pH среды), а также играют роль в процессе биопленкообразования [2;7]. Ранее, при анализе низкомолекулярных соединений, секретируемых грамотрицательной бактерией *Serratia marcescens* SM6 в ответ на оксидативный стресс, нами был обнаружен белок с доменом DUF1471 геном EG355\_19345 (*srfN*). Чтобы установить точную функцию белка SrfN, мы создали мутант с делецией  $\Delta srfN$ , а также комплементарный мутантный штамм  $\Delta srfN$  pBAD-*srfN* и провели серию экспериментов с использованием этих штаммов и *S. marcescens* SM6 дикого типа. Мы установили, что потеря гена *srfN* не влияет на продукцию внеклеточных ферментов, но делеционный мутант значительно более чувствителен к росту на минимальной среде с низким pH (5,0) и на богатой среде, содержащей перекись водорода (10 мМ). Оба дефекта были полностью восстановлены комплементацией [3]. В данной статье мы проводим оценку биопленкообразования делеционного мутанта *S. marcescens* SM6  $\Delta srfN$  по сравнению с диким типом, а также его подвижность на полужидком агаре.

**Ключевые слова:** *Serratia marcescens*, SrfN, DUF1471, биопленкообразование, подвижность

### Введение

*Serratia marcescens*, клиническое значение которой растет из-за ее устойчивости к нескольким классам антибиотиков, вызывает множество инфекций у лиц с ослабленным иммунитетом. Поэтому очень важно определить дополнительные мишени для подавления бактерий. Одной из таких мишеней могут быть белки с неизвестной функцией, содержащие домен DUF1471. Вся известная на данный момент информация о белках с доменом DUF1471 указывает, что это консервативные белки размером не более 90 АА, имеющие несколько паралогов в организме и служащие, по-видимому, для защиты бактерии от различных стрессов, в частности, кислотного и оксидативного, а также необходимые для формирования биопленок и вирулентности бактерий [4].

Бактериальные биопленки представляют собой сложные, прикрепленные к поверхности сообщества бактерий, заключенные во внеклеточный матрикс, состоящий из полисахаридов, белков и внеклеточной ДНК. Способность *S. marcescens* формировать биопленки является дополнительным источником патогенности бактерии, так как с помощью образования биопленок бактерия способна прикрепляться к клеткам. Бактерии, входящие в состав биопленок, кроме того, обладают повышенной устойчивостью к антибиотикам, так как биопленки препятствуют проникновению антибиотиков в клетку, а также по причине метаболических изменений, таких, как пониженная динамика роста [5].

У *S. marcescens* биопленки представляют собой пористые, волокнистые образования, состоящие из нитевидных клеточных цепочек и клеточных скоплений, образовавшихся через серию последовательных процессов, зависящих от механизма кворум-сенсинга [6].

Ограниченные литературные данные по роли DUF1471-содержащих белков в других видах бактерий показывают, что часто такие белки вовлечены в процесс колонизации поверхностей [2].

### **Материалы и методы**

#### **Тест на биопленкообразование**

Культивирование бактериальных биопленок проводили в статичных условиях в полистироловых 24-луночных планшетах на питательной среде Мюллер-Хинтона в объеме 2 мл в лунке. Начальная оптическая плотность культур бактерий в среде составляла 0.1 единицу ( $OD(590)=0.1$ ). Измерение оптической плотности проводили спектрофотометрически при длине волны  $\lambda=590$ . Культивирование бактерий для образования биопленок проводили статично при температуре 37°C в течение 3 суток.

Количественный анализ биопленок проводили с помощью метода окраски генциан фиолетовым [5].

Статистический анализ проводили из расчета соотношения контроля (окрашенная стерильная лунка) и образца. Эффективность образования биопленок оценивали по методу [8].

Из лунок 24-луночного полистиролового планшета осторожно отбирали среду с планктонными клетками. Планктонные клетки удаляли однократным промыванием лунок стерильным физраствором в том же объеме, в котором проходило культивирование.

Далее в лунку вносили фильтрованный раствор 0,1 % генциан фиолетового в объеме 600 мкл и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Краситель удаляли и промывали лунку от несвязавшегося красителя физ.раствором трехкратно. Экстракцию красителя проводили 96 % этанолом в объеме 600 мкл. Измерение оптической плотности элюированной смеси проводили при длине волны 590 нм на спектрофотометре (Microplate Spectrophotometer xMark™ (Bio-RAD)), предварительно отобрав 200 мкл смеси в чистые 96-луночные плоскодонные планшеты.

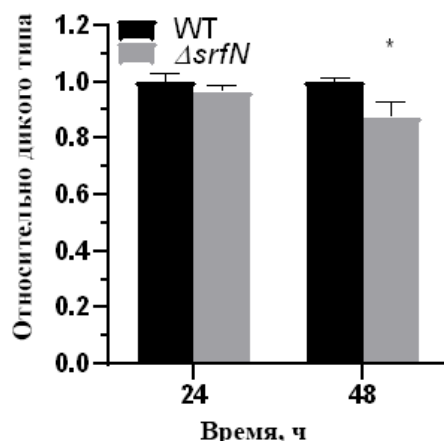
#### **Тест на подвижность**

Для получения информации о вкладе *srfN* в подвижность *S. marcescens* использовали полужидкий LB агар (0,3 %). Ночные культуры штаммов дикого типа и мутанта  $\Delta srfN$ , выращенные в среде LB, уравнивали по оптической плотности и использовали для нанесения на поверхность полужидкого агара в центр чашки Петри в количестве 5 мкл. Культуры на чашках выращивали при температуре 30°C. Диаметр колоний определяли на 24, 48 и 72 ч культивирования. Эксперимент проводили как минимум в трех независимых повторностях.

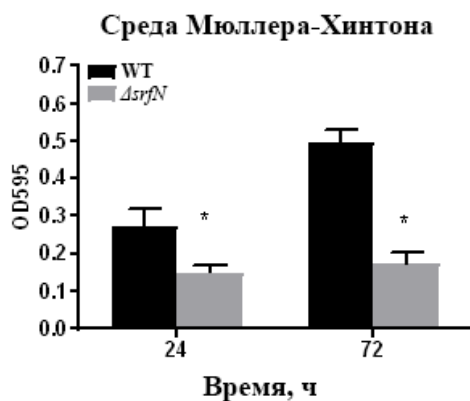
### **Результаты и обсуждение**

Подвижность *Serratia marcescens* может быть оценена при помощи полужидкого 0,3 % агара [9]. Мы обнаружили, что делеция белка SrfN с DUF1471 доменом оказала умеренное (снижение примерно на 15 процентов), но значительное влияние на плавательную подвижность *S. marcescens* после 48 часов инкубации по сравнению с диким типом (Рис. 1). Этот результат предполагает, что SrfN играет роль в модуляции подвижности *S. marcescens*.

Бактерии рода *Serratia* также часто формируют биопленки на различных поверхностях, включая поверхность катетеров и т. п. Поскольку ряд DUF1471-содержащих белков необходим для формирования биопленок, был проведен сравнительный анализ биопленкообразования у штаммов дикого типа и мутанта по гену *srfN* (Рис. 2), показавший, что способность формировать биопленки у мутанта снижена по сравнению с диким типом на всем протяжении эксперимента.



**Рисунок 1. Влияние делеции гена *srfN* на подвижность *S. Marcescens* в полужидком агаре по сравнению с диким типом**



**Рисунок 2. Влияние делеции гена *srfN* на биопленкообразование *S. marcescens* по сравнению с диким типом**

**Выводы:** Таким образом, проведенные нами эксперименты показали, что белок SrfN с доменом DUF1471 у *S. marcescens* необходим для успешной колонизации поверхности бактерией.

#### Список источников

1. Rudd K. E. Low molecular weight proteins: A challenge for post-genomic research / K. E. Rudd, I. Humphery-Smith, V. C. Wasingel, A. Bairoch // Electrophoresis. - 1998. - V. 19. - P. 536-544.
2. Deng K. Functional analysis of *ycfR* and *ycfQ* in *Escherichia coli* O157:H7 linked to outbreaks of illness associated with fresh produce / K. Deng, S. Wang, X. Rui, W. Zhang, M. L. Tortorello // Appl Environ Microbiol. - 2011. - V. 77(12). - P. 3952-3959.
3. Elistratova A. A. *Serratia marcescens* DUF1471-Containing Protein SrfN Is Needed for Adaptation to Acid and Oxidative Stresses / A. A. Elistratova, L. E. Matrosova, I. V. Khilyas, T. V. Shirshikova, I. V. Danilova, A. V. Laikov, Y. D. Romanova, C. G. Sierra-Bakhshi, M. R. Sharipova, L. M. Bogomolnaya // mSphere. - 2022.
4. Eletsky A. Structural and Functional Characterization of DUF1471 Domains of *Salmonella* Proteins SrfN, YdgH/SssB, and YahO / A. Eletsky et al. // PLoS One. - 2014. - V. 9(7).
5. Merritt J. H. Growing and analyzing static biofilms / J. H. Merritt, D. E. Kadouri, G. A. O'Toole // Curr Protoc Microbiol. - 2005.

6. Rice S.A. Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues / S.A. Rice, K.S. Koh, S.Y. Queck, M. Labbate, K.W. Lam, S. Kjelleberg // J Bacteriol. - 2005. - V. 187(10). - P. 3477–3485.

7. Salazar J. K. Genes *ycfR*, *sirA* and *yigG* Contribute to the Surface Attachment of *Salmonella enterica* Typhimurium and Saintpaul to Fresh Produce / J. K. Salazar, K. Deng, M. L. Tortorello, M. T. Brandl, H. Wang, W. Zhang // PLoS One. - 2013. - V. 8(2).

8. Stepanovic S. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci / S. Stepanović, D. Vuković, V. Hola, G. D. Bonaventura, S. Djukić, I. Cirković, F. Ruzicka // APMIS. - 2007.

9. Низамутдинова, Э.Х., Ширшикова Т.В., Марданова А.М., Шарипова М.Р., Богомольная Л.М. Влияние мутаций по внеклеточной нуклеазе на свойства пигментообразующего и беспигментного штаммов *Serratia marcescens* // Микробиология. - 2016. - 85(1). - С. 36-41.

© Елистратова А.А., Ширшикова Т.В., Хабилова Н.Н., Богомольная Л.М., 2022

Научная статья  
УДК 631.527

### Экологические испытания сортов озимой ржи в Нижнем Поволжье

**Даниил Александрович Жиганов**

Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии  
и инженерии имени Н.И. Вавилова,  
г. Саратов,  
ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока»,  
г.Саратов

**Валерий Иванович Жужукин**

Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии  
и инженерии имени Н.И. Вавилова,  
г. Саратов

**Надежда Николаевна Нуждина**

ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока»,  
г. Саратов

**Нина Алексеевна Салманова**

ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока»,  
г. Саратов

**Аннотация.** В статье оцениваются показатели сортов озимой ржи саратовской селекции (Марусенька, Саратовская 7) и инорайонных сортов (Таловская 44, Таловская 45, Графиня, Румба, Безенчукская 110, Антарес) на опытном поле ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока» с мая по июнь в 2021г. Для характеристики селекционного материала использованы индексы: финно-скандинавский, перспективности, аттракции. Лабораторные исследования по анализу качества зерна проведены в «Лаборатории качества зерна» ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока». Опыты проводились в засушливый период ГТК-0,75. В опыте выявлено преимущество сортов озимой ржи саратовской селекции Марусенька и Саратовская 7 по урожайности 4,71 и 3,92; по массе 1000 зёрен 36,70г и 31,85г; по натуре зерна 730,5г/л и 727,0г/л. Инорайонные сорта значительно превысили показатели местных сортов по количеству зёрен с главного колоса.

**Ключевые слова:** озимая рожь, хозяйственно - ценные признаки, качественные показатели, селекционные индексы, амилограмма