

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*, МУТАНТНЫХ ПО ГЕНУ *bssS*

К. Ю. ПЕСОЦКАЯ¹⁾, А. Л. ЛАГОНЕНКО²⁾, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Альгимед Техно, Логойский тракт, 22/1, 220090, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Изучено влияние делеции гена белка BssS, предположительно вовлеченного в формирование биопленок, на продукцию факторов вирулентности фитопатогенными бактериями *Erwinia amylovora*. По сравнению с клетками дикого типа клетки бактерий *E. amylovora*, мутантные по гену регулятора BssS, характеризовались сниженной подвижностью и интенсивностью образования биопленок на питательных средах без глюкозы, при этом в присутствии глюкозы способность клеток делеционного мутанта к передвижению и формированию биопленок возрастала. Показано, что клетки мутантного штамма обладали повышенной чувствительностью к красителю генциановому фиолетовому.

Ключевые слова: *Erwinia amylovora*; регулятор BssS; подвижность клеток; формирование биопленок; краситель генциановый фиолетовый; делеция.

PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *bssS* MUTANT OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIA *ERWINIA AMYLOVORA*

К. Ю. PESOTSKAYA^a, А. Л. LAGONENKO^b, А. Н. EVTUSHENKOV^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bAlgimed Techno, 22/1 Lagojski Tract, Minsk 220090, Belarus

Corresponding author: A. L. Lagonenko (lagonenkoal@mail.ru)

Abstract. In this study we examined the effect of *bssS* gene deletion, presumably involved in biofilm formation, on virulence factors productions in *Erwinia amylovora*. Compared to wild-type cells, *E. amylovora* E2 Δ *bssS* cells were characterised by reduced motility and biofilm formation on growth media without glucose. However, in the presence of glucose, the ability of deletion mutant cells to move and form biofilms was increased. In addition, it was shown that the cells of the mutant strain had increased sensitivity to the gentian violet dye.

Keywords: *Erwinia amylovora*; BssS regulator; cell motility; biofilm formation; gentian violet dye; deletion.

Образец цитирования:

Песоцкая КЮ, Лагоненко АЛ, Евтушенков АН. Фенотипическая характеристика фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*, мутантных по гену *bssS*. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;3:59–68.

EDN: DXGFNP

For citation:

Pesotskaya KYu, Lagonenko AL, Evtushenkov AN. Phenotypic characteristics of *bssS* mutant of phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora*. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024; 3:59–68. Russian.

EDN: DXGFNP

Авторы:

Карина Юрьевна Песоцкая – ассистент кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Александр Леонидович Лагоненко – кандидат биологических наук, доцент; руководитель группы по технологии генетической и белковой инженерии.

Анатолій Николаевич Евтушенков – доктор биологических наук, профессор; профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Karina Yu. Pesotskaya, assistant at the department of molecular biology, faculty of biology.

karina345678@mail.ru

<https://orcid.org/0009-0004-6475-0115>

Alexander L. Lagonenko, PhD (biology), docent; head of the genetic and protein group.

lagonenkoal@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-7939-0659>

Anatoli N. Evtushenkov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of molecular biology, faculty of biology.

evtushenkov@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0002-2755-6979>

Введение

Среди бактериозов плодовых деревьев выделяют бактериальный ожог плодовых культур – одно из наиболее вредоносных заболеваний растений семейства Rosaceae, вызываемое грамотрицательной бактерией *Erwinia amylovora*. В международной терминологии данный бактериоз получил название «fire blight» по одному из основных признаков заболевания: зараженное дерево напоминает обожженное пожаром растение. Ущерб, наносимый бактериальным ожогом плодовых культур, выражается как в повсеместном снижении урожайности, так и в гибели пораженных растений. Основными и наиболее экономически значимыми хозяевами фитопатогена *E. amylovora* являются дикорастущие и культурные растения из подсемейства Maloideae семейства Rosaceae – яблоня, груша, мушмула, айва [1].

Для большинства видов микроорганизмов описано существование в планктонном состоянии, при котором клетки свободно передвигаются в окружающей среде. Однако на сегодняшний момент установлено, что многие бактерии существуют не в виде свободноживущих клеток, а в виде биопленок [2]. Биопленка представляет собой сообщество микроорганизмов, клетки которых прикреплены к какой-либо биотической и (или) абиотической поверхности и погружены в биополимерный матрикс [3]. Матрикс является продуктом жизнедеятельности самих бактериальных клеток и состоит из белков, липидов, внеклеточной ДНК и РНК, гомо- и гетерополисахаридов [2; 4]. Эти компоненты биопленки способствуют ее прикреплению к субстрату, а также защищают клетки бактерий от иммунного ответа хозяина и пагубных воздействий окружающей среды. Кроме того, внеклеточный матрикс позволяет удерживать бактериальные клетки в непосредственной близости друг от друга, тем самым обеспечивая межклеточные коммуникации у микроорганизмов (так называемое чувство кворума) и облегчая обмен генетическим материалом путем горизонтального переноса генов [4; 5]. Для фитопатогенных бактерий образование биопленок является ключевым этапом успешной колонизации организма хозяина [3].

Регуляция процессов формирования биопленок весьма сложна и до конца не изучена. Известна роль вторичного посредника – циклического дигуанилатмонофосфата – в генетической регуляции образования биопленок у некоторых фитопатогенных бактерий (например, *E. amylovora*, *Dickeya dadantii*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris*, *Xylella fastidiosa*). Показано, что небольшие регуляторные РНК и РНК-связывающие белки (например, RsmA) также вовлечены в регуляцию процессов формирования биопленок у бактерий *E. amylovora*, *X. campestris*, *X. oryzae* pv. *oryzae* [3]. У бактерий *Escherichia coli* были выявлены два белка, принимающих участие в регуляции образования биопленок, – BssR (ранее YliH) и BssS (ранее YceP) [6]. Регулятор BssS (*regulator of biofilm through signal secretion*) обнаружен у многих грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *S. enterica* serovar Enteritidis, *Pectobacterium atrosepticum*, *Klebsiella pneumoniae*) [7–10]. Функция белка BssS остается невыясненной, хотя в некоторых исследованиях показано, что он принимает участие в формировании биопленок и регуляции подвижности бактериальных клеток [6; 9; 10].

Целью данной работы являлась фенотипическая и фитопатологическая характеристика штамма бактерий *E. amylovora*, мутантного по гену регулятора BssS.

Материалы и методы исследования

Использованные в исследовании штаммы бактерий, плазмиды и праймеры приведены в табл. 1 и 2. Бактерии выращивались при температуре 28 °С в полноценной питательной среде LB и синтетической минимальной среде M9 с добавлением глицерина (2 мл/л) или глюкозы (4 г/л) в качестве источника углерода. Выбор источников углерода основывался на предполагаемом влиянии глюкозы на фенотипическое проявление мутации по гену *bssS*. Состав среды LB (г/л): пептон – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 8,5. Состав среды M9 (г/л): Na₂HPO₄ · 7H₂O – 12,8; KH₂PO₄ – 3,0; NH₄Cl – 1,0; NaCl – 0,5; MgSO₄ · 7H₂O – 0,246; CaCl₂ – 0,011 [11].

Таблица 1

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды

Table 1

Bacterial strains and plasmids used in this study

Штамм или плаزمида	Характеристика	Источник
<i>Штаммы бактерий</i>		
<i>E. amylovora</i> E2	Штамм дикого типа, выделенный из тканей растений <i>Malus</i> sp. в Беларуси в 2007 г.	Коллекция кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ
<i>E. amylovora</i> E2 Δ <i>bssS</i>	Δ <i>bssS</i> -мутант, Km ^R	Данная работа

Окончание табл. 1
Ending of the table 1

Штамм или плаزمида	Характеристика	Источник
<i>Плазмиды</i>		
pKD46	Ap ^R , P _{BAD} , gam, bet, exo, pSC101, oriTS	[12]
pKD13	Km ^R , FRT, cat, FRT, PS1, PS2, oriR6K, rgbN	[12]

Примечание. Km^R и Ap^R – устойчивость к канамицину и ампициллину соответственно.

Таблица 2

Использованные в работе праймеры

Table 2

Primers used in this study

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Назначение
BssF	ATCGGTTGATTAATGCTTCTTGTAGTCGCGATCCAGGTAG CCGGTTCGCTTGCGATTGTGTAGGCTGGAGCT	Внесение делеции в ген <i>bssS</i> , детекция делеции гена <i>bssS</i>
BssR	TGCCGCGCCAGACGTTAAACCCTGCGCGCTAATAGAACT GCTGTTATAATATTCGGGGATCCGTCGACC	
Km1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Детекция делеции гена <i>bssS</i> [12]
Km2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	

Поиск в базах данных последовательностей, гомологичных последовательности гена *bssS* в геноме штамма *E. amylovora* E2 (код доступа в базе данных GenBank – NZ_CP024970.1), осуществлялся с помощью пакета программ *BLAST* [13].

Для получения делеционного мутанта бактерий *E. amylovora* по гену *bssS* был использован метод «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes», предложенный К. А. Даценко и Б. Л. Воннером [12].

Проверка вирулентности полученного делеционного мутанта проводилась на незрелых плодах груши по стандартной схеме [14]. Количество бактерий в растительном материале определялось по методике, описанной в работе [15]. Растительная ткань (300 мг) гомогенизировалась в 1 мл физиологического раствора. Высев бактерий осуществлялся на поверхность 1,5 % полноценной агаризованной среды на 4-е и 6-е сутки после инокуляции.

Количественная оценка интенсивности формирования биопленок проводилась методом, изложенным в работе [16], с некоторыми модификациями. Ночная культура бактерий *E. amylovora* разводилась средой инкубации (синтетической минимальной средой М9) до оптической плотности 0,05. Полученные суспензии вносились в лунки стерильного 96-луночного планшета и инкубировались при температуре 28 °С в течение 48 или 72 ч (в зависимости от длительности эксперимента). По завершении инкубации измерялась оптическая плотность культуры клеток в каждой из лунок, после чего суспензия клеток удалялась из лунок. Для окрашивания клеток биопленки лунки заполнялись равным объемом раствора красителя генцианового фиолетового (1 %). После удаления красителя в лунки планшета вносился равный объем 96 % этанола, а затем определялась оптическая плотность раствора при длине волны 595 нм. Полученные значения нормализовались по ранее измеренной оптической плотности культур, и эти данные представлялись как конечный результат.

Подвижность клеток бактерий *E. amylovora* изучалась с использованием синтетической минимальной полужидкой агаризованной (0,3 %) среды М9. Суспензия бактериальных клеток объемом 10 мкл наносилась на поверхность агаризованной среды. Диаметр макроколонии бактерий учитывался через 24; 48 и 72 ч инкубации при температуре 28 °С [15].

Влияние красителя генцианового фиолетового на выживаемость клеток исследуемых штаммов бактерий *E. amylovora* оценивалось по количеству колоний микроорганизмов, выросших на питательном агаре, содержащем генциановый фиолетовый в соответствующей концентрации, по сравнению с контролем (высев на такую же среду без красителя). Количество колониеобразующих единиц определялось методом спот-тестирования [17].

Статистическая обработка результатов выполнялась в программе *GraphPad Prism* (версия 8.0). Каждый эксперимент проводился в 5–8-кратной повторности. Для проверки отклонения от нормального распределения применялся обладающий наибольшей мощностью тест Шапиро – Уилка. В случае выявления нормального распределения оценка достоверности различий проводилась с помощью *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок в модификации Уэлча (сравнение средних арифметических величин без какого-либо предположения о равенстве дисперсий). При выявлении распределения, отличного от нормального, для оценки достоверности различий использовался *U*-критерий Манна – Уитни. Планки погрешностей демонстрируют стандартную ошибку среднего значения. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Биоинформатический анализ генома штамма *E. amylovora* E2 позволил выявить ген, кодирующий регулятор BssS. В геноме возбудителя бактериального ожога плодовых культур ген *bssS* локализован на участке хромосомы с 1 552 751 по 1 553 005 пар нуклеотидов (п. н.) (рис. 1).

Для инактивации гена *bssS* были сконструированы праймеры BssF и BssR к гену устойчивости к канамицину в составе плазмиды pKD13, несущие на 5'-конце последовательности (50 нуклеотидов), соответствующие началу или концу делегируемой области генома бактерий *E. amylovora* (участок хромосомы с 1 552 742 по 1 553 141 п. н.) (см. табл. 2). Клетки штамма *E. amylovora* E2, содержащие хелперную плазмиду pKD46 и выращенные в условиях индукции рекомбиназы бактериофага λ , были трансформированы полученным с помощью таких праймеров ПЦР-продуктом. В результате проделанной работы отобран штамм, устойчивый к канамицину. Наличие делеции гена *bssS* подтверждено ПЦР с праймерами BssF и BssR к областям, фланкирующим делецию (участки хромосомы с 1 552 742 по 1 552 791 п. н. и с 1 553 092 по 1 553 141 п. н.), а также с внутренними праймерами Km1 и Km2 к гену устойчивости к канамицину (см. табл. 2, рис. 2).

Как видно из приведенных данных, в реакции с использованием праймеров BssF и BssR был получен ПЦР-продукт размером около 1420 п. н., в реакции с использованием праймеров BssF и Km2 – ПЦР-продукт размером 770 п. н., а в реакции с использованием праймеров BssR и Km1 – ПЦР-продукт размером 550 п. н., что соответствует ожидаемому результату.

Далее была осуществлена фенотипическая и фитопатологическая характеристика полученного мутантного штамма.

На первом этапе работы проведена оценка вирулентности делеционного мутанта бактерий *E. amylovora*. Как видно из рис. 3, при искусственном заражении незрелых плодов груши способность клеток делеционного мутанта вызывать симптомы бактериального ожога не отличалась от таковой клеток штамма дикого типа. Численность клеток штамма дикого типа и мутантного штамма бактерий *E. amylovora* спустя 0; 4 и 6 сут после инокуляции также оставалась сравнительно одинаковой (табл. 3). Из приведенных данных следует, что отсутствие в клетках регулятора BssS не сказывается на плотности популяции фитопатогена в пораженных тканях растения-хозяина.

Таблица 3

Численность жизнеспособных клеток штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ bssS в растительной ткани

Table 3

The number of viable *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ bssS cells in plant tissue

Время, прошедшее после инокуляции, сут	Количество жизнеспособных клеток (в пересчете на 1 г зараженной ткани)	
	<i>E. amylovora</i> E2	<i>E. amylovora</i> E2 Δ bssS
0	5,74 ± 0,03	5,65 ± 0,02
4	9,87 ± 0,08	9,98 ± 0,03
6	9,99 ± 0,03	10,10 ± 0,05

Примечание. Данные представлены как средняя арифметическая величина ± стандартная ошибка среднего значения.

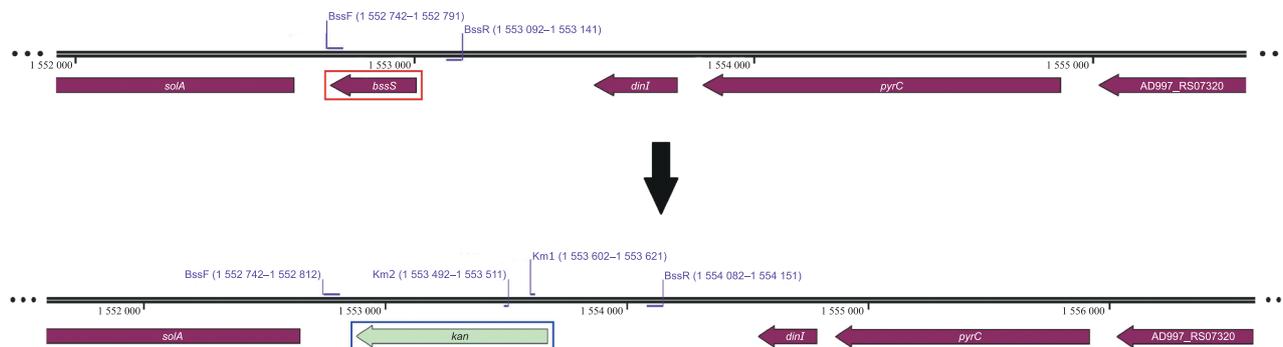


Рис. 1. Структура участка хромосомы штамма *E. amylovora* E2, содержащего ген *bssS* (обозначен рамкой красного цвета).

В результате мутагенеза с использованием метода «PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes» ген *bssS* был замещен на ген устойчивости к канамицину *kan* (обозначен рамкой синего цвета).

Фиолетовым цветом отмечены места посадки использованных праймеров.

Изображение получено с помощью программы *SnapGene* (*GSL Biotech, LLC, США*)

Fig. 1. Structure of *E. amylovora* E2 strain chromosome segment, containing *bssS* gene (highlighted in red colour).

As the result of mutagenesis using the PCR-based one-step inactivation of chromosomal genes method, the *bssS* gene was replaced by the *kan* kanamycin resistance gene (highlighted in blue colour).

Primer locations used in the study are indicated in purple colour.

Image was created using *SnapGene* software (*GSL Biotech, LLC, USA*)

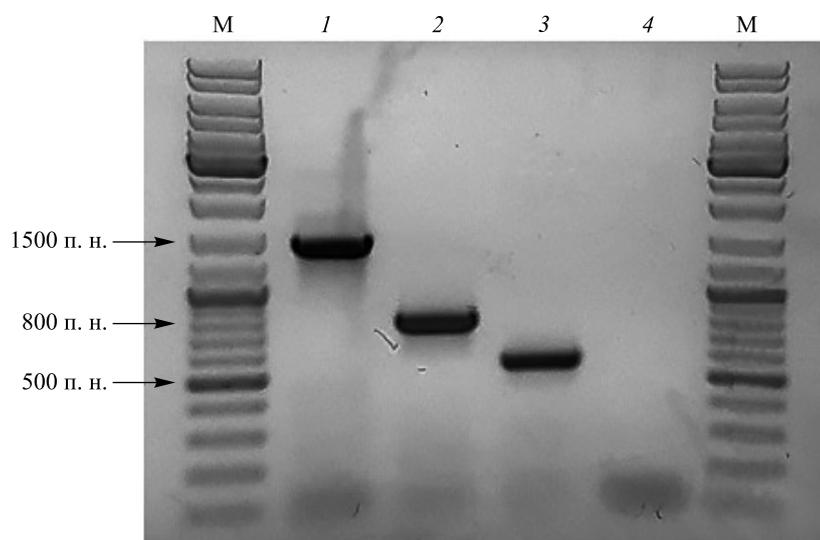


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации геномной ДНК штамма *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ в целях подтверждения делеции гена *bssS*:

М – маркер молекулярной массы GeneRuler DNA Ladder Mix (100–10 000 пар оснований; *Thermo Scientific, США*);

1 – амплифицированный фрагмент ДНК штамма *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$, полученный с использованием праймеров BssF и BssR;

2 – амплифицированный фрагмент ДНК штамма *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$, полученный с помощью праймеров BssF и Km2;

3 – амплифицированный фрагмент ДНК штамма *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$, полученный с использованием праймеров BssR и Km1;

4 – отрицательный контроль реакции без матричной ДНК

Fig. 2. Electropherogram of PCR products amplified from *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ genomic DNA to confirm deletion of the *bssS* gene:

М – molecular weight marker GeneRuler DNA Ladder Mix (100–10 000 base pairs; *Thermo Scientific, USA*);

1 – amplified DNA fragment of *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ strain, obtained using primers BssF and BssR;

2 – amplified DNA fragment of *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ strain, obtained using primers BssF and Km2;

3 – amplified DNA fragment of *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ strain, obtained using primers BssR and Km1; 4 – negative control without DNA matrix



Рис. 3. Симптомы бактериального ожога на плодах груши при искусственном заражении клетками штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ bsS
Fig. 3. Symptoms of fire blight on immature pear fruits caused by *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ bsS cells

Экзополисахариды, синтезируемые клетками бактерий *E. amylovora*, традиционно рассматриваются как факторы вирулентности данного фитопатогена, предоставляющие ему возможность успешно колонизировать сосуды ксилемы растений-хозяев, а также обеспечивающие прочную адгезию бактериальных клеток на колонизируемой поверхности, что позволяет им оставаться неподвижными. Наряду с липополисахаридами экзополисахариды входят в состав матрикса биопленок бактерий *E. amylovora* [18]. Формируемая клетками биопленка предохраняет их от стрессовых воздействий и также рассматривается как фактор вирулентности фитопатогена. Проведенные эксперименты по изучению образования биопленок в минимальной среде М9 выявили, что уровень их формирования клетками штамма *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ был достоверно ниже контрольных значений спустя 48 ч инкубации на среде с глицерином в качестве единственного источника углерода (рис. 4, а). В исследовании [6] было установлено, что присутствие глюкозы в среде культивирования вызывает достоверное увеличение интенсивности образования биопленок у штамма *E. coli* K-12 $\Delta bssS$. Сходные данные получены нами для штамма *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$. При культивировании клеток делеционного мутанта на минимальной среде М9 с глюкозой в качестве источника углерода через 48 и 72 ч инкубации уровень формирования биопленок оказался соответственно в 3,0 и 2,8 раза выше по сравнению с таковым у штамма дикого типа (рис. 4, б). Выявленные эффекты, вероятно, связаны с катаболитной репрессией у бактерий *E. amylovora*, однако это требует дальнейшего изучения. У бактерий *E. coli* в данный процесс вовлечен активный комплекс циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и белка – активатора катаболитной репрессии (*cAMP receptor protein*, CRP). Наличие глюкозы в среде культивирования препятствует активации мембранно-связанной аденилатциклазы, что снижает концентрацию цАМФ в бактериальной клетке и подавляет экспрессию белка CRP. В отсутствие глюкозы концентрация цАМФ повышается, что позволяет ему связаться с регулятором CRP. В результате образовавшийся комплекс цАМФ – CRP регулирует транскрипцию генов путем связывания с их промоторными областями [6].

В формировании биопленок важную роль играет подвижность бактериальных клеток. Поверхностные структуры бактериальных клеток, такие как жгутики, фимбрии, пили, отвечают за их необратимое прикрепление к различным субстратам. Показано, что снижение подвижности клеток влечет за собой увеличение интенсивности образования биопленок [2], поэтому на следующем этапе работы было исследовано влияние делеции гена *bssS* на подвижность клеток бактерий *E. amylovora*. В результате выявлено, что диаметр макроколонии, образуемой клетками штамма *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ в течение всего времени инкубации на минимальной среде М9 с глицерином, достоверно не отличался от значений данного показателя, полученных для штамма *E. amylovora* E2 (рис. 5, а и б). В исследовании [6] установлено, что делеционный мутант *E. coli* K-12 $\Delta bssS$ характеризовался увеличенным диаметром макроколонии по сравнению со штаммом дикого типа. Выращивание клеток мутантного штамма бактерий *E. amylovora* на минимальной среде М9 с глюкозой в качестве источника углерода привело к увеличению диаметра образуемой им макроколонии по сравнению с контролем на протяжении всего времени инкубации (рис. 5, в и г). Отмеченный эффект также может быть связан с катаболитной репрессией у бактерий *E. amylovora*, однако это требует дальнейшего изучения.

В работе [19] было выявлено антибактериальное действие красителя генцианового фиолетового на ряд микроорганизмов (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*), возрастающее с увеличением значения рН среды культивирования. Такой эффект авторы объясняют ростом отрицательного заряда на поверхности бактериальных клеток, что приводит к повышению их чувствительности к красителю. Также известно, что у бактерий *E. coli* генциановый фиолетовый адсорбируется на поверхности клеток, но не транспортируется в цитоплазму. В то же время при воздействии генцианового фиолетового на мутантные штаммы бактерий *E. coli* с измененной наружной мембраной он обнаруживается в рибосомальной фракции бактериальных клеток, что, вероятно, приводит к менее эффективному участию рибосом в синтезе белка и, соответственно, объясняет токсичность красителя. Предполагается, что наружная бактериальная мембрана (в частности, такие ее компоненты, как липополисахариды, фосфолипиды и некоторые белки), а также муреин клеточной стенки являются барьером для проникновения красителя внутрь клеток [20]. В нашем эксперименте по изучению влияния генцианового фиолетового на выживаемость клеток штамма *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ было выявлено, что краситель в концентрациях 20 и 30 мкг/мл снижает выживаемость клеток мутантного штамма в 2,6 и 2,8 раза соответственно по сравнению с выживаемостью клеток штамма дикого типа (рис. 6). В связи с полученными данными можно выдвинуть предположение о том, что делеция гена *bssS* привела к увеличению проницаемости наружной мембраны мутантного штамма бактерий *E. amylovora*, однако для подтверждения этой гипотезы требуется провести дополнительные эксперименты.

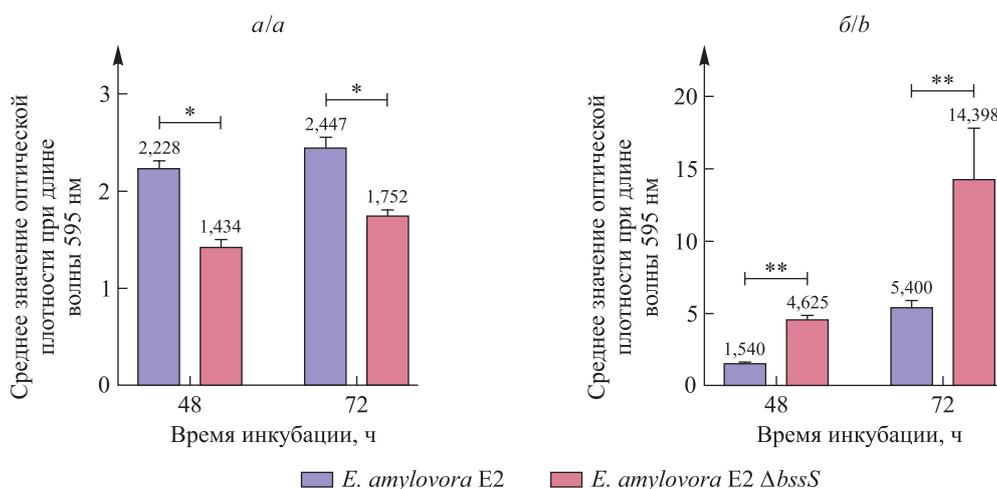


Рис. 4. Интенсивность формирования биопленок *in vitro* клетками штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ bssS в минимальной среде M9, содержащей глицерин (а) или глюкозу (б) в качестве источника углерода (U-критерий Манна – Уитни). Знаком * отмечены достоверные различия при $p < 0,01$, а знаком ** – достоверные различия при $p < 0,001$

Fig. 4. Quantification of *in vitro* biofilm production for *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ bssS cells in M9 minimal medium containing glycerol (a) or glucose (b) as a carbon source (Mann – Whitney U-test). The sign * indicates significant differences at $p < 0.01$, and the sign ** indicates significant differences at $p < 0.001$

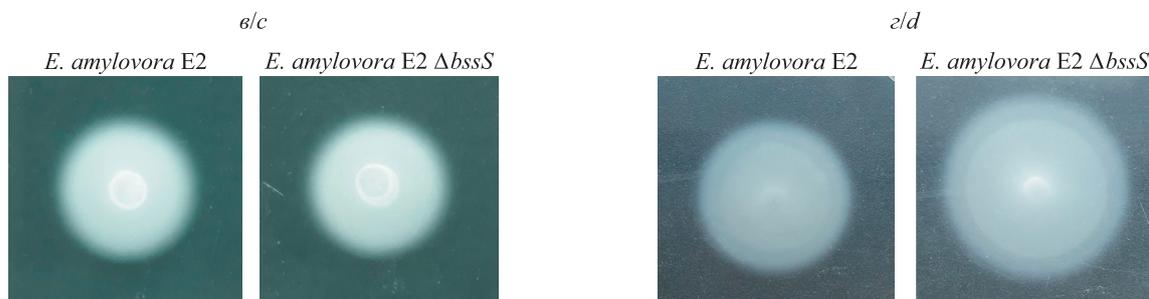
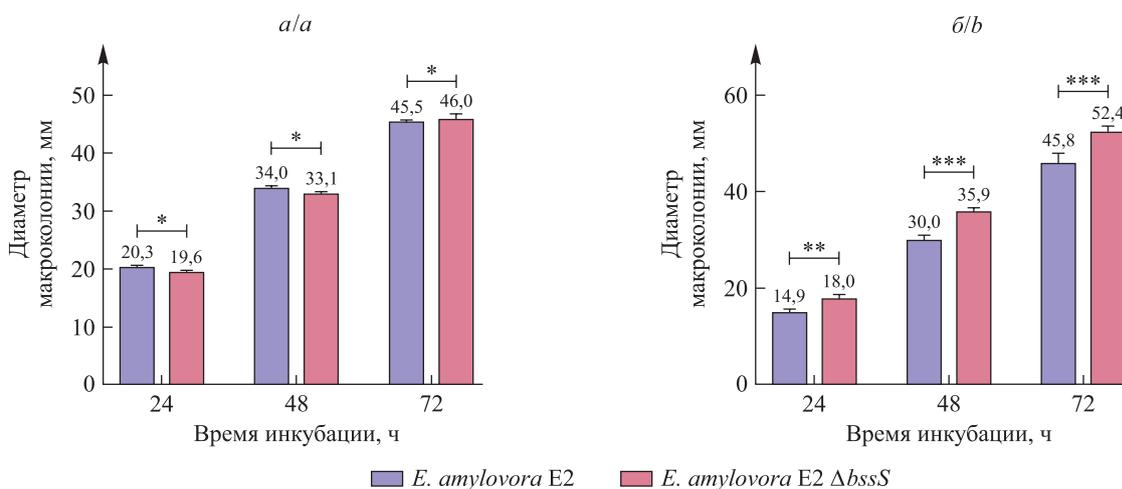


Рис. 5. Подвижность клеток штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 Δ bssS на минимальной среде M9, содержащей глицерин (а) или глюкозу (б) в качестве источника углерода (U-критерий Манна – Уитни). Знаком * обозначено отсутствие достоверных различий ($p > 0,05$), знаком ** отмечены достоверные различия при $p < 0,01$, а знаком *** – достоверные различия при $p < 0,001$. Фотографии бактериальных макроколоний спустя 48 ч инкубации при температуре 28 °C на минимальной среде M9 с добавлением глицерина (в) или глюкозы (г)

Fig. 5. Swimming motility for *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ bssS cells in M9 minimal medium containing glycerol (a) or glucose (b) as a carbon source (Mann – Whitney U-test).

The sign * indicates the absence of significant differences ($p > 0.05$), the sign ** indicates significant differences at $p < 0.01$, and the sign *** indicates significant differences at $p < 0.001$.

Macrocolonies of *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 Δ bssS strains on the plate containing M9 minimal medium with glycerol (c) or glucose (d). Photographs were taken 48 h after inoculation at a temperature of 28 °C

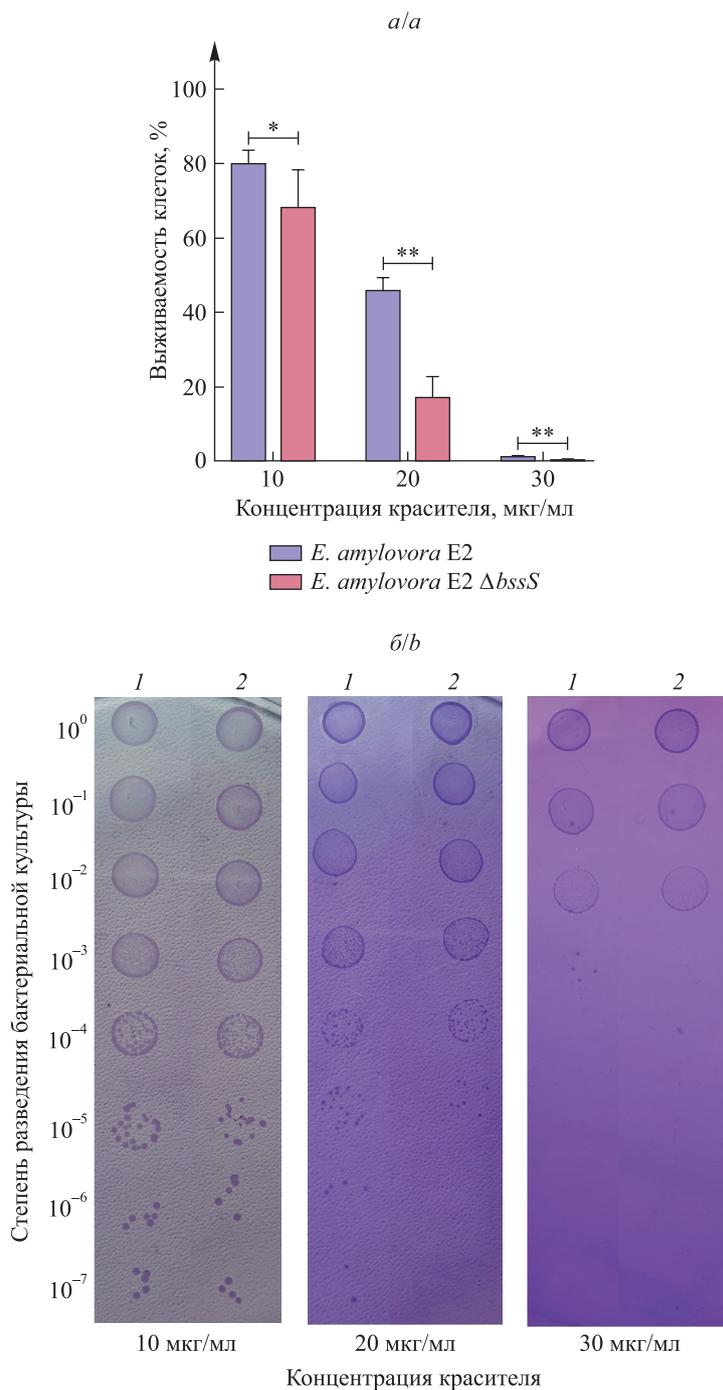


Рис. 6. Выживаемость клеток штаммов *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ при их обработке красителем генциановым фиолетовым в соответствующей концентрации (*t*-критерий Стьюдента в модификации Уэлча) (а).

Знаком * обозначено отсутствие достоверных различий ($p > 0,05$), а знаком ** отмечены достоверные различия при $p < 0,01$.

Колонии бактерий *E. amylovora* E2 и *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ на среде с красителем генциановым фиолетовым, полученные методом спот-тестирования (б)

Fig. 6. Survival of *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ cells in the presence of gentian violet dye in appropriate concentrations (Student's *t*-test with Welch's correction) (a).

The sign * indicates the absence of significant differences ($p > 0.05$), and the sign ** indicates significant differences at $p < 0.01$.

Spot titer assays using *E. amylovora* E2 and *E. amylovora* E2 $\Delta bssS$ strains and plated on LB agar media containing gentian violet dye in appropriate concentrations (b)

Заключение

В ходе анализа геномной последовательности штамма *E. amylovora* E2 был выявлен и аннотирован ген *bssS*, кодирующий регулятор, потенциально вовлеченный в формирование биопленок. Делеция данного гена привела к заметным изменениям в фенотипе бактерий *E. amylovora*. При наличии глюкозы в среде культивирования подвижность клеток мутантного штамма и уровень формирования биопленок увеличились. Выявленный эффект, вероятно, связан с катаболитной репрессией у бактерий *E. amylovora*, так как у бактерий *E. coli* белок BssS регулирует экспрессию генов, вовлеченных в катаболитную репрессию [6]. Клетки делеционного мутанта обладали высокой чувствительностью по отношению к красителю генциановому фиолетовому, что может быть обусловлено изменением проницаемости внешней мембраны. На основании полученных результатов изучения подвижности клеток и интенсивности формирования биопленок в средах с различными источниками углерода можно предположить, что белок BssS регулирует экспрессию генов, вовлеченных в катаболитную репрессию, а также стрессовые реакции, однако для подтверждения такого предположения требуется проведение дальнейших исследований.

Библиографические ссылки

1. Eastgate JA. *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fireblight disease. *Molecular Plant Pathology*. 2000;1(6):325–329. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2000.00044.x.
2. Dufour D, Leung V, Lévesque CM. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2010; 22(1):2–16. DOI: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x.
3. Castiblanco LF, Sundin GW. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2016;58(4):362–372. DOI: 10.1111/jipb.12428.
4. Petrova OE, Sauer K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology*. 2012; 194(10):2413–2425. DOI: 10.1128/JB.00003-12.
5. Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Frontiers in Chemistry*. 2019;7:824. DOI: 10.3389/fchem.2019.00824.
6. Domka J, Lee J, Wood TK. YliH (BssR) and YceP (BssS) regulate *Escherichia coli* K-12 biofilm formation by influencing cell signaling. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(4):2449–2459. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2449-2459.2006.
7. Beloin C, Roux A, Ghigo J-M. *Escherichia coli* biofilms. In: Romeo T, editor. *Bacterial biofilms*. Berlin: Springer; 2008. p. 249–289 (Compans RW, Cooper MD, Honjo T, Koprowski H, Melchers F, Oldstone MBA, et al., editors. Current topics in microbiology and immunology; volume 322). DOI: 10.1007/978-3-540-75418-3_12.
8. Gorshkov V, Kwenda S, Petrova O, Osipova E, Gogolev Yu, Moleleki LN. Global gene expression analysis of cross-protected phenotype of *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169536. DOI: 10.1371/journal.pone.0169536.
9. Wang S, Phillippy AM, Deng K, Rui X, Li Z, Tortorello ML, et al. Transcriptomic responses of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium to chlorine-based oxidative stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010;76(15):5013–5024. DOI: 10.1128/AEM.00823-10.
10. Guilhen C, Charbonnel N, Parisot N, Gueguen N, Iltis A, Forestier C, et al. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics*. 2016;17:237. DOI: 10.1186/s12864-016-2557-x.
11. Sambrook J, Russell DW, editors. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.
12. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*. 2000;97(12):6640–6645. DOI: 10.1073/pnas.120163297.
13. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Ya, Merezuk Yu, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(supplement 2):W5–W9. DOI: 10.1093/nar/gkn201.
14. Zhao Y, Sundin GW, Wang D. Construction and analysis of pathogenicity island deletion mutants of *Erwinia amylovora*. *Canadian Journal of Microbiology*. 2009;55(4):457–464. DOI: 10.1139/w08-147.
15. Lee JH, Zhao Y. Integration host factor is required for RpoN-dependent *hrpL* gene expression and controls motility by positively regulating *rsmB* sRNA in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. 2016;106(1):29–36. DOI: 10.1094/PHYTO-07-15-0170-R.
16. Castiblanco LF, Sundin GW. Cellulose production, activated by cyclic di-GMP through BcsA and BcsZ, is a virulence factor and an essential determinant of the three-dimensional architectures of biofilms formed by *Erwinia amylovora* Ea1189. *Molecular Plant Pathology*. 2018;19(1):90–103. DOI: 10.1111/mpp.12501.
17. Burby PE, Simmons ZW, Schroeder JW, Simmons LA. Discovery of a dual protease mechanism that promotes DNA damage checkpoint recovery. *PLoS Genetics*. 2018;14(7):e1007512. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007512.
18. Piqué N, Miñana-Galbis D, Merino S, Tomás JM. Virulence factors of *Erwinia amylovora*: a review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(6):12836–12854. DOI: 10.3390/ijms160612836.
19. Adams E. The antibacterial action of crystal violet. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1967;19(12):821–826. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1967.tb09550.x.
20. Gustafsson P, Nordström K, Normark S. Outer penetration barrier of *Escherichia coli* K-12: kinetics of the uptake of gentian violet by wild type and envelope mutants. *Journal of Bacteriology*. 1973;116(2):893–900. DOI: 10.1128/jb.116.2.893-900.1973.