

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
СТАТЬИ

РАМНАН КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ АКТИНОБАКТЕРИЙ
РОДА *CURTObACTERIUM*

© 2021 г. В. А. Зайчиков^а, Н. В. Потехина^{а, *}, А. С. Дмитренко^б, Дин Фань^а,
Е. М. Тульская^а, Л. В. Дорофеева^с, Л. И. Евтушенко^с

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, 119234 Россия

^бИнститут органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва, 119991 Россия

^сВсероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрябина, ФИЦ Пушчинский научный центр биологических исследований РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: potekhina56@mail.ru

Поступила в редакцию 30.09.2020 г.

После доработки 24.11.2020 г.

Принята к публикации 26.11.2020 г.

С использованием химических и ЯМР-спектроскопических методов впервые установлено, что представители рода *Curtobacterium* (семейство *Microbacteriaceae*) содержат в клеточных стенках нейтральный гликополимер рамнан. Рамнан со структурой повторяющегося звена, $\rightarrow 2$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow , обнаружен у *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ВКМ Ас-1923^T, *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* ВКМ Ас-1924^T, *C. pusillum* ВКМ Ас-2099^T, *C. herbarum* ВКМ Ас-2512^T и *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811. Каждый из изученных штаммов содержал также второй гликополимер – кислый бесфосфатный полисахарид. ЯМР-спектры этих полисахаридов различались, указывая на отличия в их структурах. В гидролизатах клеточных стенок всех изученных штаммов выявлены рамноза, манноза, глюкоза, галактоза и глюкозамин. Дальнейшие исследования позволят более полно охарактеризовать состав гликополимеров клеточных стенок различных видов куртобактерий и оценить их таксономическую значимость. Данные по структурам полимеров будут также способствовать пониманию механизмов колонизации и инфекции куртобактериями высших организмов, а также взаимодействия бактерий в микробных сообществах и с различными абиотическими объектами окружающей среды.

Ключевые слова: *Curtobacterium*, клеточная стенка, гликополимеры, рамнан

DOI: 10.31857/S0026365621030162

Изучение гликополимеров у микроорганизмов различных групп представляет интерес для многих областей фундаментальной и прикладной науки. Клеточные стенки актинобактерий и других грамположительных бактерий обычно содержат вторичные гликополимеры разных типов (классов), ковалентно связанные с пептидогликаном (Kohler et al., 2009; Potekhina et al., 2011; Тульская с соавт., 2011; Schade, Weidenmaier, 2016; Sadovskaya et al., 2017; Шашков с соавт., 2020).

Принятые сокращения: HSQC – протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; J – константа спин-спинового взаимодействия; ROESY – двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; COSY – корреляционная спектроскопия; TOCSY – тотальная корреляционная спектроскопия; НМВС – гетероядерная корреляция через несколько связей; δ_C , δ_H – значения химических сдвигов атомов ^{13}C и 1H соответственно.

Наиболее изученными из них являются фосфат-содержащие полимеры, традиционно называемые тейхоевыми кислотами (Rautenberg et al., 2010; Potekhina et al., 2011). В меньшей степени известно о роли и распространении различных типов бесфосфатных гликополимеров.

Для рамнозосодержащих полимеров, обнаруженных у ряда грамположительных бактерий, было показано, что они являются своеобразными аналогами тейхоевых кислот по локализации и основным функциям в клетке (играют важную роль в биогенезе клеточной стенки и делении клетки, определяют адгезивные свойства и патогенность бактерий, являются рецепторами фагов) (Caliot et al., 2012; van Sorge et al., 2014; Mistou et al., 2016; Sadovskaya et al., 2017).

При сравнительном изучении состава клеточных стенок актинобактерий семейства *Microbacte-*

riaceae (роды *Clavibacter*, *Microbacterium* и *Rathayibacter*) были выявлены разнообразные по структуре рамнозосодержащие гликополимеры и показана их специфичность для изученных видов (Takeuchi et al., 1990; Ким с соавт., 2019; Шашков с соавт., 2020). Рамноза была обнаружена также у представителей других родов семейства *Microbacteriaceae*, в частности, *Curtobacterium* (Diaz-Maurino, Perkins, 1974; Takeuchi, Yokota, 1989; Takeuchi, Yokota, 1993; Aizawa et al., 2007).

Род *Curtobacterium* содержит в настоящее время 7 видов (*C. albidum*, *C. ammoniigenes*, *C. citreum*, *C. flaccumfaciens*, *C. herbarum*, *C. luteum*, *C. pusillum*) (<https://lpsn.dsmz.de/genus/curtobacterium>). Описанные виды ассоциированы с растениями или их местообитаниями, и лишь *C. pusillum* выделен из нефтяного месторождения (Iizuka, Komagata, 1965; Evtushenko, Takeuchi, 2006; Saddler et al., 2017). Ряд сообщений, однако, свидетельствует о том, что куртобактерии широко распространены в различных почвах и подпочвенных горизонтах (Chase et al., 2016; Yu et al., 2016; Wang et al., 2017), обнаруживаются в многолетней мерзлоте и ледниках Арктики (Sanyika et al., 2012; Wilhelm et al., 2012). Описано несколько случаев выделения представителей *Curtobacterium* из клинического материала (Funke et al., 2005; Francis et al., 2011; Rivera et al., 2012).

Некоторые виды *Curtobacterium* ранее были охарактеризованы по наличию и типу вторичных гликополимеров (отсутствие тейхоевых кислот и наличие бесфосфатных полисахаридов) (Diaz-Maurino, Perkins, 1974; Takeuchi, Yokota, 1989). Однако химические структуры полимеров установлены не были.

Целью настоящей работы было изучение гликополимеров клеточных стенок у 5 штаммов рода *Curtobacterium* с разной видовой принадлежностью и отличающихся по экологическим (биологическим) характеристикам и источникам выделения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы для исследований были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) (<https://www.vkm.ru>) и включали фитопатогенов *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ВКМ Ас-1923^T и *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* ВКМ Ас-1924^T, сапрофитов *C. herbarum* ВКМ Ас-2512^T (выделен из травяной подстилки) и *C. pusillum* ВКМ Ас-2099^T (из водного пласта нефтяного месторождения), а также *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811 с неустановленной видовой принадлежностью, изолированного из нематодного галла на стебле вейника (*Calamagrostis* sp.).

Выращивание культур и получение клеточных стенок проводили, как описано ранее (Potekhina et al., 2011).

Гликополимеры экстрагировали из клеточных стенок с помощью трихлоруксусной кислоты (10% ТХУ при 4°C 24 ч, и затем 5% ТХУ при 100°C 20 мин). Экстракты объединяли, диализовали, лиофилизировали с получением препарата гликополимеров (Potekhina et al., 2011).

Кислотный гидролиз клеточных стенок и препаратов гликополимеров проводили с использованием 2 М HCl (3 ч, 100°C). Для нисходящей хроматографии и электрофореза использовали бумагу "Filtrak FN-3" (Германия) и различные системы растворителей (Potekhina et al., 2011). Фосфатсодержащие соединения проявляли реактивом Ишервуда; соединения, содержащие аминогруппу – нингидрином; полиолы и моносахариды – 5%-ным AgNO₃; восстанавливающие моносахариды – анилинфталатом (Potekhina et al., 2011).

Абсолютную конфигурацию рамнозы определяли модифицированным методом с использованием ГЖХ ацетилированных гликозидов с (*S*)-октан-2-ол, как описано (Potekhina et al., 2011).

Разделение препаратов гликополимеров (на колонке с DEAE-целлюлозой) и ЯМР-эксперименты проводили, как описано ранее (Шашков с соавт., 2020).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ кислотных гидролизатов клеточных стенок всех пяти штаммов и выделенных из них препаратов гликополимеров показал, что они содержат одинаковый набор сахаров (рамноза как доминирующий сахар, манноза, глюкоза, галактоза и глюкозамин) в разных соотношениях. У штамма *C. herbarum* ВКМ Ас-2512^T дополнительно присутствовала фукоза (табл. 1). Фосфорные эфиры глицерина и других полиолов обнаружены не были. Полученные результаты указывали на отсутствие тейхоевых кислот и наличие бесфосфатных гликополимеров.

Исследование препаратов гликополимеров с использованием методов ЯМР-спектроскопии показало, что каждый из пяти штаммов содержит в клеточной стенке нейтральный полисахарид рамнан, а также второй полимерной кислотой природы. Развернутое описание анализа ЯМР-спектроскопических данных приведено для препарата из клеточной стенки штамма ВКМ Ас-1811.

В аномерной области спектра ЯМР ¹³C препарата гликополимеров, выделенного с помощью экстракции ТХУ, было обнаружено два набора сигналов различной интенсивности: более интенсивные сигналы при δ_C 102.2 и 103.3 м.д. и несколько менее интенсивных при δ_C 97–104 м.д. Спектр содержал сигнал карбоксильной группы

Таблица 1. Сахара клеточных стенок пяти изученных штаммов *Curtobacterium*

Штаммы <i>Curtobacterium</i>	Сахара клеточной стенки (2 М HCl, 3 ч, 100°C)							
	Gal	Glc	Man	Fuc	Rib	Rha	Амино-сахар	Gro
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> ВКМ Ас-1923 ^Т	+++	+	++	–	+	+++	GlcN, GalN	сл
<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i> ВКМ Ас-1924 ^Т	+++	+	++	–	+	++++	GlcN, GalN	сл
<i>C. herbarum</i> ВКМ Ас-2512 ^Т	сл	++	++++	+	сл	++++	GlcN, GalN	+
<i>Curtobacterium</i> sp. ВКМ Ас-1811	+++	+	++	–	–	++++	GlcN	+
<i>C. pusillum</i> ВКМ Ас-2099 ^Т	сл	+	++	–	–	++++	GlcN	+

Таблица 2. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ¹³C и ¹H нейтрального полисахарида рамнана, из клеточной стенки *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811

Остаток	Химические сдвиги ЯМР ¹³ C (δ_C TSP* – 1.6) и ¹ H (δ_H TSP 0.0)					
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6
<i>Нейтральный полисахарид, рамнан</i>						
→2)-α-L-Rhap-(1→ R	102.2	79.4	71.3	73.0	70.4	18.0
	5.18	4.07	3.94	3.56	3.81	1.27
→3)-α-L-Rhap-(1→ R'	103.3	71.2	78.9	73.6	70.7	18.1
	4.96	4.15	3.85	3.50	3.76	1.31

* TSP – натриевая соль 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты.

при δ_C 175 м.д. и метила пируватной группы при δ_C 26.4 м.д. и выглядел как спектр смеси кислого и нейтрального полимеров. В результате хроматографического разделения препарата гликополимеров было получено две фракции – с нейтральным и кислым полисахаридами.

Спектр ¹³C ЯМР нейтрального полисахарида (табл. 2, рис. 1) был типичным для регулярного полимера с дисахаридным повторяющимся звеном. Спектр содержал два сигнала в области аномерного углеродного резонанса при δ_C 102.2 и 103.3 м.д., восемь сигналов в области –CH–O– при δ_C 70–80 м.д. и два сигнала при δ_C 18.0 и 18.1 м.д.

Спектр ЯМР ¹H (рис. 2) отображал два сигнала в аномерной области при δ_H 4.96 и 5.18 м.д. с малыми значениями *J*, два высокопольных дублета (δ_H 1.27 м.д., *J* 6 Гц и δ_H 1.31 м.д., *J* 6 Гц) и сигналы в области δ_H 3.55–4.2 м.д. Кроме того, в спектре ¹H ЯМР наблюдали минорные сигналы кислого полимера.

Спектры ¹H и ¹³C ЯМР были расшифрованы с помощью двумерных гомоядерных и гетероядерных методик. В спектрах ¹H, ¹H COSY и TOCSY выявлены два остатка α-рамнопиранозы (α-Rhap) в качестве компонентов повторяющегося звена полисахарида.

Анализ спектров ¹H, ¹³C HSQC (рис. 3, табл. 2) показал замещение одного из остатков α-Rhap в положение 2 (химический сдвиг C-2 при 79.4 м.д.) и второго остатка α-Rhap в положение 3 (C-3 при 78.9 м.д.).

Линейность полимерной цепи была доказана с помощью анализа спектра ¹H, ¹H ROESY (табл. 2),

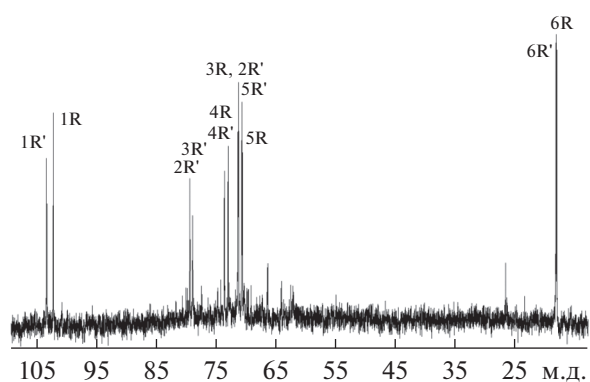


Рис. 1. Спектр ¹³C ЯМР нейтрального полисахарида из клеточной стенки *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811. Обозначения приведены в соответствии с табл. 1. Арабские цифры относятся к номерам атомов углерода в остатках, обозначенных как в табл. 2.

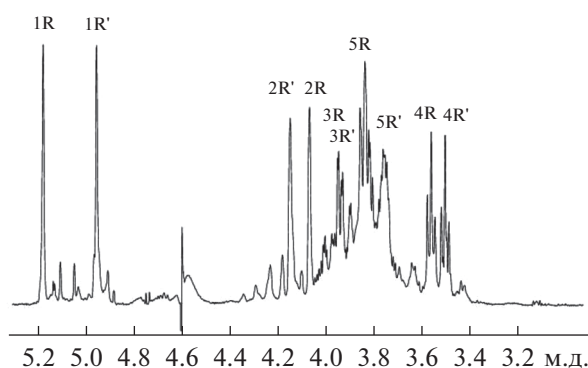
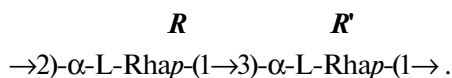


Рис. 2. Спектр ^1H ЯМР нейтрального полисахарида из клеточной стенки *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811. Обозначения приведены в соответствии с табл. 1. Арабские цифры относятся к номерам атомов протонов в остатках, обозначенных как в табл. 2.

где наблюдали корреляционные пики между остатками Н-1(*R*)/Н-3(*R'*) и Н-1(*R'*)/Н-2(*R*) (5.18/3.85 и 4.96/4.07). Структура полисахаридной повторяющейся единицы была подтверждена анализом спектра ^1H , ^{13}C НМВС (табл. 2), в котором были видны пики корреляции между остатками Н-1(*R*)/С-3(*R'*) и Н-1(*R'*)/С-2(*R*) (5.18/78.9 и 4.96/79.4).

Таким образом, нейтральный полисахарид, с учетом абсолютной L-конфигурации рамнозы, является линейным рамнаном со следующей структурой повторяющегося звена:



Анализ ЯМР-спектров нейтральных фракций гликополимеров четырех других исследованных штаммов куртобактерий показал их полную идентичность с аналогичными спектрами штамма ВКМ Ас-1811, что свидетельствовало об идентичности структур выявленных рамнанов.

Как отмечено ранее, препараты гликополимеров клеточных стенок бактерий всех 5 изученных штаммов содержали также кислые полисахариды, ЯМР-спектры которых имели различия, которые указывали на отличия в структуре полимеров. Предварительный анализ спектров показал присутствие в структуре кислых гликополимеров из штаммов *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ВКМ Ас-1923^T и *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811, наряду с моносахаридными остатками – остатков пировиноградной кислоты (в виде 4,6-связанного пирувата галактозы).

Таким образом, нами установлено, что клеточные стенки актинобактерий рода *Curtobacterium* содержат, наряду с пептидогликаном В-типа (вариация В2β, D-орнитин в тетрапептидной цепочке) (Schleifer, Kandler, 1972; Saddler et al., 2017), нейтральный гликополимер рамнан с повторяющимся звеном, $\rightarrow 2) - \alpha - L - \text{Rhap} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - L - \text{Rhap} - (1 \rightarrow$, и

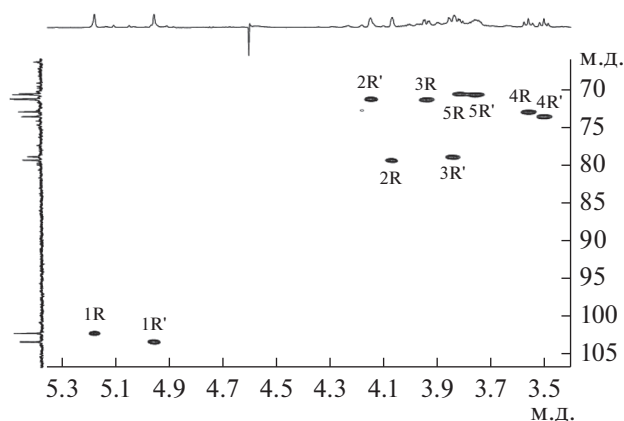


Рис. 3. Часть ^1H , ^{13}C -HSQC-спектра нейтрального полисахарида из клеточной стенки *Curtobacterium* sp. ВКМ Ас-1811. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР-спектров приведены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных как в табл. 2.

кислые бесфосфатные полимеры, структуры которых пока не установлены. К общим характеристикам исследованных штаммов следует отнести также набор сахаров (рамноза, манноза, глюкоза, галактоза и глюкозамин), определяемый в кислотных гидролизатах клеточных стенок и выделенных из них препаратов гликополимеров (по методам, описанным в работе Potekhina et al., 2011). У представителей всех видов рода (*C. albidum*, *C. ammoniigenes*, *C. citreum*, *C. flaccumfaciens*, *C. herbarum*, *C. luteum*, *C. pusillum*), как показано ранее (Diaz-Maurino, Perkins, 1974; Takeuchi, Yokota, 1989) и подтверждено или установлено в настоящей работе, отсутствуют теихоевые кислоты и гликозил-1-фосфатные полимеры.

Интересно отметить, что вышеперечисленные характеристики свойственны всем изученным штаммам (видам) рода, вне зависимости от их экологических (биологических) особенностей и источника выделения.

Несмотря на то, что рамноза и рамнозосодержащие полимеры встречаются в клеточных стенках многих актинобактерий, рамнаны (основная цепь полимера состоит только из остатков рамнозы) были описаны в единичных случаях, а именно, у актинобактерий родов *Bifidobacterium* и *Rathayibacter* (структуры приведены на сайте <https://www.csdb.glycoscience.ru>). Ранее различные по структуре рамнаны были описаны у бактерий родов *Streptococcus* и *Lactococcus* (полимеры, ковалентно связанные с пептидогликаном) (Messner, Schaffer, 2003; Sadovskaya et al., 2017). Рамнаны также были идентифицированы у спорообразующих бактерий семейств *Bacillaceae* и *Paenibacillaceae* (в составе гликопротеинов S-слоя) и разных родов филума *Proteobacteria* (как

О-полисахариды) (<https://www.csdb.glycoscience.ru>). Следует отметить, что наличие остатков рамнозы в гликополимерах поверхностных структур клетки некоторых бактерий связывают с адгезией, образованием биопленок и патогенностью (фитопатогенностью) (Clifford et al., 2013; Michael et al., 2016; Mistou et al., 2016).

Присутствие в клеточной стенке рамнана с повторяющимся звеном $\rightarrow 2$)- α -L-Rhap-($1 \rightarrow 3$)- α -L-Rhap-($1 \rightarrow$ является одной из хемотаксономических характеристик изученных видов и, по-видимому, рода *Curtobacterium* в целом. Дальнейшие исследования позволят установить структуры кислых полисахаридов и оценить возможность их использования в качестве хемотаксономических признаков видов. Результаты исследований будут также способствовать пониманию роли гликополимеров в процессах колонизации и инфекции куртобактериями высших организмов, выяснению механизмов взаимодействия бактерий в микробных сообществах и с различными абиотическими объектами окружающей среды.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ким Д., Тульская Е.М., Дмитренко А.С., Стародумова И.П., Дорофеева Л.В. Сравнительное изучение двух штаммов рода *Clavibacter* // Всероссийская конф. с международным участием "Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии". М.: Макс-Пресс, 2019. С. 58.
- Наумова И.Б., Шашков А.С. Анионные полимеры клеточных стенок грамположительных бактерий // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 947–982.
- Наумова И.В., Шашков А.С. Anionic polymers in cell walls of gram-positive bacteria // Biochemistry (Moscow). 1997. V. 62. P. 809–840.
- Тульская Е.М., Шашков А.С., Стрешинская Г.М., Сенченкова С.Н., Потехина Н.В., Козлова Ю.И., Евтушенко Л.И. Тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты актиномицетов // Биохимия. 2011. Т. 76. № 7. С. 904–913.
- Tul'skaya E.M., Shashkov A.S., Streshinskaya G.M., Senchenkova S.N., Potekhina N.V., Kozlova Y.I., Evtushenko L.I. Teichuronic and teichulosonic acids of actinomycetes // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 736–744.
- Шашков А.С., Тульская Е.М., Стрешинская Г.М., Дмитренко А.С., Потехина Н.В., Сенченкова С.Н., Пискункова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Рамноманнаны и тейхуроносовая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603^T // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 428–437.
- Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Piskunkova N.F., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Rhamnomannans and teichuronic acid from the cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 369–377.
- Aizawa T., Ve N.B., Kimoto K.I., Iwabuchi N., Sumida H., Hasegawa I., Sasaki S., Tamura T., Kudo T., Suzuki K.I., Nakajima M., Sunairi M. *Curtobacterium ammoniigenes* sp. nov., an ammonia-producing bacterium isolated from plants inhabiting acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2007. V. 57. P. 1447–1452.
- Caliot E., Dramsi S., Chapot-Chartier M.P., Courtin P., Kulakauskas S., Pechoux C., Trieu-Cuot P., Mistou M.Y. Role of the Group B antigen of *Streptococcus agalactiae*: a peptidoglycan-anchored polysaccharide involved in cell wall biogenesis // PLoS Pathog. 2012. V. 8. e1002756.
- Chase A.B., Arevalo P., Polz M.F., Berlemont R., Martiny J.B. Evidence for ecological flexibility in the cosmopolitan genus *Curtobacterium* // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 1874.
- Clifford J.C., Rapicavoli J.N., Roper M.C. A rhamnose-rich O-antigen mediates adhesion, virulence, and host colonization for the xylem-limited phytopathogen *Xylella fastidiosa* // Mol. Plant Microbe Interact. 2013. V. 26. P. 676–685.
- Diaz-Maurino T., Perkins H.R. The presence of acidic polysaccharides and muramic acid phosphate in the walls of *Corynebacterium poinsettiae* and *Corynebacterium betae* // J. Gen. Microbiol. 1974. V. 80. P. 533–539.
- Evtushenko L.I., Takeuchi M. Family Microbacteriaceae // The Prokaryotes. 3rd ed. / Eds. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. N.Y.: Springer Science, 2006. P. 1020–1098.
- Francis M.J., Doherty R.R., Patel M., Hamblin J.F., Ojaimi S., Korman T.M. *Curtobacterium flaccumfaciens* septic arthritis following puncture with a Coxspur Hawthorn thorn // J. Clin. Microbiol. 2011. V. 49. P. 2759–2760.
- Funke G., Aravena-Roman M., Frodl R. First description of *Curtobacterium* spp. isolated from human clinical specimens // J. Clin. Microbiol. 2005. V. 43. P. 1032–1036.
- Iizuka H., Komagata K. Microbiological studies on petroleum and natural gas. III. Determination of *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Alcaligenes*, and *Achromobacter* isolated from oil-brines in Japan // J. Gen. Appl. Microbiol. 1965. V. 11. P. 1–14.
- Kohler T., Xia G., Kulauzovic E., Peschel A. Teichoic acids, lipoteichoic acids, and related cell wall glycopolymers of Gram-positive bacteria // Microbial Glycobiology: Structures, Relevance and Applications / Eds. Moran A.,

- Holst O., Brennan P.J., von Itzstein M. Amsterdam: Elsevier, 2009. Ch. 5. P. 75–91.
- Messner P., Schaffer C. Prokaryotic glycoproteins // Progress in the Chemistry of Organic Natural Products (Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe) / Eds. Chakraborty D.P., Krohn K., Messner P., Roy S., Schaffer C. Vienna: Springer, 2003. V. 85. P. 51–124.
- Michael V., Frank O., Bartling P., Scheuner C., Goker M., Brinkmann H., Petersen J. Biofilm plasmids with a rhamnose operon are widely distributed determinants of the 'swim-or-stick' lifestyle in roseobacters // ISME J. 2016. V. 10. P. 2498–2513.
- Mistou M.Y., Sutcliffe I.C., van Sorge N.M. Bacterial glycobiochemistry: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in gram-positive bacteria // FEMS Microbiol. Rev. 2016. V. 40. P. 464–479.
- Potekhina N.V., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., Shashkov A.S. Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria // Methods in Microbiology / Eds. Rainey F.A., Oren A. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, 2011. V. 38. Ch. 6. P. 131–164.
- Rautenberg M., Kohler T., Xia G., Kulauzovic E., Peschel A. Structure, biosynthesis, and function of teichoic acids and related cell wall glycopolymers in the Gram-positive cell envelope // Prokaryotic Cell Wall Compounds / Eds. König H., Claus H., Varma A. Berlin: Springer, 2010. P. 155–174.
- Rivera R., Cheema A., Mai J., Oehler R.L., Sandin R.L., Greene J.N. *Curtobacterium* brain abscess: case report // Infect. Dis. Clin. Pract. 2012. V. 20. P. e17–e19.
- Saddler G.S., Guimaraes P.M., Hamada M., Suzuki K.I. *Curtobacterium* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Eds. De Vos P., Dedysh S., Hedlund B., Kampfer P., Rainey F., Trujillo M.E., Bowman J.P., Brown D.R., Glockner F.O., Oren A., Paster B.J., Wade W., Ward N., Busse H.J., Reysenbach A.L. UK: John Wiley and Sons, Ltd., 2017. Version 2. P. 1–16.
- Sadovskaya I., Vinogradov E., Courtin P., Armalyte J., Meyrand M., Giaouris E., Palussiere S., Furlan S., Pechoux C., Ainsworth S., Mahony J., van Sinderen D., Kulakauskas S., Guerardel Y., Chapot-Chartier M.P. Another brick in the wall: a rhamnan polysaccharide trapped inside peptidoglycan of *Lactococcus lactis* // mBio. 2017. V. 8. e01303-17.
- Sanyika T.W., Stafford W., Cowan D.A. The soil and plant determinants of community structures of the dominant actinobacteria in Marion Island terrestrial habitats, Sub-Antarctica // Polar Biol. 2012. V. 35. P. 1129–1141.
- Schade J., Weidenmaier C. Cell wall glycopolymers of *Firmicutes* and their role as nonprotein adhesins // FEBS Lett. 2016. V. 590. P. 3758–3771.
- Schleifer K.H., Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications // Bacteriol. Rev. 1972. V. 36. P. 407–477.
- Takeuchi M., Yokota A. Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria // J. Gen. Appl. Microbiol. 1989. V. 35. P. 233–252.
- Takeuchi M., Yokota A. Evaluation of cell-wall sugar composition as a taxonomic marker of some coryneform bacteria // J. Gen. Appl. Microbiol. 1993. V. 39. P. 505–512.
- Takeuchi M., Yokota A., Misaki A. Comparative structures of the cell-wall polysaccharides of four species of the genus *Microbacterium* // J. Gen. Appl. Microbiol. 1990. V. 36. P. 255–271.
- van Sorge N.M., Cole J.N., Kuipers K., Henningham A., Aziz R.K., Kasirer-Friede A., Lin L., Berends E.T.M., Davies M.R., Dougan G., Zhang F., Dahesh S., Shaw L., Gin J., Cunningham M., Merriman J.A., Hütter J., Lepenies B., Rooijackers S.H.M., Malley R., Walker M.J., Shattil S.J., Schlievert P.M., Choudhury B., Nizet V. The classical lancefield antigen of group a *Streptococcus* is a virulence determinant with implications for vaccine design // Cell Host Microbe. 2014. V. 15. P. 729–740.
- Wang Q., Wang R., He L., Sheng X. Location-related differences in weathering behaviors and populations of culturable rock-weathering bacteria along a hillside of a rock mountain // Microb. Ecol. 2017. V. 73. P. 838–849.
- Wilhelm R.C., Radtke K.J., Mykyteczuk N.C., Greer C.W., Whyte L.G. Life at the wedge: the activity and diversity of Arctic ice wedge microbial communities // Astrobiology. 2012. V. 12. P. 347–360.
- Yu Y., Sheng X., He L., Huang Z. Linkage between culturable mineral-weathering bacteria and their weathering effectiveness along a soil profile // Geomicrobiol. J. 2016. V. 33. P. 10–19.

Cell Wall Rhamnan in Actinobacteria of the genus *Curtobacterium*

V. A. Zaichikov¹, N. V. Potekhina^{1,*}, A. S. Dmitrenok², Ding Fan¹, E. M. Tul'skaya¹,
L. V. Dorofeeva³, and L. I. Evtushenko³

¹Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

³All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: potekhina56@mail.ru

Received September 30, 2020; revised November 24, 2020; accepted November 26, 2020

Abstract—Presence of the neutral glycopolymer rhamnan was established for members of the genus *Curtobacterium* (family *Microbacteriaceae*) using chemical and NMR spectroscopic methods. The rhamnan with the repeating unit, $\rightarrow 2$ - α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow), was found in *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfa-*

ciens VKM Ac-1923^T, *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* VKM Ac-1924^T, *C. pusillum* VKM Ac-2099^T, *C. herbarum* VKM Ac-2512^T, and *Curtobacterium* sp. VKM Ac-1811. Each of the studied strains also contained a second, acidic, phosphate-free polysaccharide. NMR spectra of these polysaccharides differed, indicating the structural differences. Cell wall hydrolysates of all studied strains were found to contain rhamnose, mannose, glucose, galactose, and glucosamine. Further research will facilitate more detailed characterization of the composition of cell wall glycopolymers in *Curtobacterium* species, as well as evaluation of their taxonomic significance. The data on the polymer structure will contribute to understanding of the mechanisms of colonization and infection of higher organisms by *Curtobacterium* species and of bacterial interaction in microbial communities and with abiotic environmental objects.

Keywords: *Curtobacterium*, cell wall, glycopolymers, rhamnan