ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА И МИНЕРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК И СИНТЕЗ ЦИКЛИЧЕСКИХ ЛИПОПЕПТИДОВ PGPB-ШТАММАМИ *BACILLUS* И *PAENIBACILLUS*

Актуганов Г.Э.[1], Галимзянова Н.Ф.[1], Гильванова Е.А.[1], Рябова А.С.[1], Сафина В.Р.[1], Пудова Е.А.[2], Кузьмина Л.Ю.,[1] Бойко Т.Ф.[1], Мелентьев А.И.[1]

[1] Уфимский Институт биологии Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: gleakt@anrb.ru
[2] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, г. Москва

Исследованы особенности формирования биопленок антагонистическими штаммами *Bacillus* и *Paenibacillus*, способными стимулировать рост и колонизовать ризосферу сельскохозяйственных культур. Установлено, что интенсивность образования биопленок *in vitro* у 21 штамма бацилл положительно коррелирует с уровнем их антагонистической активности и продукцией циклических липопептидов (r_{xy}=0.80-0.95). В геноме 11 исследованных штаммов с помощью ПЦР обнаружены сходные фрагменты, гомологичные генам NRPS, ответственным за синтез сурфактина А и бацилломицина D. Показано, что штаммы *Paenibacillus* обладают менее выраженной способностью к формированию поверхностной биопленки по сравнению с *B. subtilis*, что может быть обусловлено различиями в профиле и уровне синтезируемых липопептидов. Арабиноза и лактоза способствовали 2,5-кратному увеличению весового выхода поверхностных биопленок *B. subtilis* IB-54. Значительное увеличение интенсивности формирования и изменения структуры поверхностных биопленок у штаммов *B. subtilis* и *B. licheniformis* отмечено в присутствии 50-100 мМ сульфатов магния/аммония. Наиболее активная продукция циклических липопептидов *B. subtilis* IB-54 происходила в присутствии глюкозы и глицерина, а у *B. licheniformis* IB-P141 B21 – также коллоидного крабового хитина.

Ключевые слова: Bacillus subtilis, B. licheniformis, Paenibacillus, биопленки, циклические липопептиды, микробный антагонизм, биофунгициды, нерибосомальные пептидил-синтетазы

INFLUENCE OF SEVERAL CARBON SOURCES AND MINERAL SALTS ON BIOFILM FORMATION AND SYNTHESIS OF CYCLIC LIPOPEPTIDES BY PGPB-STRAINS OF *BACILLUS* AND *PAENIBACILLUS*

Aktuganov G.E.[1], Galimzianova N.F.[1], Gilvanova E.A.[1], Ryabova A.S.[1], Safina V.R.[1], Pudova E.A.[2], Kuzmina L.Yu.[1], Boyko T.F.[1], Melentiev A.I.[1]

[1]Ufa Institute of Biology of Ufa Federal Research Center of Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: gleakt@anrb.ru
[2]Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Specific features of biofilm formation by antagonistic and plant-growth-promoting strains of *Bacillus* и *Paenibacillus* that capable to colonize agricultural plant rhizosphere were studied. It is found that intensity of biofilm formation *in vitro* by the 21 strains of bacilli highly correlates with the level of these antagonistic activity and cyclic lipopeptides production (r_{xy}=0.80-0.95). The similar nucleotide sequences homological to NPRS genes involved in surfactin A and bacillomycin D synthesis were revealed using PCR assay in the genome of 11 studied strains. The strains of *Paenibacillus* showed to have a less noticeable ability to formation of surface biofilms as compared to *B. subtilis*, which may be due to differences in the profile and level of synthesized lipopeptides. Arabinose and lactose promoted 2.5-fold increase of surface biofilms yield by weight in *B. subtilis* IB-54. Considerable increase of surface biofilm formation by the strains of *B. subtilis* и *B. licheniformis* and its morphological changes were observed in presence of 50-100 mM of magnesium/ammonium sulfates. Most intensive production of cyclic lipopeptides by *B. subtilis* IB-54 occurred in presence of glucose and glycerol, while in *B. licheniformis* IB-P141 B21 it was stimulated also with colloidal crab chitin.

Keywords: Bacillus subtilis, B. licheniformis, Paenibacillus, biofilms, cyclic lipopetides, microbial antagonism, biofungicides, nonribosomal peptide-synthetases

Поступила в редакцию: 6.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-468-481

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время стало очевидным, что биопленки являются преимущественным способом существования микроорганизмов в естественных и антропогенных (в т.ч. техногенных) экосистемах [Николаев, Плакунов, 2007; Costerton, 2007]. Представляя собой многоклеточные структурированные сообщества одного или многих видов микроорганизмов, развивающиеся на поверхностях раздела фаз воздух-вода и вода/воздух - твердый субстрат, биопленки играют важную экологическую роль как в межмикробных взаимодействиях, так и во взаимодействиях с макроорганизмами, в т.ч. растениями и животными [Davey, O'Toole, 2000]. Существенный прогресс в понимании взаимодействия бактерий в биопленках достигнут при изучении патогенных и симбиотических для человека микроорганизмов [Liu et al., 2015, Arciola et al., 2015]. Однако, сообщества микроорганизмов, приуроченные к другим местообитаниям, остаются менее изученными. Значительный интерес вызывают особенности функционирования биопленок PGPB (plant growth-promoting bacteria)-бактерий и их роль в механизмах биологического контроля фитопатогенных микроорганизмов при колонизации ризосферы и внутренних тканей растений [Pandin et al., 2017]. Среди PGPB-бактерий наиболее известны представители родов *Bacillus*, *Paenibacillus* и *Pseudomonas*, которые широко используются в составе биопрепаратов для защиты и стимуляции роста многих сельскохозяйственных культур [McSpadden Gardener, 2004; Haas, Defago, 2005; Govindasami et al., 2010; Grady et al., 2016; David et al., 2018]. Антагонистическое и ростостимулирующее действие этих бактерий зачастую имеет сложную природу и может быть обусловлено секрецией липопептидных и феназиновых антибиотиков, флороглюцинов, органических кислот, литических ферментов, бактериоцинов, сидерофоров, фитогормонов и др. [Compant et al., 2005; Stein et al., 2005; Raza et al. 2008]. Как показано во многих работах, PGPB-бактерии способны формировать биопленки на поверхности растений и в их ризосфере [Pandin et al., 2017]. Образование биопленок может стимулироваться соединениями из корневых экссудатов растений, а также при воздействии антимикробных соединений и в условиях стресса [Bais et al., 2004; Haggag, Timmusk, 2008; Selin et al., 2010; Khezri et al., 2011; Zhang et al., 2015; Chi et al., 2015]. Изучению механизмов биологического контроля фитопатогенов PGPB-бактериями, связанных со свойствами образуемых ими биопленок, уделяется пока не столь существенное внимание по сравнению с исследованиями их антагонистических свойств и особенностей синтеза соединений, проявляющих антимикробную активность. Для различных видов бацилл устновлена триггерная роль циклических липопептидов, в особенности сурфактина и бацилломицина, при формировании ими биопленки в ризосфере и филлоплане некоторых культурных растений [Fan et al., 2011; Zeriouh et al., 2014; Zhou et al., 2016]. Образуемые *in situ* бактериями *Bacillus* биопленки характеризуются высоким уровнем синтеза различных липопептидов, что может являться одним из основных механизмов их защитного действия. С биопленками могут быть ассоциированы и другие свойства, определяющие характер взаимодействий PGPB-бактерий с другими микроорганизмами и растением-хозяином [Pandin et al., 2017]. В целом, особенности и характер развития биопленки, несомненно, имеют значение в регуляции полезных эффектов, оказываемых бактериями *Bacillus* и *Paenibacillus* на растения. В этой связи направленный подбор условий для индукции формирования биопленки, как важной детерминанты эффективности биологического контроля

фитопатогенов, является перспективной стратегией как для разработки новых полифункциональных биопрепаратов на основе различных групп PGPB-бактерий, так и для существенного повышения эффективности применяемых в настоящее время штаммов бацилл. Актуальной проблемой в рамках применения этой стратегии является изучение действия различных факторов, влияющих на формирование биопленок PGPB-бактериями при взаимодействии с растением-хозяином.

Цель настоящей работы состояла в оценке влияния некоторых источников углерода и минеральных солей на формирование биопленки *in vitro* и синтез циклических липопептидов различными штаммами *Bacillus* и *Paenibacillus*, проявляющими антагонистические и ростостимулирующие свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основными объектами исследований являлись штаммы PGPB-бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus* из коллекции Уфимского института биологии УФИЦ РАН и Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Бактериальные культуры поддерживали ежеквартальными пересевами на мясопептонном (МПА) и картофельном агаре, а также на агаризованных средах с коллоидным хитином или крахмалом [Актуганов с соавт., 2018].

Способность исследуемых штаммов к формированию биопленки и сравнительную интенсивность пленкообразования оценивали по плотности образуемых биопленок в 96-луночных культуральных полистироловых планшетах (Corning, США) методом связывания красителя кристаллического фиолетового [O'Toole, Kolter, 1998]. Оптическую плотность измеряли при 590 нм на планшетном анализаторе EnSpier (Perkin-Elmer, США). Результаты интерпретировали согласно оптической плотности окрашенного растворителя [Stepanovic et al., 2007]. Влияние источников углерода и минеральных солей на интенсивность пленкообразования оценивали по сухому весу поверхностной биопленки, формируемой после 24 ч роста бактерий в статических условиях. В качестве контроля использовали стерильную среду LB. В экспериментальных образцах использовали ту же среду, содержащую различные сахара и многоатомные спирты (D-глюкоза, D,L-арабиноза, глицерин, D-манноза, лактоза, D-галактоза, фруктоза, N-ацетил-D-глюкозамин) в концентрации 1% масс. В качестве источников углерода использовали также коллоидный крабовый хитин в концентрациях 0,1 и 0,5% масс., растворимый хитозан (pH 6) со степенью деацетилирования около 85% («Биопрогресс», Россия) при концентрациях 0,02, 0,05, 0,1 и 0,5%, а также натриевые соли органических кислот – лактат, сукцинат и цитрат в концентрациях по 0,05 и 0,1% масс. Из минеральных солей использовали сульфаты магния, натрия, аммония и железа, а также хлориды марганца и кальция в концентрациях 10, 50, 100 и 200 мМ. Источники углерода и соли стерилизовали отдельно, в виде водных растворов. Чашки Петри со стерильной средой (20 мл) инокулировали 100 мкл ночной культуры исследуемых штаммов и инкубировали 24 ч при 37°С. Выросшие поверхностные биопленки собирали фильтрацией на предварительно взвешенной фильтровальной бумаге «Белая лента» для удаления планктонных клеток и остатков среды. Собранные образцы высушивали при 50°С и взвешивали с точностью до 0,001 г; для учета относительной потери веса фильтра при высушивании, в качестве контроля использовали сухой фильтр, а также фильтр, через который пропускали аналогичный объем стерильной питательной среды. Контрольные

образцы высушивали при тех же условиях. Выход сухой биопленки в контроле принимали за 100%; статистически значимым считали увеличение или снижение пленкообразования при соответствующем изменении показателей сухого веса биопленок на ≥15%.

Антагонистическую активность штаммов в составе биопленок оценивали по среднему диаметру зон ингибирования роста фитопатогенных грибов *Bipolaris sorokiniana* или *Rhizoctonia solani* на картофельно-глюкозном агаре (КГА) после 72 ч инкубации при 28°С. Фунгицидную активность бактериальных экзометаболитов в культуральной среде (КЖ) определяли методом диффузии в агар [Егоров, 1965]. Для этого бактерии предварительно культивировали при 220 об/мин и 36,5±0,5°С в течение 96 ч в жидкой среде с коллоидным хитином или крахмалом [Актуганов и др. 2018]. Освобожденную от клеток центрифугированием (8000 об$^{-1}$, 30 мин) КЖ стерилизовали пропусканием через бактериальные фильтры Puradisc 30 (Whatman, США) с диаметром пор 0,2 мкм и далее анализировали на наличие и уровень фунгицидной/фунгистатической активности.

Продукцию циклических липопептидов бактериальными культурами рассчитывали по степени их выхода при выделении из культуральной среды (КЖ) методом кислотного осаждения с последующей экстракцией 60%-ным (о/о) метанолом [Шульга и др., 1990]. Экстракт объединяли и высушивали до постоянного значения сухого веса. Продукцию рассчитывали по отношению суммарного сухого веса липопептидов на первоначальный объем питательной среды и выражали в мг на мл.

Способность исследуемых штаммов к биосинтезу различных групп циклических липопептидов оценивали с помощью ПЦР-скрининга в их геноме последовательностей, гомологичных генам, кодирующим соответствующие нерибосомальные пептидил-синтетазы (NPRS). Геномную ДНК бактерий выделяли методом щелочного лизиса, с последующей многократной очисткой смесью фенол-хлороформ (1:1) [Wilson, 2001]. Амплификацию целевых ПЦР-фрагментов проводили с использованием специфичных и вырожденных праймеров (табл. 1). Реакционная смесь общим объемом 20 мкл включала 10× Taq-буфер (67 mM Трис-HCl, pH 8,3, 17 mM NH_4SO_4, 2,5 mM $MgCl_2$) - 2 мкл, 25 пМ каждого праймера, 2 мкл ДНК-матрицы, 5 нМ смеси дНТФ и 10 ед Taq-ДНК полимеразы. Полимеразную реакцию проводили в амплификаторе MasterCycler Personal (Eppendorf, Германия) согласно схеме, специфичной для каждой пары праймеров (табл. 1).

ПЦР-продукты разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле (Sigma, США) и окрашивали раствором бромистого этидия (5 мкг/мл).

Большинство экспериментов проводили в 3-кратной повторности, эксперименты в планшетах – в четырехкратной повторности. Статистически значимыми считали различия между сравниваемыми выборками при $p<0,05$. Линейную взаимосвязь между показателями антагонистической активности, продукции циклических липопептидов и плотностью формируемых биопленок у штаммов родов *Bacillus* и *Paenibacillus* оценивали по критерию корреляции Пирсона. Статистическую значимость коэффициента корреляции определяли с использованием t-критерия при уровне значимости $p<0.01$. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программ ORIGIN PRO 8 SR4 (версия 8.0951 (B951), «OriginLab Corp.») и MS-Excel-2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В предварительных исследованиях нами был изучен 21 коллекционный штамм бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*, в том числе, проявляющих антагонистическую активность к фитопатогенным грибам, на способность к формированию биопленки в статических условиях. Было установлено, что штаммы с высокой антагонистической активностью, характеризуются наиболее быстрым и интенсивным образованием биопленки.

Таблица 1. Используемые олигонуклеотиды и условия ПЦР для амплификации генов NPRS у исследуемых штаммов *Bacillus* и *Paenibacillus*

Обозначение гена и кодируемый продукт	Последовательность	Условия ПЦР
SrfA: сурфактин А-синтетаза А (оперон)	As-1F: 5`-CGCGGMTACCGVATYGAGC-3’ Ts-1R: 5`-ATBCCTTTBTWDGAATGTCCGCC-3’	[94°C, 3 мин.]* 94°C, 1 мин; 43°C, 30 сек; 72°C, 45 сек; [72°C, 10 мин]*. Циклов 30.
ItuA: итурин А-синтетаза D (оперон)	ITUD1F: GATGCGATCTCCTTGGATGT-3’ ITUD1R: ATCGTCATGTGCTGCTTGAG-3’	[94°C, 4 мин], 94°C, 1 мин; 56°C, 1 мин; 72°C, 1 мин 45 сек; [72°C, 6 мин]. Циклов 35.
FenA: фенгицин А-синтетаза	FENA1F: ACAGTGCTGCCTGATGATGAAA-3’ FENA1R: GTCGGTGCATGAAATGTACG-3’	[94°C, 4 мин], 94°C, 1 мин; 62°C, 1 мин; 72°C, 1 мин 45 сек; [72°C, 6 мин]. Циклов 45.
FenB: фенгицин В-синтетаза	FENB2F: CAAGATATGCTGGACGCTGA-3’ FENB2R: ACACGACATTGCGATTGGTA-3’	
FenD: фенгицин А-синтетаза D	FEND1F: TTTGGCAGCAGGAGAAGTTT-3’ FEND1R: GCTGTCCGTTCTGCTTTTTC-3’	
BacC: бацилломицин D-синтетаза С (оперон)	BACC1F: GAAGGACACGGCAGAGAGTC-3’ BACC1R: CGCTGATGACTGTTCATGCT-3’	[94°C, 4 мин], 94°C, 1 мин; 60°C, 30 сек; 72°C, 1 мин 45 сек; [72°C, 6 мин]. Циклов 35.
ZmA: цвиттермицин А-синтетаза	ZWITF2: TTGGGAGAATATACAGCTCT-3’ ZWITR1: GACCTTTTGAAATGGGCGTA-3’	[94°C, 4 мин], 94°C, 1 мин; 56°C, 30 сек; 72°C, 1 мин 45 сек; [72°C, 6 мин]. Циклов 35.

*В квадратных скобках при 94°С указано время предварительной денатурации, при 72°С – время заключительной элонгации.

Оценка методом связывания красителя показала положительную корреляцию между интенсивностью пленкообразования и антагонистическими свойствами исследуемых штаммов, в т.ч. их рост-ингибирующей активностью в отношении некоторых фитопатогенных грибов (линейный коэффициент корреляции Пирсона r_{XY}=0,802) и уровнем продукции (мг/мл) биоактивных циклических липопептидов (r_{XY}=0,95) (рис. 1). Анализ с помощью t-критерия ($p<0.01$) показал статистическую значимость этой корреляционной связи. Современные работы свидетельствуют, что формирование биопленки у бацилл, в первую очередь, у *B. subtilis*, зависит от факторов транскрипции spoOA, σ-H и AbrB.

Поскольку эти факторы участвуют в регуляции путей биосинтеза циклических липопептидов, таких как сурфактин, считается, что их продукция может происходить координировано с образованием биопленок [Stein, 2005]. Подвижность клеток бактерий *B. subtilis* при их росте на твердых или полужидких субстратах довольно строго определяется продукцией сурфактина [Kinsinger et al., 2003]. В то же время, сурфактину уделяется более предпочтительная роль в формировании биопленок по сравнению с липопептидами других групп у природных изолятов *B. subtilis* [Hofemeister et al., 2004].

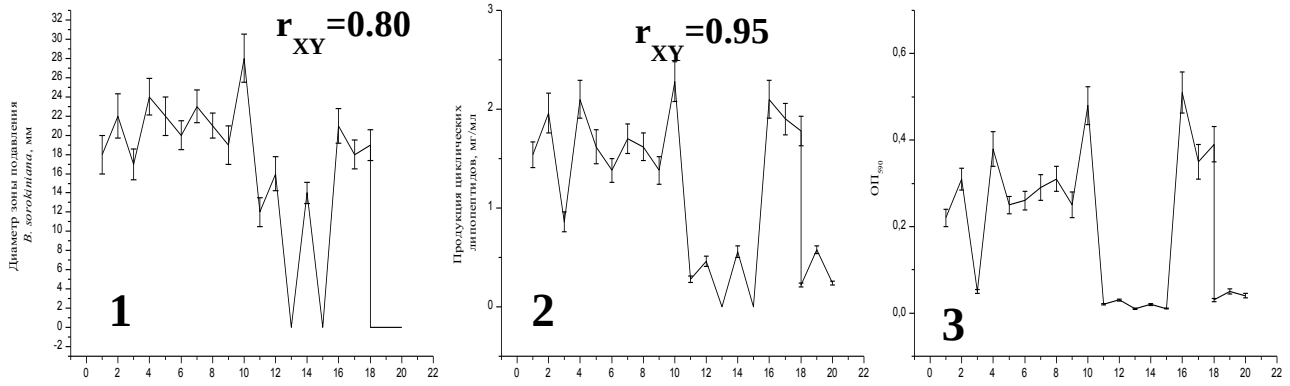

Рис. 1. Взаимосвязь уровня антагонистической активности (1, диаметр зоны подавления гриба *B. sorokiniana*, мм) и продукции циклических липопептидов (2, мг/мл культуральной среды) с интенсивностью формирования биопленок (3, $ОП_{590}$) у 21 штамма родов *Bacillus* и *Paenibacillus*. Номера штаммов на оси абсцисс: (1) *Bacillus* sp. IB-14, (2) *B. atrophaeus* IB-21; (3) *Bacillus* sp. IB-23; (4) *B. atrophaeus* IB-33-1; (5) *Bacillus* sp. IB-34-a; (6) IB-35; (7) IB-36; (8) IB-39-1; (9) IB-47; (10) *B. subtilis* IB-54; (11) *Paenibacillus ehimensis* IB-739; (12) *P. ehimensis* IB-X-b; (13) *Bacillus* sp. IB-517; (14) *P. polymyxa* IB-37; (15) *P. illinoisensis* IB-1087; (16) *B. licheniformis* IB-P141 B21-1; (17) *B. licheniformis* IB-A-41.4.2; (18) *B. methylotrophicus* IBRB-25S; (19) *B. thuringiensis* B-387; (20) *B. cereus* B-688; (21) *P. polymyxa* B-514.

Тесная взаимосвязь между продукцией антибиотиков и образованием биопленок показана также у других видов *Bacillus* [Yan et al., 2003], как и роль поверхностно-активных рамнолипидных сурфактантов в архитектуре биопленок у *Pseudomonas aeruginosa* [Davey et al., 2003]. Липопептиды, по всей видимости, вовлечены в процессы адгезии и агрегации бактериальных клеток в микроколонии, что было показано при колонизации ризосферы растений бактериями [Lugtenberg et al., 2001]. Такие микроколонии рассматриваются как особый тип биопленки, и это позволяет заключить, что микробные популяции организуются и ведут себя как сообщества биопленок на поверхности корней и почвенных частиц [Ramey et al., 2004]. В этом аспекте многие исследования демонстрируют, что образование пленок на поверхности раздела воздух-вода обусловлено синтезом только сурфактина, но не итурина и фенгицина [Ongena, Jacques, 2008]. В нашей работе это было подтверждено при сравнении антагонистических штаммов *B. subtilis* и *P. ehimensis*. Штаммы *B. subtilis* характеризовались большей способностью к продукции сурфактина, при этом штаммы *P. ehimensis* активно продуцировали фенгицины и бацилломицины [Aktuganov et al., 2014], но характеризовались относительно слабой способностью к формированию поверхностных биопленок *in vitro*. Целевой ПЦР-анализ генов, кодирующих нерибосомальные пептидил-гидролазы (NPRS), показал существенное отличие штаммов *Paenibacillus* от представителей рода *Bacillus* и их полиморфизм по генам итурин-, фенгицин- и цвиттермицин-синтетаз (рис. 2A-B), указывая на возможность синтеза ими циклических липопептидов специфической природы, определяющих особенности сигнального и антагонистического взаимодействия с

представителями рода *Bacillus*. В то же время, у всех исследованных штаммов в качестве общих выявлены фрагменты генов пептидил-синтетаз, ответственных за синтез сурфактина А (410 п.н.) и бацилломицина D (875 п.н) (рис. 2Г), показывая консервативность свойств некоторых ключевых липопептидов в широком ряду филогенетически отдаленных представителей бацилл.

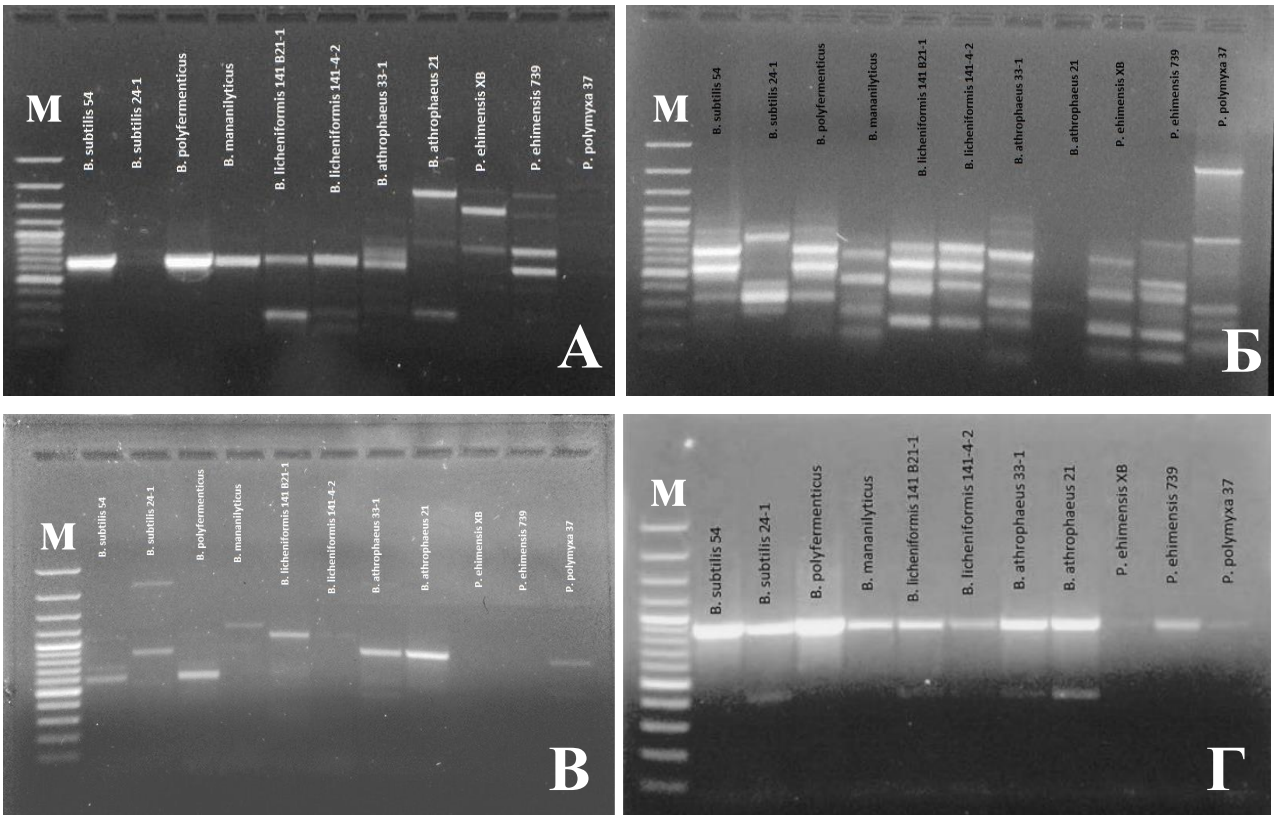

Рис. 2. Электрофорез в 1%-ном агарозном геле ПЦР-продуктов, полученных амплификацией NPRS-гомологичных последовательностей в геноме 11 штаммов PGPB-бактерий *Bacillus* и *Paenibacillus* с использованием праймеров, специфичных к генам итурин А-синтетазы D (А), фенгицин В-синтетазы (Б), цвиттермицин А-синтетазы (В) и бацилломицин D-синтетазы С (Г). М – маркеры длин ДНК (100-1000 п.н.).

Способность большинства исследованных штаммов к синтезу сурфактина демонстрирует их потенциал (как представителей *Bacillus*, так и *Paenibacillus*) в колонизации ризосферы сельскохозяйственных растений, что было ранее показано для штамма *P. ehimensis* IB-739 [Морозов с соавт., 1994]. В целом, роль липопептидов в биоконтроле фитопатогенов *in situ* обусловлена не только активной колонизацией ризосферы растений PGPR-бактериями, сопровождающейся образованием биопленок, но и прямым антагонизмом к фитопатогенным бактериям и грибам [Ongena, Jacques, 2008]. В нашей работе интенсивность формирования биопленок бактериями обнаруживала несколько меньшую корреляцию с их антагонистической активностью, чем с уровнем продукции ими липопептидов, что может быть обусловлено различиями исследуемых штаммов в спектре синтезируемых антибиотиков липопептидной группы, а также синтезом других экзометаболитов, способных подавлять рост микромицетов.

Известно, что растения образуют специфическую экологическую нишу для микроорганизмов, развивающихся в ризосфере, за счет постоянного высвобождения из своих корней широкого спектра разнообразных низкомолекулярных метаболитов и макромолекул

[Bais et al., 2006]. Некоторые из молекул в этих экссудатах могут действовать как химические сигналы для подвижных бактерий, в т.ч. бацилл и псевдомонад, обусловливая их хемотаксис к корневой поверхности. В ризосфере бактерии могут использовать продукты корневых экссудатов для выживания и роста, сопровождающегося формированием биопленок [de Weert et al., 2002]. В этом контексте изучение особенностей влияния некоторых источников углерода на пленкообразование PGPB-бактерий является важной задачей. Нами было исследовано влияние различных сахаров на формирование поверхностных биопленок некоторыми штаммами бацилл. Выход биопленки *B. subtilis* IB-54 по сухому весу возрастал в присутствии большинства сахаров, за исключением N-ацетил-D-глюкозамина и галактозы (рис. 3А). В присутствии лактозы и арабинозы наблюдалось наибольшее увеличение (>150%) образования биопленки *B. subtilis* IB-54. Глюкоза и N-ацетил-D-глюкозамин способствовали синтезу в биопленке штамма оранжевого пигмента, характерного для *B. subtilis* IB-54 при некоторых условиях культивирования.

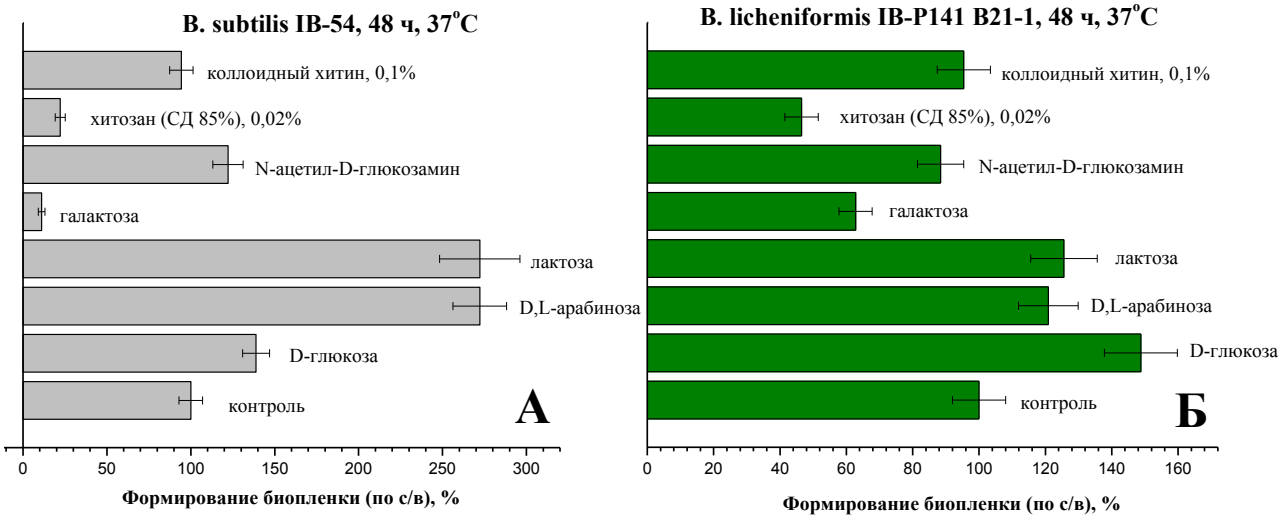

Рис. 3. Влияние различных источников углерода на выход поверхностных биопленок у *B. subtilis* IB-54 (А) и *B. licheniformis* IB-P141 B21-1 (Б).

Глюкоза, арабиноза и лактоза способствовали также увеличению интенсивности формирования биопленки штаммом *B. licheniformis* IB-P141 B21-1 (рис. 3Б). У штамма *P. ehimensis* IB-739 формирования видимой поверхностной биопленки в этих условиях практически не происходило. Среди других источников углерода коллоидный хитин (0,1-0,5%) не оказывал существенного влияния на рост, формирование и тип биопленки, тогда как хитозан (СД 85%) в концентрациях 0,02-0,10% почти полностью ингибировал пленкообразование, что обусловлено выраженной антибактериальной активностью этого биополимера в отношении *B. subtilis* IB-54. В условиях глубинного культивирования с активной аэрацией продукция циклических липопептидов у штаммов *B. subtilis* IB-54 и *B. licheniformis* IB-P141 B21-1 слабо коррелировала с образованием ими биопленки, что может быть связано с различным характером синтеза липопептидов бактериями в биопленке и планктонной культуре. Так, ранее сообщалось о более эффективной продукции *B. subtilis* итурина А при ферментации бактерий в биопленке [Rahman et al., 2007]. В наших экспериментах выход липопептидов в глубинной культуре *B. subtilis* IB-54 в наибольшей степени возрастал в присутствии глюкозы и глицерина, достигая в 2 раза больших значений, чем при использовании арабинозы и лактозы (рис. 4А). Хитозан практически полностью

подавлял синтез липопептидов. У хитинолитического штамма *B. licheniformis* IB-P141 B21-1, продуцирующего внеклеточные хитиназы, высокий выход циклических липопептидов наблюдался также при использовании в качестве источника углерода коллоидного хитина (рис. 4Б).

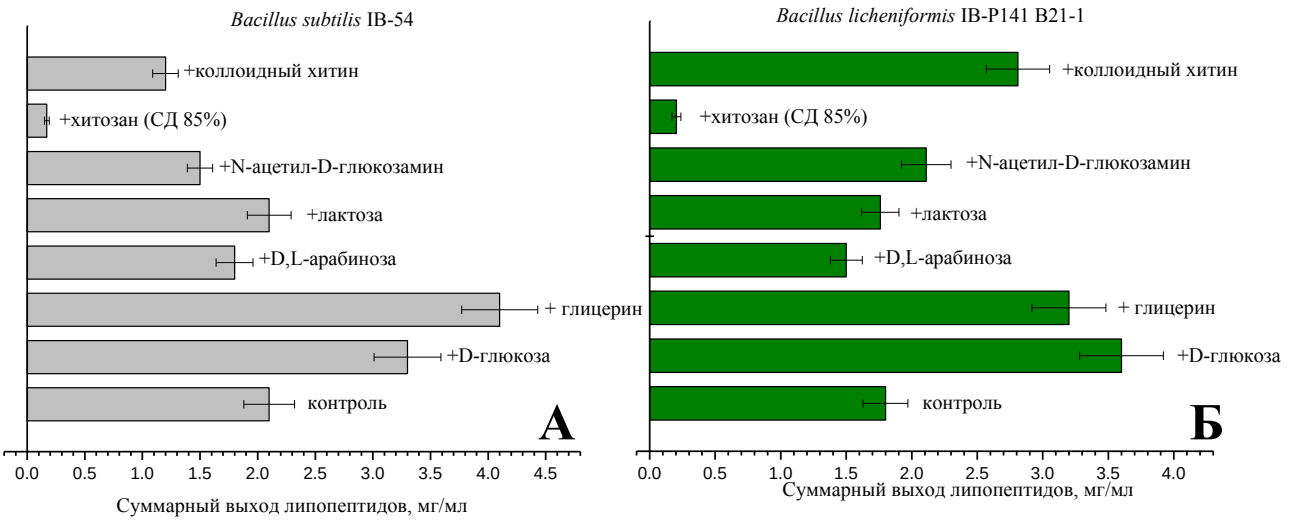

Рис. 4. Влияние различных источников углерода на степень накопления циклических липопептидов в культуральной среде штаммов *B. subtilis* IB-54 (А) и *B. licheniformis* IB-P141 B21-1 (Б) после 4-х сут глубинного культивирования (36,5±0,5°С, 220 об/мин), контроль – среда LB.

Следует отметить, что при оценке плотности биопленок методом связывания красителя в культуральных планшетах полученные результаты не полностью соотносились с данными по весовому выходу поверхностных биопленок. Соли органических кислот способствовали умеренному возрастанию весового выхода пленок по сравнению с контрольной средой. У штамма *P. ehimensis* IB-739 также практически не отмечалось формирования биопленок в этих условиях (данные не представлены).

Полученные результаты показывают, что метаболизм арабинозы, лактозы и глюкозы может быть вовлечен в процесс формирования биопленки у штаммов *B. subtilis* IB-54 и *B. licheniformis* IB-P141 B21-1. Арабиноза, один из наиболее распространенных сахаров у растений, входящий в состав многих растительных полимеров (камеди, пектины, гемицеллюлозы) и гликозидов, возможно, как компонент корневых экссудатов, способствует активации пленкообразования у *Bacillus* при колонизации ризосферы, вовлекаясь в метаболизм бактерий через пентозофосфатный цикл. Современные работы указывают на важную роль генов метаболизма некоторых сахаров (например, галактозы) в образовании биопленки штаммами *B. subtilis*, в том числе, через механизм активации синтеза экзополимеров – компонентов матрикса биопленок [Chai et al., 2012].

Нами было исследовано влияние на формирование биопленок *B. subtilis* IB-54 и *B. licheniformis* IB-P141 B21-1 сернокислых солей магния, железа, аммония, натрия, а также хлоридов кальция и марганца. Установлено, что сернокислый магний при повышении концентрации в среде LB от 10 до 200 мМ способствует как значительному увеличению интенсивности пленкообразования, так и изменению морфологии биопленок (увеличение выхода сухой биопленки в 2-2,5 раза у обоих штаммов, рис. 5А).

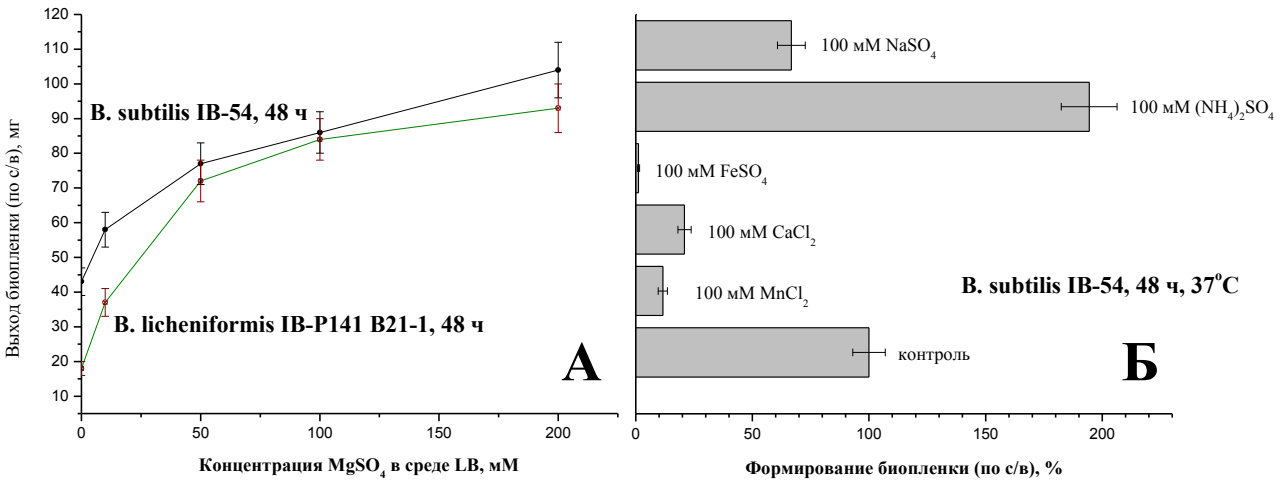

Рис. 5. Влияние некоторых минеральных солей на весовой выход поверхностных биопленок (с/в) при статическом культивировании штаммов *B. subtilis* IB-54 и *B. licheniformis* IB-P141 B21-1.

Рис. 6. Изменение морфологии поверхностной биопленки, формируемой штаммом *B. subtilis* IB-54 в статической культуре (24 ч, 37°C) при различной концентрации сернокислого магния

Увеличение концентрации сернокислого магния в среде до 50-100 мМ приводило к формированию более плотных полупрозрачных глянцевых пленок (в отличие от обычных матовых пленок *B. subtilis* IB-54) (рис. 6). Штамм формировал сходные по морфологии глянцевые биопленки в присутствии 50-100 мМ сернокислых солей аммония и натрия, что может быть связано со сходным действием сульфат-аниона, однако интенсивность образования биопленки и ее стабильность значительно снижались. В присутствии хлоридов марганца и кальция (50-100 мМ) интенсивность формирования поверхностных биопленок снижалась; в культуре начинало преобладать образование придонных биопленок, а сульфат железа в значительной степени ингибировал образование биопленок у *B. subtilis* IB-54 (рис. 5Б). В других работах экспериментально отмечено, что ионы магния снижают пленкообразование посредством отрицательной регуляции экспрессии генов матрикса [Oknin et al., 2015]. Авторы сообщают о снижении образования складок на поверхности биопленок *B. subtilis* в присутствии 50-100 мМ $MgCl_2$ и, подобно нашим результатам, формировании более гладких и глянцевых пленок (рис. 6). Однако, результаты наших исследований свидетельствуют о формировании более плотных биопленок и повышении общего выхода их биомассы. Это свидетельствует о том, что механизмы регуляции пленкообразования ионами магния могут быть вариативными у различных представителей *B. subtilis*. Сернокислые соли

магния и аммония в концентрациях 10-20 мМ в некоторой степени стимулировали увеличение синтеза липопептидов исследуемым штаммом (рис. 7А), тогда как соли других металлов не оказывали существенного эффекта. Большинство солей в концентрации 100 мМ оказывали негативное влияние на продукцию циклических липопептидов *B. subtilis* IB-54 при его глубинном культивировании (рис. 7Б). В то же время, имеются сведения о способности ионов некоторых металлов оказывать влияние на качественный состав и структуру циклических липопептидов, т.к. сурфактин [Bartal et al., 2018]. Эти данные демонстрируют существенное значение минерального питания растений для эффективной колонизации ризосферы PGPB-бактериями и их антагонистической активности.

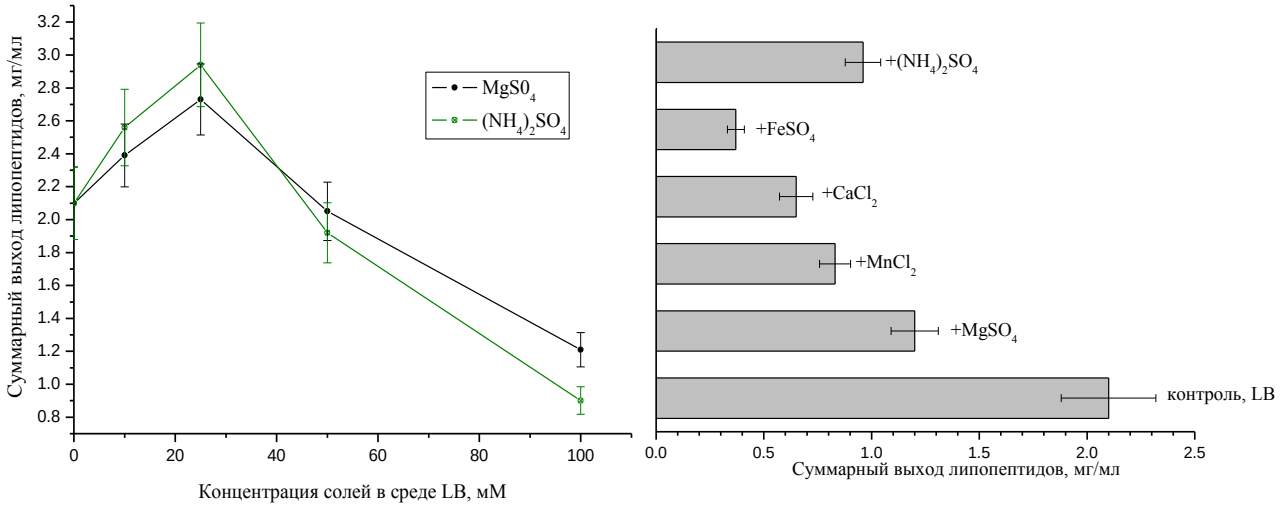

Рис. 9. Влияние некоторых минеральных солей на степень накопления циклических липопептидов в культуральной среде штамма *B. subtilis* IB-54. (А) Влияние сернокислых магния и аммония в интервале 10-100 мМ. (Б) Влияние солей различных металлов при концентрации 100 мМ.

Таким образом, среди источников углерода арабиноза, лактоза и, в меньшей степени, глюкоза, а среди минеральных солей – сульфаты магния и аммония стимулируют формирование поверхностной биопленки *in vitro* штаммами *B. subtilis* и *B. licheniformis*, а также могут приводить к изменению ее поверхностной структуры и пигментирования. Вместе с тем, характер влияния перечисленных соединений на уровень продукции циклических липопептидов бациллами в глубинной культуре имеет специфические отличия, которые определяются условиями роста и метаболической активности планктонных клеток.

Растворимый хитозан (СД 85%) в концентрациях 0,02-0,1% подавляет образование биопленки и синтеза липопептидов штаммами группы *B. subtilis* более чем на 90%, что имеет важное значение в оценке эффективности и перспектив комбинированного применения этого биоактивного полисахарида совместно с PGPR-бактериями для защиты растений от фитопатогенов. В целом, отмечена высокая степень корреляции между интенсивностью формирования биопленок и продукцией циклических липопептидов штаммами *Bacillus* и *Paenibacillus* и их антагонистической активностью, что позволяет рассматривать оценку пленкообразования бактерий в качестве вторичного критерия при скрининге высокоантагонистических штаммов и продуцентов липопептидных антибиотиков. Полученные результаты отражают некоторые особенности формирования биопленок PGPB-бактериями родов *Bacillus* и *Paenibacillus* и могут быть использованы при разработке на их основе новых полифункциональных биопрепаратов для растениеводства.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России №075-00326-19-00 по теме № АААА-А18-118022190098-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуганов Г.Э., Сафина В.Р., Галимзянова Н.Ф., Кузьмина Л.Ю., Гильванова Е.А., Бойко Т.Ф., Мелентьев А.И. Устойчивость к хитозану бактерий и микромицетов, различающихся по способности к продукции внеклеточных хитиназ и хитозаназ // Микробиология. 2018. Т. 87. № 5. С. 599-609.
2. Егоров Н.С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности // М.: Высшая школа. 1965. 211 с.
3. Морозов Ю.М., Мелентьев А.И., Кузьмина Л.Ю. Ультраструктура клеток пшеницы при развитии бактерий *Bacillus* sp. - активного начала бактериального инокулята Бациспецин БМ // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 1. С. 36-43.
4. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка-«город микробов» или аналог многоклеточного организма // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2. С. 149-163.
5. Шульга А.Н., Елисеев С.А., Карпенко Е.В., Кирчив А.Р., Туровский А.А. Биоэмульгатор, образуемый культурой *Bacillus* species, и его свойства // Микробиол. журнал. 1990. Т. 52. № 5. С. 78-82.
6. Aktuganov G., Jokela J., Kivela H., Khalikova E., Melentjev A., Galimzianova N., Kuzmina L., Kouvonen P., Himanen J.-P., Susi P., Korpela T. Isolation and identification of cyclic lipopeptides from *Paenibacillus ehimensis*, strain IB-X-b // J. Crom. B. 2014. V. 973. P. 9-16.
7. Arciola C.R., Campoccia D., Ravaioli S., Montanaro L. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm structural and regulatory aspects // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2015. V. 5. Art. 7. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00007
8. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 307–319.
9. Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S.., Vivanco J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. P. 233–266.
10. Bartal A., Vigneshwari A., Boka B., Vörös M., Takacs I., Kredics L., Manczinger L., Varga M., Vagvölgyi C., Szekeres A. Effects of different cultivation parameters on the production of surfactin variants by a *Bacillus subtilis* strain // Molecules. 2018. V. 23. No. 10. P. 2675. DOI: 10.3390/molecules23102675
11. Chai Y., Beauregard P.B., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis* // MBio. 2012. V. 3. No. 4: e00184-12. DOI: 10.1128/mBio.00184-12
12. Chi M., Li G., Liu Y., Liu G., Li M., Zhang X., Sun Z., Sui Y., Liu J. Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology // Biol. Control. 2015. V. 90. P. 113–119.
13. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. No. 9. P. 4951-4959.
14. Costerton J.W. The Biofilm Primer. Springer, Hiedelberg, 2007. 200 p.

15. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. V.l9. P. 847-867.
16. Davey M.E., Caiazza N.C., O'Toole G.A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 1027-1036.
17. David B.V., Chandrasehar G., Selvam P.N. *Pseudomonas fluorescens*: a plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with potential role in biocontrol of pests of crops / In: New and Future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Elsevier: Amsterdam, 2018. P. 221-243. DOI: 10.1016/B978-0-444-63987-5.09997-7
18. de Weert S., Vermeiren H., Mulders I.H., Kuiper I., Hendrickx N., Bloemberg G.V., Vanderleyden J., De Mot R., Lugtenberg B.J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* // Mol. Plant Microbe Interact. 2002. V. 15. No. 11. P. 1173-1180.
19. Fan B., Chen X.H., Budiharjo A., Bleiss W., Vater J., Borriss R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein // J. Biotechnol. 2011. V. 151. P. 303-311.
20. Govinasami V., Senthilkumar M., Magheshwaran V., Kumar U., Bose P., Sharma V., Annapurna K. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In: Plant growth and health promoting bacteria. Ed. by D.K. Maheshawari. Springer: Heidelberg. Dordrecht. London. NY., 2010. P. 333-364. DOI: 10.1007/978-3-642-13612-2
21. Grady E.N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yan Z.C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review // Microb. Cell Fact. 2016. V. 15. No. 1. P. 203. DOI: 10.1186/s12934-016-0603-7
22. Haas D., Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads // Nat. Rev. Microbiol. 2005. V. 3. No. 4. P. 307-319.
23. Haggag W.M., Timmusk S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease // J. Appl. Microbiol. 2008. V.104. P. 961-969.
24. Hofemeister J., Conrad B., Adler B., Hofemeister B., Feesche J., Kucheryava N., Steinborn J., Franke P., Grammel N., Zwinstcher A., Leenders F., Hitzeroth G., Vater J. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3 // Mol. Genet. Genomics. 2004. V. 272. P. 363-378.
25. Khezri M., Ahmadzadeh M., Jouzani G.S., Behboudi K.,Ahangaran A., Mousivand M., Rahimian H. Characterization of some biofilm-forming *Bacillus subtilis* strains and evaluation of their biocontrol potential against *Fusarium culmorum* // J. Plant Pathol. 2011. V. 93. P. 373–382.
26. Kinsinger R.F., Shirk M.C., Fall R. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion // J. Bacteriol. 2003. V. 185. P. 5627-5631.
27. Liu Y-C., Chang K-G., Chang C.-Yi. Modulation of host biology by *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecules: messengers or traitors // Front. Microbiol. 2015. V. 6. DOI: 10.3389/fmicb. 2015.01226
28. Lugtenberg B.J., Dekkers L., Bloemberg G.V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas* // Annu. Rev. Phytopathol. 2001. V. 39. P. 461-490.
29. McSpadden Gardener B.B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems // Phytopathology. 2004. V. 94. P. 1252-1258.

30. Oknin H., Steinberg D., Shemesh M. Magnesium ions mitigate biofilm formation of *Bacillus* species via downregulation of matrix genes expression // Front. Microbiol. 2015. V. 6. P. 907. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00907
31. Ongena M., Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol // Trends Microbol. 2008. V. 16. No. 3. P. 115-125.
32. O'Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis // Mol. Microbiol. 1998. V.28. No. 3. P.449-461.
33. Pandin C., Le Coq D., Canette A., Aymerich S., Briandet R. Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents? // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. No. 4. DOI: 10.1111/1751-7915.12693
34. Rahman M.S., Ano T., Shoda M. Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* // J. Biotechnol. 2007. V. 127. No. 3. P. 503-507.
35. Ramey B.E., Koutsoudis M., von Bodman S.B., Fuqua C. Biofilm formation in plant-microbe associations // Curr. Opin. Microbiol. 2004. V. 7. No. 6. P. 602-609.
36. Raza W., Yang W., Shen Q.-R. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment // J. Plant Pathol. 2008. V. 90. No. 3. P. 419-430.
37. Selin C., Habibian R., Poritsanos N., Athukorala S.N.P., Fernando D., de Kievit T.R. Phenazines are not essential for *Pseudomonas chlororaphis* PA23 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*, but do play a role in biofilm formation // FEMS Microbiol. Ecol. 2010. V. 71. P. 73–83.
38. Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Mol. Microbiol. 2005. V. 56. P. 845-857.
39. Stepanovic S., Vukovi D., Hola V. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci* // APMIS. 2007. V. 115. P. 891-899.
40. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria // Curr. Prot. in Mol. Biol. 2001. V. 56. No. 1. P. 2.4.1-2.4.5. DOI: 10.1002/0471142727.mb0204s5
41. Yan L., Boyd K.G., Adams D.R., Burgess J.G. Biofilm-specific cross-species induction of antimicrobial compounds in bacilli // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. P. 3719-3727.
42. Zeriouh H., de Vicente A., Perez-Garcıa A., Romero D. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity // Environ. Microbiol. 2014. V. 16. No. 7. P. 2196-2211.
43. Zhang N., Yang D., Wang D., Miao Y., Shao J., Zhou X., Xu X., Li Q., Feng H., Li S., Shen Q., Zhang R.. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates // BMC Genomics. 2015. V. 16. P. 685. DOI: 10.1186/s12864-015-1825-5
44. Zhou H., Luo C., Fang X., Xiang Y., Wang X., Zhang R., Chen Z. Loss of gltB inhibits biofilm formation and biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* Bs916 by altering the production of c-polyglutamate and three lipopeptides // PLoS ONE. 2016. V.11. P. 1-20.