

На правах рукописи

Телешева Елизавета Михайловна

Анализ формирования и микроструктуры биопленок

Azospirillum baldaniorum

1.5.11 – микробиология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Оболенск – 2022

Работа выполнена в Институте биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Саратов

Научный руководитель:

Шелудько Андрей Вячеславович – доктор биологических наук (специальность 1.5.11 – микробиология), Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория генетики микроорганизмов, заведующий лабораторией, г. Саратов

Официальные оппоненты:

Николаев Юрий Александрович – доктор биологических наук (специальность 1.5.11 – микробиология), Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, лаборатория выживаемости микроорганизмов, заведующий лабораторией, г. Москва

Селицкая Ольга Валентиновна – кандидат биологических наук (специальность 1.5.11 – микробиология), Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет-МСХА имени К.А. Тимирязева» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, кафедра микробиологии и иммунологии, заведующая, г. Москва

Ведущая организация:

Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Казань

Защита диссертации состоится « ___ » _____ 2022 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, территория «Квартал А», дом 24.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан « ___ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Альфапротеобактерии *Azospirillum* заселяют разнообразные экологические ниши, – обитают и в фитосфере, в частности, в ризосфере и ризоплане. Азоспириллы обладают гибким метаболизмом и способны оказывать стимулирующее действие на рост и развитие широкого круга растений, в том числе, злаковых культур (Döbereiner, 1983; Döbereiner, Pedrosa, 1987; Bashan, de-Bashan, 2010; Fibach-Paldi *et al.*, 2012). Эти бактерии фиксируют азот, продуцируют фитогормоны, нейтрализуют токсические соединения, способны улучшать поступление минеральных веществ в растения и подавлять развитие фитопатогенов (Sraeren *et al.*, 2009; Nihorimbere *et al.*, 2011; Vacheron *et al.*, 2013; Fukami *et al.*, 2018b; Cassan *et al.*, 2021).

В жидкостях азоспириллы перемещаются, используя одиночный полярный жгутик (Fla). В полужидких средах и по влажным поверхностям эти микробы роятся при помощи Fla и латеральных жгутиков (Laf) (Tarrand *et al.*, 1978; Hall, Krieg, 1983; Elmas *et al.*, 2019). Полярная флагелла обеспечивает контакт и прикрепление азоспирилл к корням растений, с которыми они создают взаимовыгодные ассоциации (Croes *et al.*, 1993). Часто, зафиксировавшись на поверхности, микробы способны строить биопленки – бактерии, внедренные в слизистый матрикс (Flemming, Wingender, 2010; Bogino *et al.*, 2013; Ramírez-Mata *et al.*, 2018). Внеклеточный матрикс биопленок содержит большое количество воды, состоит из различных биополимеров, обеспечивающих адгезию к поверхности, структурную и функциональную целостность пленок. Расположенные на бактериальной поверхности структуры и органеллы тоже интегрированы в матрикс, могут обеспечивать его стабильность и поддерживать архитектуру пленок, на которую оказывают влияние множество факторов, включая гидродинамические условия, концентрацию питательных веществ, подвижность бактерий и их коммуникацию друг с другом. (Flemming, Wingender, 2010; Bogino *et al.*, 2013; Ramírez-Mata *et al.*, 2018). У каждого вида, или даже штамма бактерий, структурные элементы биопленок и регуляторные механизмы их формирования могут различаться.

Другими словами, «биопленок столько же, сколько и бактерий» (López *et al.*, 2010; Bogino *et al.*, 2013). Анализ процесса образования бактериями пленок и их структурных компонентов необходим для понимания механизмов образования и разрушения биопленок, подбора способов управления этими процессами не только в медицинских, но и в биотехнологических целях (Плакунов с соавт., 2017).

Степень разработанности темы исследования. Азоспириллы способны формировать биопленки как самостоятельно, так и совместно с другими микроорганизмами (межвидовое взаимодействие бактерий является существенным составляющим процесса адаптации инокулянтов к их существованию в ризосфере) (Gomez-Villalba *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2008; Pagnussat *et al.*, 2016; Dos Santos Lima Fagotti *et al.*, 2019). Внимание исследователей привлекает возможная взаимосвязь между метаболизмом азота или его неорганических соединений и образованием азоспириллами биопленок (Palma *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2017).

Довольно подробно изучен хемотаксис азоспирилл, множество исследований посвящено процессу прикрепления данных бактерий к абиотическим и биотическим поверхностям. Но все вышеупомянутые явления в литературных источниках широко описаны в целом, без акцента на их взаимосвязь с процессом образования биопленочных сообществ.

В начале данного исследования имелось мало экспериментальных данных о роли экзополимеров и экстраклеточных органелл в процессах, связанных с образованием биопленок азоспириллами. Показано, что нарушения в синтезе полярной флагеллы, липополисахаридов (ЛПС) и полисахаридов, связывающих калькофлуор (ПССК), заметно влияли на эффективность формирования биопленок соответствующими мутантами штамма *A. baldaniorum* Sp245^T (ранее *A. brasilense*; Dos Santos Ferreira *et al.*, 2020) на абиотических поверхностях (Шелудько с соавт., 2008). Инактивация у Sp245^T генов, предположительно кодирующих гипотетические tad-пилы, приводила к подавлению образования пленок

соответствующим мутантом этого штамма (Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011). Информация о микроструктуре биопленок азоспирилл; морфологии клеток, интегрированных в биопленку; основных компонентах матрикса, стабилизирующих ее структуру, фрагментарна (Шелудько с соавт., 2010; Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011; Ramírez-Mata *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017; Viruega-Góngora *et al.*, 2020; Шелудько с соавт., 2020) и необходима для понимания связи процессов, обеспечивающих образование биопленочных сообществ, с адаптацией этих бактерий к существованию в корневой системе растений.

Объектом данного исследования выбран типовой штамм *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T (ранее *A. brasilense*; Dos Santos Ferreira *et al.*, 2020), обладающий всеми характеристиками, необходимыми для образования ассоциаций с растениями, и являющийся факультативным эндофитом (Baldani *et al.*, 1983; Assmus *et al.*, 1995). В работе использованы производные этого штамма с нарушениями в образовании и функционировании жгутиков. Такие мутанты являются удобной моделью для изучения роли этих и других структур клеточной поверхности и экзополимеров в организации матрикса биопленок. Жгутики бактерий часто интегрированы в матрикс биопленок и поддерживают его архитектуру (Flemming, Wingender, 2010; López *et al.*, 2010; Vogino *et al.*, 2013).

Целью данной работы стало сравнительное исследование микроструктуры биопленок и процесса их формирования культурами штамма *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутантами, утратившими способность к образованию двигательных органелл.

Поставленная цель определила следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать динамику формирования бактериями биопленок на границе раздела фаз жидкость – твердая абиотическая поверхность.
2. Провести анализ влияния условий культивирования на формирование биопленок штаммом *A. baldaniorum* Sp245^T, его мутантами, лишенными жгутиков, и их комплементантами, получившими в составе вектора pRK415 последовательность соответствующего гена.
3. Сравнить свойства клеточной поверхности и процесс формирования биопленок у штамма *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутантов с дефектами в жгутиковании по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1*.
4. Исследовать углеводсодержащие и белковые компоненты биомассы биопленок, оценить их роль в организации биопленочного матрикса *A. baldaniorum* Sp245^T.

Научная новизна работы. Выявлено, что основными стадиями формирования биопленок бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T на границе раздела жидкость – твердая абиотическая поверхность являются: адсорбция и адгезия клеток, прирост и стабилизация биомассы. Отсутствие полярного жгутика у соответствующего мутанта влияет на продолжительность адгезии бактериальных клеток к модельной поверхности.

Впервые показано, что прирост биомассы биопленок азоспирилл определяется плотностью популяции бактерий, закрепившихся на субстрате, и не зависит от скорости роста планктонных культур. Дальнейшее развитие биопленок обуславливают различные клеточные структуры, представленные на бактериальной поверхности, в том числе определяющие ее физико-химические свойства.

Анализ влияния условий культивирования на формирование биопленок штаммом *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутантом, лишенным жгутиков, с инактивированной хромосомной копией гена *flhB* (*flhB1*) показал, что биопленки мутанта, содержащие меньшее количество биомассы, более подвержены воздействию сил гидродинамического сдвига. Сохранение полярного жгутика интегрированными в биопленку клетками родительского штамма *A. baldaniorum* Sp245^T или соответствующего мутанта, получившего в составе вектора pRK415 последовательность белка FlhB1 жгутиковой системы секреции III типа, способствует ее стабилизации.

Обнаружено, что инактивация предполагаемых генов липидного метаболизма *fabG1* и *mmsB1* у бактерии *A. baldaniorum* Sp245^T приводит не только к нарушениям в жгутиковании и подвижности клеток, но и к изменению содержания жирных кислот в составе

липополисахаридов, степени гидрофобности, гемагглютинирующей активности, способности к агрегации клеток, уменьшению количества биомассы биопленок. В зрелых биопленках соответствующих мутантов, сформированных на гидрофобной поверхности, увеличивается содержание липополисахаридных антигенов.

Показано, что полисахариды, связывающие калькофлуор, комплексы, содержащие ЛПС и белковые структуры, выполняют каркасную функцию и обеспечивают фиксацию биопленок азоспирилл на твердой поверхности. В матриксе биопленок присутствует углеводный гаптен, обладающий специфическим сродством к агглютинину зародышей пшеницы (АЗП). Впервые получены косвенные данные о присутствии в биомассе биопленок азоспирилл структур амилоидной природы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость проделанной работы заключается в получении знаний, расширяющих сложившиеся представления о взаимосвязи между процессами, обеспечивающими образование почвенными бактериями биопленочных сообществ, и их адаптацией к существованию в динамичной среде обитания.

Данное направление исследований является интересным и перспективным для практического применения, в частности, при подборе и конструировании микроорганизмов и их использовании в биотехнологических, медицинских и экологических отраслях.

Описанные в работе теоретические изыскания, разработанные методические приемы и подходы используются в исследованиях, выполняемых в четырех лабораториях ИБФРМ РАН (генетики микроорганизмов, биохимии, микробиологии и иммунохимии), что частично отражено в публикациях по теме диссертации.

Полученные свежие сведения о процессе формирования биопленок культурами штамма *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутантами, утратившими способность к синтезу жгутиков, используются при чтении лекций и подготовке практических занятий по дисциплинам «Микробиология» и «Методы изучения бактериальной подвижности» в рамках программы высшего образования – программы подготовки научно-педагогических кадров высшей квалификации в аспирантуре при ИБФРМ РАН (Справка о внедрении № 106-04-1.4-414.1 от 20.10.2021 г. – учрежденческий уровень внедрения). Материалы диссертационной работы, теоретические изыскания и разработанные методические приемы используются в научно-образовательном центре «Промышленная экология» как инновационный подход в его научно-исследовательской деятельности в рамках проекта по оценке формирования и структуры бактериального загрязнения систем замкнутого водоснабжения (Справка о внедрении от 20.10.2021 г. – учрежденческий уровень внедрения).

Результаты диссертационной работы использованы при составлении учебно-методического пособия «Методы изучения формирования биопленок почвенными бактериями, стимулирующими рост растений» / Сост.: Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., Телешева Е.М. и др.; под ред. Ю.П. Федоненко: учеб.–метод. пособие для студентов и аспирантов хим. и биол. профиля. – Саратов, 2021. – 40 с. (Выписка из протокола заседания Ученого совета № 4 от 12.04.2021 г. – учрежденческий уровень внедрения). Данное пособие используется при чтении лекций и проведении практических занятий студентов Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю.А. направлений «Экология и природопользование», «Природообустройство и водопользование», «Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии», «Техносферная безопасность» по следующим дисциплинам: «Микробиология», «Биотехнология», «Экология животных, растений и микроорганизмов» (Справка о внедрении от 20.10.2021 г. – учрежденческий уровень внедрения).

Методология и методы исследования. Объектом данного исследования являлись биопленки бактерий рода *Azospirillum*. Теоретической основой для проведения экспериментальных работ послужили научные труды российских и зарубежных авторов. Полученные результаты регистрировались на современном калиброванном оборудовании и анализировались с использованием современных программ статистической обработки

данных. В работе использован штамм *A. baldaniorum* Sp245^T (ранее *A. brasilense* Sp245), выделенный в Бразилии из корней пшеницы (Baldani *et al.*, 1983; Dos Santos Ferreira *et al.*, 2020), из Коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (IBPPM 219). Его производные получены в ЛГМ ИБФРМ РАН – Sp245 (pRK415) и Sp245 (pRK415–150176) и мутанты SK039 (*mmsB1::Omegon-Km* (leaky Fla⁻ Mot⁻ Swa⁻)), SK039 (pRK415), SK039 (pRK415–*mmsB1*), Sp245.1063 (*flhB1::Omegon-Km* (Fla⁻ Laf⁻)), Sp245.1063 (pRK415), Sp245.1063 (pRK415–150177), Sp245.1063 (pRK415–150176) и Sp245.1610 (*fabG1::Omegon-Km* (leaky Fla⁻/Mot⁻ Laf⁻)) (Scheludko *et al.*, 1998; Ковтунов *et al.*, 2013; Filip'echeva *et al.*, 2018; Scheludko *et al.*, 2019a, b). В работе применяли традиционные и современные микробиологические и биохимические методы. Количество биомассы биопленок оценивали способом, описанным O'Toole, Kolter (1998). Фазово-контрастную, просвечивающую электронную и атомно-силовую микроскопию (АСМ) выполняли на приборах, находящихся в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия). Твердофазный непрямой иммуноферментный анализа (ИФА) проводили, как описано в работе Шелудко с соавт. (2008). Статистический анализ проводили с использованием пакета Microsoft Office Excel 2007; доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости. Данные также были обработаны с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Охарактеризована динамика образования биопленок бактериями *A. baldaniorum* Sp245^T на границе раздела жидкость – твердая поверхность.

2. Сохранение полярного жгутика клетками штамма *A. baldaniorum* Sp245^T, интегрированными в биопленку, способствует ее стабилизации. Биопленки лишённого жгутиков мутанта с инактивированной хромосомной копией гена *flhB* (*flhB1*), содержащие меньшее количество биомассы, более чувствительны к действию сил гидродинамического сдвига. Количество биомассы в зрелых биопленках восстанавливается у мутанта, получившего в составе pRK415 последовательность белка FlhB1, во всех экспериментальных условиях.

3. Инактивация предполагаемых генов липидного метаболизма *fabG1* и *mmsB1*, помимо дефектов в жгутиковании и подвижности клеток, приводит к изменению свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у соответствующих мутантов *A. baldaniorum* Sp245^T. Введение плазмиды pRK415 с CDS *mmsB1* штамма Sp245^T в клетки соответствующего мутанта оказывает значительное положительное влияние на накопление им биомассы в биопленках.

4. Охарактеризованы полисахариды и их комплексы, содержащие белковые структуры, фиксирующие зрелые биопленки на твердой поверхности и выполняющие функцию каркаса. В зрелых биопленках обнаружен гаптен, обладающий сродством к агглютиниону зародышей пшеницы. Получены данные о наличии в биомассе биопленок азоспирилл структур амилоидной природы.

Степень достоверности и апробация результатов. Экспериментальные данные получены на сертифицированном и прошедшем поверку оборудовании с использованием реактивов квалификации «ч.д.а.» и «х.ч.». Воспроизводимость результатов подтверждена проведением серии независимых экспериментов. Выводы базируются на итогах анализа значительного объема статистически обработанных данных.

Материалы диссертации представлены на VI, VII и VIII Всероссийских конференциях молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, 2012; 2014; 2016); 6-ой, 7-й и 8-й Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Экологические проблемы промышленных городов» (Саратов, 2013; 2015; 2017); VI Всероссийском с международным участием конгрессе молодых ученых-биологов «Симбиоз–Россия 2013» (Иркутск); II Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Саратов, 2014); Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы» (Саратов, 2014); Международной молодежной научной конференции «Человек, экология, культура:

современные практики и проблемы» (Саратов, 2014); Международной научно-практической конференции «Вавиловские чтения – 2015» (Саратов); Международном симпозиуме и школе «Биодиагностика и оценка качества природной среды: подходы, методы, критерии и эталоны сравнения в экотоксикологии» (Москва, 2016); 2-ой Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020); 10-й Международной научно-практической конференции «Экологические проблемы промышленных городов» (Саратов, 2021). Всего в материалах конференций опубликовано 34 работы.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования.

Работа выполнена в лаборатории генетики микроорганизмов (ЛГМ) ИБФРМ РАН в рамках тем НИР: «Генетический анализ социального поведения ассоциативных альфапротеобактерий *Azospirillum brasilense*» (№ гос. регистрации 01201359055); «Генетический анализ вклада гликополимеров и жгутиков в социальную жизнь альфапротеобактерий *Azospirillum brasilense*» (№ гос. регистрации 117102740095-7); «Выявление структурно-функциональных особенностей биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий, детерминирующих образование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания» (№ гос. регистрации 121032300311-5). Работа частично поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований № 06-04-48204-а (к.б.н. Петрова Л.П.) и № 20-04-00006-а (д.б.н. Шелудько А.В.), стипендией Правительства Российской Федерации (Телешева Е.М., приказ № 1130 от 13.10.2015 г.).

Автор владеет микробиологическими и биохимическими методами анализа и творчески подходит к планированию и проведению экспериментов. Автором произведен анализ литературы по теме, проанализированы результаты и обобщены полученные данные. Научные положения и выводы диссертации основываются на исследованиях, выполняемых автором лично. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. А.В. Шелудько и д.б.н. проф. Е.И. Кацы за помощь в интерпретации результатов. Автор также признателен участвовавшим в проведении исследований коллегам из ИБФРМ РАН к.х.н. А.М. Бурову, к.б.н. Г.Л. Бурьгину, С.С. Евстигнеевой, к.б.н. Л.П. Петровой, к.б.н. Е.Г. Пономаревой и к.б.н. Ю.А. Филипьевой, чей вклад отражен в совместных публикациях. Научные статьи по теме работы подготовлены как лично автором, так и при его непосредственном участии.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 48 работ в научных сборниках, периодических научных изданиях и в материалах научных конференций, в том числе: восемь статей в журналах, реферируемых международными базами данных, две статьи, реферируемые РИНЦ, и одно учебно-методическое пособие.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы исследования», четырех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемых источников, содержащего 416 работ, из которых 86 опубликованы в отечественных, а 330 в зарубежных изданиях. Диссертация иллюстрирована 6 таблицами, 18 рисунками и изложена на 172 страницах.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Исследование динамики формирования бактериями биопленок и микроструктуры биопленок

Подвижность азоспирилл обеспечивается жгутиками – одиночным Fla и многочисленными Laf, образование которых индуцируется при повышенной плотности среды. Fla используется азоспириллами также для закрепления на поверхности корней растений. Известно, что свободноплавающие бактерии утрачивают зависящую от жгутиков подвижность при переходе к существованию в составе биопленки. В тоже время инактивация генов, отвечающих за подвижность, негативно влияет на формирование микробами биопленок (Sauer *et al.*, 2002; Verstraeten *et al.*, 2008; Guttenplan, Kearns, 2013). В связи с этим, на начальном этапе охарактеризовали основные стадии формирования биопленок и провели сравнительные исследования данного процесса у культур А.

baldaniorum Sp245^T и его *flhB1* мутанта (Sp245.1063), утратившего способность к синтезу Fla и Laf. При инкубировании Sp245^T и Sp245.1063 в жидкой среде LB в течение 24 ч на поверхности пробирок формировались тонкие пленки, состоящие из разрозненных клеточных агрегатов (микроколоний), легко смываемые при аспирации. На 2 сутки численность бактерий, адсорбированных на твердой поверхности, увеличивалась. Это сказывалось на приросте биомассы биопленок (рисунок 1). На 2-3 сутки культивирования в жидкой среде LB биомасса закрепившихся на поверхности пробирок азоспирилл стабилизировалась, существенных межштаммовых различий у Sp245 и Sp245.1063 не наблюдалось (рисунок 1). Очевидно, процесс адгезии бактерий на поверхности стекла завершался в данном временном промежутке. К 3 суткам инкубации отмечалось формирование пленки с более ровной поверхностью за счет соединения бактериальных микроколоний и начинался прирост биомассы. В случае Sp245.1063 количество биомассы в биопленке стабилизировалось к 4-5 суткам инкубации и не менялось на всем протяжении культивирования (рисунок 1). «Толщина» биопленок, сформированных штаммом Sp245^T, становилась постоянной позже – после 6 дней инкубации (рисунок 1).

При культивировании Sp245^T и Sp245.1063 в жидкой среде LB в течение 6 суток, результаты микроскопии показали, что высота их биопленок составляла 33.7 ± 3.5 и 23.7 ± 2.5 мкм, соответственно. Таким образом, толщина биопленок мутанта – $(70.3 \pm 7.5)\%$ от этого показателя у Sp245^T. При окрашивании 6-суточных биопленок оптическая плотность красителя, десорбированного из биопленок Sp245.1063, составляла $(58.6 \pm 4.4)\%$ от данного показателя у штамма Sp245^T (рисунок 1). Полученные данные толщины и относительного количества биомассы биопленок отлично согласовывались.

Итак, процесс формирования бактериальной биопленки на границе раздела жидкость – твердая поверхность в стационарных условиях протекает в несколько этапов: адсорбция, адгезия, прирост и стабилизация биомассы.

В условиях перемешивания культуры Sp245^T и Sp245.1063 росли практически с одинаковой скоростью в жидких средах LB или MSM. В стационарных условиях планктонные культуры Sp245.1063 отставали в росте от Sp245^T. Оказалось, что различия в росте планктонных культур Sp245^T и Sp245.1063 в стационарных условиях не влияли

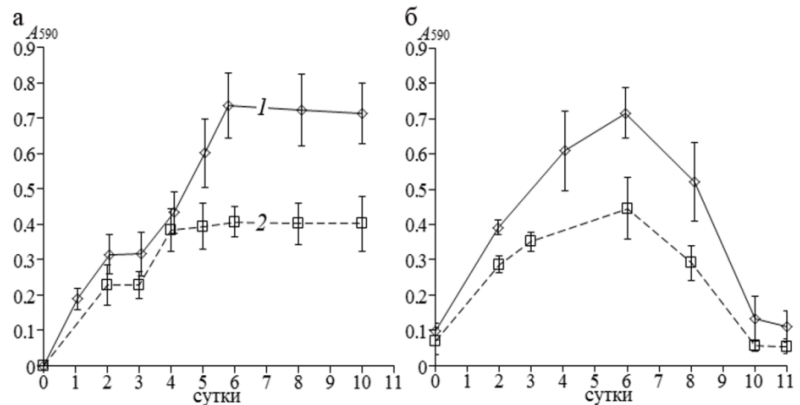


Рисунок 1 – Динамика накопления биомассы в биопленках, сформированных бактериями Sp245^T (1) и Sp245.1063 (2) на поверхности стекла (а), и изменение плотности планктонных культур (б) этих штаммов при длительной инкубации в LB в стационарных условиях. A_{590} – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок (а), или оптическая плотность планктонных культур (б).

на начало этапа прироста биомассы пленок этих штаммов (рисунок 1). Данный процесс начинался с 3 суток инкубации после стабилизации биомассы азоспирилл, закрепившихся на поверхности стекла. Стоит отметить, что на данном этапе существенные различия в толщине бактериальных пленок Sp245^T и Sp245.1063 отсутствовали (рисунок 1). Вероятно, процесс прироста биомассы пленок у азоспирилл в значительной степени определяется плотностью популяции бактерий, закрепившихся на субстрате, независимо от скорости роста планктонных клеток. Дальнейшее развитие пленок во многом обуславливают поверхностные структуры бактериальных клеток, что нашло подтверждение при сравнении динамики формирования биопленок штаммом Sp245 и его мутантом без жгутиков (рисунок 1).

К 4-6 суткам инкубации внешний слой биопленки Sp245^T состоял из кластеров бактерий, компактно примыкающих друг к другу. Каждый кластер в среднем состоял из 5 ± 1

клеток. У мутанта Sp245.1063 картина иная – биопленки образовывали бактерии с разреженным расположением клеток.

С помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) в биопленках Sp245 обнаружили клетки, на полюсе которых находился филамент, сходный с полярным жгутиком. В суспензиях, смытых с поверхности стекла биопленок, морфология жгутика и его расположение на бактериях были сходными у особей как из биопленок, так и из жидкой 18-часовой культуры Sp245^T (просвечивающая электронная микроскопия). В фиксированных нативных биопленках Sp245^T при АСМ клетки с полярным жгутиком находились в тесном контакте с бактериями, образующими пленку. Таким образом, данные клетки оказывались интегрированными в биопленку. Отбор материала для АСМ или электронной микроскопии нативных и смытых со стекла биопленок проводили как на этапе прироста их биомассы, так и из зрелых пленок. Клетки с филаментом жгутика обнаружены во всех препаратах Sp245^T, что свидетельствует о сохранении его синтеза не только на этапе прироста биомассы, но и в зрелых биопленках. В биопленках Fla⁻ Sp245.1063 жгутики у бактерий отсутствовали. Латеральные жгутики отсутствовали у клеток из биопленок Sp245^T, как и у мутанта Sp245.1063.

Характеристика роли полярного жгутика в биопленках A. baldaniorum

В данном разделе предприняли попытку доказать гипотезу о том, что присутствие жгутиков положительно влияет на накопление биомассы и поддержание стабильности биопленки *A. baldaniorum*. Именно поэтому свойства биопленок изучили не только у Sp245^T и его мутанта *flhB1* Sp245.1063, но также у комплементарного мутанта Sp245.1063 (pRK415–150177), содержащего вектор pRK415 с CDS Sp245 AZOBR_150177 белка FlhB аппарата жгутикового экспорта (Filip'echeva *et al.*, 2018b). Имеющиеся данные позволяют предположить, что соседний нисходящий CDS AZOBR_150176 предполагаемого мультисенсорного гибридного сенсорного регулятора ответа гистидинкиназы (HSHK-RR) вместе с FlhB1 играет важную роль в морфологическом ответе азоспириллы на изменения плотности среды (клетки штаммов Sp245 (pRK415–150176) и Sp245.1063 (pRK415–150176) перестали удлиняться на плотных средах (Filip'echeva *et al.*, 2018b)). Пытаясь получить больше данных о биологической роли HSHK-RR, кодируемой AZOBR_150176, подробно изучили некоторые свойства биопленок Sp245 (pRK415–150176) и Sp245.1063 (pRK415–150176). Чтобы исключить влияние вектора pRK415 на свойства биопленок *A. baldaniorum*, использовали контрольные штаммы Sp245 (pRK415) и Sp245.1063 (pRK415).

На начальном этапе исследования сравнили биомассу в пленках, сформированных в статических условиях на границе раздела между стеклом или полистиролом и жидкими средами MSM или LB (рисунок 2; таблица 1). Встраивание вектора pRK415 или плазмиды pRK415–150176 не влияло на способность к формированию биопленок штаммом Sp245^T (рисунок 2; таблица 1). Встраивание pRK415–150176 в мутант Sp245.1063 сопровождалось небольшим увеличением количества биомассы в 6-дневных биопленках, выращенных в жидкой среде LB на полистироле,

Таблица 1 – Формирование биопленок *A. baldaniorum* в лунках полистирольных планшетов под жидкими средами после 6 дней культивирования при 28°C

Штаммы	Относительное количество биомассы в биопленках, образованных в жидкой среде	
	MSM	LB
Sp245 ^T	1.27 ± 0.10 (a)	0.67 ± 0.06 (б)
Sp245 (pRK415)	1.09 ± 0.11 (a)	0.68 ± 0.06 (б)
Sp245.1063	0.27 ± 0.02 (e)	0.39 ± 0.06 (д)
Sp245.1063 (pRK415)	0.29 ± 0.03 (e)	0.36 ± 0.02 (д)
Sp245.1063 (pRK415–150177)	0.64 ± 0.04 (в)	0.69 ± 0.07 (б)
Sp245.1063 (pRK415–150176)	0.30 ± 0.02 (e)	0.44 ± 0.05 (г)
Sp245 (pRK415–150176)	1.14 ± 0.17 (a)	0.70 ± 0.08 (б)
Sp245.1063 (pRK415)	0.29 ± 0.03 (e)	0.36 ± 0.02 (д)

Биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым, связанный краситель экстрагировали этанолом и измеряли A₅₉₀. Данные были обработаны ANOVA. Разные буквы обозначали значимые различия между образцами (p≤0.05).

и не влияло на накопление биомассы биопленок в других условиях культивирования. Однако статистически значимых различий между относительным количеством биомассы в биопленках штамма Sp245.1063 (pRK415–150176) и Sp245.1063 (pRK415) не наблюдали (рисунок 2; таблица 1).

У комплементарного мутанта Sp245.1063 (pRK415–150177) с восстановленным жгутиком и подвижностью как у Sp245^T (Filip'echeva *et al.*, 2018b) восстановление способности накопления биомассы в 6-дневных пленках штамма Sp245.1063 (pRK415–150177) было частичным или полным на границах раздела между твердой поверхностью и жидкими средами MSM или LB, соответственно (рисунок 2; таблица 1).

Laf не встречались на клетках в составе биопленок ни одного из исследуемых штаммов. Fla присутствовал у большого количества клеток из биопленок штаммов Sp245^T, Sp245 (pRK415), Sp245 (pRK415–150176) и Sp245.1063 (pRK415–150177), образованных на разделе жидкость – твердая поверхность. Соответственно, эти штаммы накапливали больше биомассы в биопленках, чем штаммы без жгутиков Sp245.1063, Sp245.1063 (pRK415) и Sp245.1063 (pRK415–150176).

При сравнении формирования биопленок азоспирилл на поверхности стекла при культивировании в стационарных условиях или при перемешивании (140 об/мин). Оказалось, что в случае использования MSM или богатой LB биопленки комплементарного мутанта Sp245.1063 (pRK415–150177), образованные на границе раздела жидкость – твердая поверхность, при встряхивании (140 об/мин) содержали такое же относительное количество биомассы, как и их аналоги, выращенные в статических условиях (рисунок 2). Таким образом, в сходных экспериментальных условиях комплементарный мутант вел себя аналогично штамму Sp245^T дикого типа и производным Sp245^T, несущим pRK415 или pRK415–150176. Напротив, биопленки штаммов без жгутиков Sp245.1063, Sp245.1063 (pRK415) и Sp245.1063 (pRK415–150176), зависели от условий культивирования. Пленки этих штаммов при встряхивании накапливали меньше биомассы по сравнению с их же пленками, выращенными на границе жидкость – стекло в статических условиях (рисунок 2).

Полученные данные доказали, что полярный жгутик необходим *A. baldaniorum* Sp245^T для накопления биомассы биопленок и их стабилизации (в условиях гидродинамического сдвига).

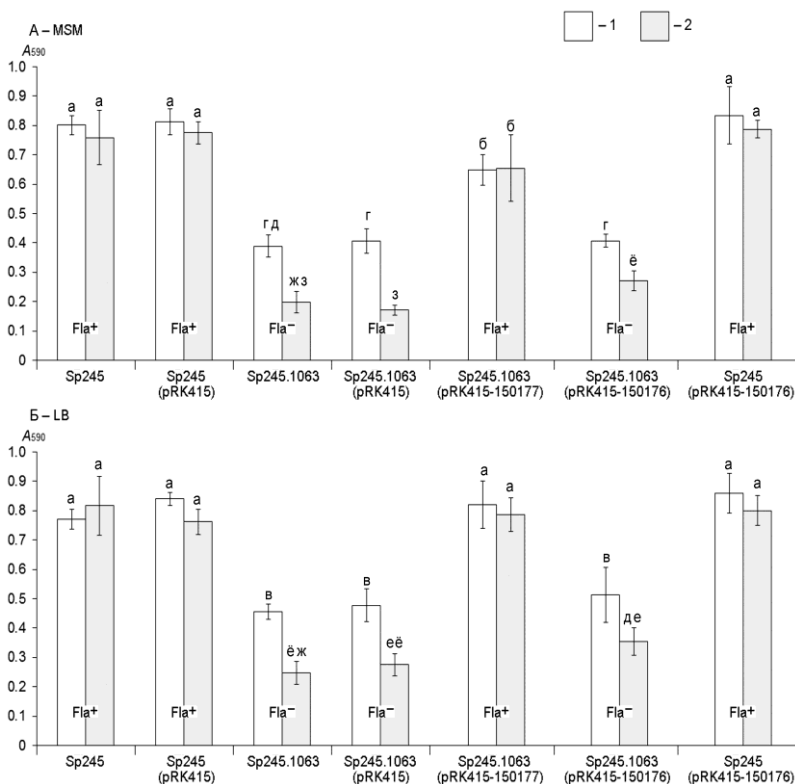


Рисунок 2 – Относительное количество биомассы в 6-дневных биопленках, образованных на поверхности стеклянных пробирок штаммами *A. baldaniorum*, выращенными в жидких MSM (А) и LB (Б) в стационарных условиях (1) и при встряхивании при 140 об/мин (2). Биопленки окрашивали, связанный кристаллический фиолетовый экстрагировали этанолом и измеряли значения A₅₉₀ растворов красителя. Данные были обработаны ANOVA. Буквы над столбцами обозначают значимые различия между образцами (p ≤ 0.05).

*Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерий *A. baumannii* Sp245^T по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1**

Дефекты в жгутировании и подвижности были ранее выявлены у инсерционных мутантов Sp245^T по предполагаемым генам липидного метаболизма – 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназы MmsB1 (SK039) и 3-оксоацил-[ацил-переносающий белок (АПБ)]-редуктазы FabG1 (Sp245.1610) (Ковтунов с соавт., 2013). Не исключено, что мутации в локусах *mmsB1* и *fabG1* привели к изменениям в структуре клеточной оболочки азоспирилл, оказавшим существенное влияние на сборку жгутиков, межклеточные взаимодействия и социальное поведение бактерий.

Динамика формирования биопленок Sp245.1610 не отличалась от таковой у Sp245^T, а в случае SK039 увеличивалась продолжительность стадии прикрепления бактерий к твердой поверхности. Различия в относительном количестве биомассы (рисунок 3) в биопленках штамма Sp245^T и его мутантов проявлялась к 6 суткам инкубирования (зрелые пленки). На гидрофильной поверхности стекла под жидкой средой LB количество биомассы в биопленках Sp245^T и Sp245.1610 было примерно одинаковым, а в биопленках SK039 существенно меньше. Под жидкой MSM количество биомассы было снижено в пленках обоих мутантов (рисунок 3). На гидрофобном полистироле под жидкой LB и MSM оба мутанта формировали менее выраженные биопленки, по сравнению со штаммом дикого типа (рисунок 3).

На всех этапах формирования биопленок в случае Sp245^T выявлялись многочисленные клетки с длинными жгутиками, переплетающимися и образующими сеть. В биопленках SK039 (*leakyFla⁻Mot⁻Swa⁻*) имелась очень небольшая доля клеток с длинным Fla, а на некоторых клетках Sp245.1610 (*leakyFla⁻/Mot⁻Laf⁻*) присутствовал сильно укороченный Fla (рисунок 4). Латеральные жгутики в биопленках ни у одного из исследуемых штаммов обнаружены не были. Зрелые биопленки Sp245^T, Sp245.1610, SK039 и Sp245.1063 содержали везикулы разного размера (рисунок 4), выявлявшиеся чаще при атомно-силовой микроскопии в образцах с границы жидкость – воздух, чем с твердой поверхности.

При культивировании в жидкой среде LB на 2 сутки степень агрегации планктонных культур Sp245.1610 и SK039 превышала таковую у Sp245^T. На 6 сутки степень агрегации планктонных клеток у мутантов не изменялась, а у Sp245^T возрастала примерно в 2 раза (рисунок 5). Вероятно, активная агрегация бактерий уже в планктонной культуре способствовала их прикреплению к твердой поверхности, особенно в случае мутантов без полноценного Fla.

При культивировании в жидкой MSM клетки всех исследуемых штаммов агрегировали примерно в равной степени независимо от времени инкубации и сильнее, чем при культивировании в LB (рисунок 5). Вероятно, это способствовало накоплению большего количества биомассы в биопленках к 6 суткам инкубации на гидрофобной поверхности под

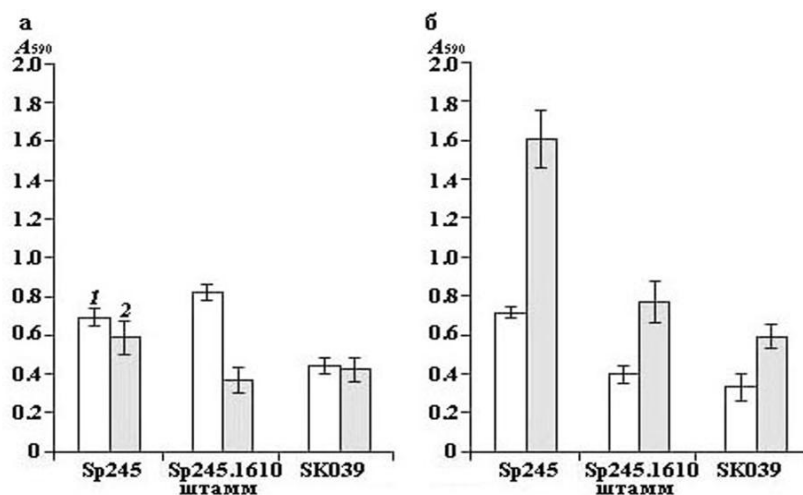


Рисунок 3 – Относительное количество биомассы в биопленках штамма Sp245^T и его мутантов *leakyFla⁻/Mot⁻Laf⁻Swa⁻Sp245.1610* (*fabG1::Omegon-Km*) и *leakyFla⁻Mot⁻Swa⁻SK039* (*mmsB1::Omegon-Km*), сформированных за 6 суток на стекле (а) или полистироле (б) под жидкой средой LB (1) или MSM (2).

*A*₅₉₀ – оптическая плотность кристаллического фиолетового, экстрагированного из окрашенных биопленок.

MSM, по сравнению с таковым под LB (рисунок 3). Тем не менее, и в MSM, и в LB, сохранялись различия в толщине биопленок мутантов и родительского штамма. Штаммы Sp245^T, Sp245.1610 и SK039 отличались также по такому показателю, характеризующему свойства бактериальной поверхности, как относительная гидрофобность планктонных клеток (рисунок 5).

Толщина/биомасса пленок азоспирилл изменялась в ответ на изменение физико-химических параметров среды, окружающей биопленки. Так, через 2 ч после замены культуральной жидкости с планктонной культурой, окружающей 6-суточные биопленки, на 50 мМ фосфатный буфер (ФБ; pH 7.0) часть клеток, образующих пленку, переходила в буфер. Биомасса биопленок всех исследуемых штаммов снижалась в основном на 40-60%. Стоит отметить, что после 6 суток культивирования pH сред LB или MSM, окружающих биопленки, возрастала до величины (8.3 ± 0.1) или (9.3 ± 0.1), соответственно. При использовании вместо ФБ (pH 7.0) культуральной жидкости после удаления 6-суточных планктонных клеток диссоциации биопленок не происходило. Так, после такой инкубации с LB (pH 8.3) спустя 2.5 ч в биопленках штаммов Sp245^T, Sp245.1610, и SK039 сохранялось (93.3 ± 6.6), (95.8 ± 14.8) и (88.0 ± 12.2)% биомассы, соответственно.

Можно предположить, что прикрепление некоторого количества бактерий (клетка/клетка/поверхность) в биопленках обуславливают взаимодействия, чувствительные к изменению таких условий, как pH и/или, вероятно, ионная сила (состав сред LB/MSM отличается по данному показателю от 50 мМ ФБ). Необходимо отметить, что способность к диссоциации в одинаковой степени выражена как у подвижных клеток Sp245^T, так и у неподвижных мутантов.

Для анализа биопленок азоспирилл, сформированных на поверхности полистирола, также использовали ИФА с поликлональными Ат на ЛПС штамма Sp245^T. Отношение

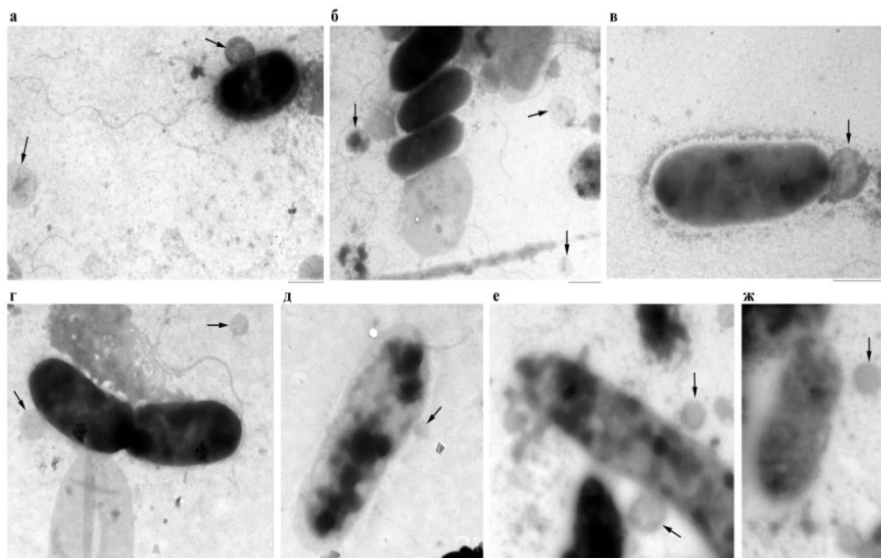


Рисунок 4 – Просвечивающая электронная микроскопия материала из биопленок штаммов Sp245^T (а-в), Sp245.1610 (г, д) и SK039 (е, ж), смытых с поверхности стекла после 6 суток культивирования под жидкой средой LB (а, б, г, е) или MSM (в, д, ж). Стрелки указывают на везикулы. Масштаб 1 мкм.

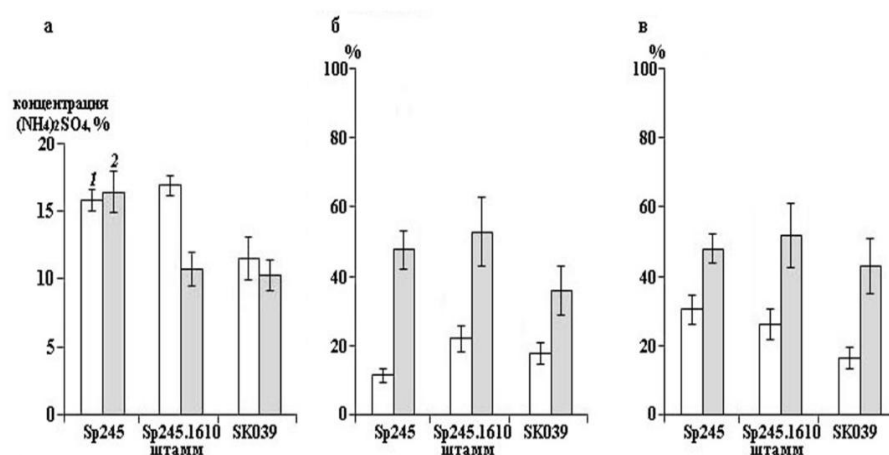


Рисунок 5 – Свойства планктонных клеток штамма Sp245^T и его *fabG1* (Sp245.1610) и *mmsB1* (SK039) мутантов, выращенных в среде LB (1) или MSM (2): относительная гидрофобность клеток из ~20-ч культур, определенная методом высаливания (а); степень агрегации планктонных клеток после 2-х (б) и 6-ти (в) суток культивирования без перемешивания.

Для анализа биопленок азоспирилл, сформированных на поверхности полистирола, также использовали ИФА с поликлональными Ат на ЛПС штамма Sp245^T. Отношение

показателя, характеризующего содержание ЛПС антигенов в биопленках, образованных под жидкой LB/MSM (таблица 2), к показателю, характеризующему их биомассу (рисунок 3), в случае штаммов Sp245^T, SK039 или Sp245.1610 составляло соответственно 0.5/0.3, 1.0/0.8 или 0.8/0.6. Очевидно, что в зрелых биопленках дефектных по жгутикованию мутантов Sp245.1610 и SK039 относительное содержание ЛПС антигенов было выше, чем у Sp245^T.

Формированию контактов между клетками наряду с другими структурами способствуют продуцируемые азоспириллами гемагглютинины (Никитина с соавт., 2001). Различия в структуре поверхности клеток из зрелых биопленок трех штаммов азоспирилл анализировали по изменению их гемагглютинирующей активности.

Суспензии бактериальных клеток из 6-суточных биопленок под LB/MSM, смытых с поверхности

стекла, вызывали агглютинацию трипсинизированных эритроцитов с титром реакции (1:16)/(1:16), (1:4)/(1:4) и (1:1)/(1:4) для штаммов Sp245^T, Sp245.1610 и SK039, соответственно. Белок-гемагглютинин ранее был выделен с поверхности клеток (Шелудько с соавт., 2009). Он взаимодействует с О-полисахаридом штамма *A. baldaniorum* Sp245^T, что, вероятно, способствует установлению межклеточных контактов.

В связи со снижением гемагглютинирующей активности у клеток мутантов в 4-16 раз предположили, что межклеточные взаимодействия в культурах соответствующих штаммов, опосредуемые гемагглютиниными, ослаблены. Причиной более низкой гемагглютинирующей активности клеток мутантов могли стать и изменения в строении или аранжировке на клеточной поверхности не только гемагглютининов, но и других биомолекул, не участвующих в реакции, но влияющих на активность агглютининов.

Содержание ЛПС биопленок мутантов Sp245.1610 и SK039 выше, чем у родительского штамма, что, вероятно, сказывалось на титре гемагглютинирующей активности их клеток. Обработанные трипсином клетки штамма Sp245^T утрачивали способность агглютинировать трипсинизированные эритроциты. Биопленки Sp245^T, Sp245.1610 и SK039, сформированные на стекле под LB, после обработки трипсином в концентрации 100 мкг/мл, как и в случае проназы, сохраняли лишь (78.6 ± 7.4)%, (71.0 ± 13.3)% и (76.0 ± 8.3)% биомассы. По-видимому, снижение биомассы пленок происходит вследствие разрушения протеазами поверхностных биополимеров, обуславливающих гемагглютинацию и участвующих в образовании межклеточных контактов.

Жирнокислотный профиль ЛПС штамма A. baldaniorum Sp245^T и его fabG1 и mmsB1 мутантов

Мутанты SK039 и Sp245.1610 сохранили способность к синтезу ПССК, а их ЛПС в иммунохимических реакциях взаимодействовали с поликлональными антителами на ЛПС штамма Sp245^T. Ферменты MmsB имеют широкую субстратную специфичность и могут катализировать обратимое окисление 3-гидроксиизобутирата, других 3-гидроксикислот, ряда аминокислот (Chowdhury *et al.*, 1996), а FabG ферменты катализируют восстановление 3-оксоацил-[АПБ] до 3-гидрокси-[АПБ] на первом этапе *de novo* синтеза жирных кислот (ЖК). Одним из основных компонентов бактериальных ЛПС, помимо углеводной части, представленной ОПС и олигосахаридом кора, является липид А. Для проверки предположения о возможном изменении ЖК состава ЛПС после инактивации генов *mmsB1* и *fabG1* провели анализ ЖК профилей липида А штамма Sp245^T и этих мутантов.

Таблица 2 – Результаты ИФА содержания ЛПС антигенов в биопленках штамма Sp245^T и его *fabG1* (Sp245.1610) и *mmsB1* (SK039) мутантов, сформированных на полистироле за 6 суток

Штамм	Результаты ИФА (A ₄₉₀) с анти-ЛПС антителами биопленок, образованных под жидкой средой	
	LB	MSM
Sp245 ^T	0.38±0.03	0.50±0.09
Sp245.1610	0.24±0.02	0.40±0.08
SK039	0.27±0.04	0.38±0.08

При культивировании в жидкой среде LB или MSM гидрофобность клеток Sp245 оставалась практически одинаковой, а различия в количестве биомассы биопленок Sp245^T и его мутантов были наиболее заметны при использовании MSM (рисунки 3 и 5). Поэтому для получения препаратов ЛПС с целью последующего химического анализа использовали бактерии, выращенные в MSM.

Анализ ЖК профилей ЛПС с помощью ГЖХ метиловых эфиров ЖК (МЭЖК) показал, что по сравнению с ЛПС штамма Sp245^T в ЛПС Sp245.1610 и SK039 снижалось содержание 3-ОН-С_{16:0} и С_{16:0}. Незначительное уменьшение содержания 3-ОН-С_{14:0} и увеличение значений для С_{16:1} наблюдали в ЛПС SK039. Содержание С_{18:1} и С_{19:0} в ЛПС обоих мутантов возросло.

Изменение соотношения ЖК в ЛПС могло послужить причиной описанных выше различий в физико-химических свойствах клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок азоспирилл (например, вследствие изменения в степени экспонирования биомолекул, важных для взаимодействия азоспирилл между собой и с инертными поверхностями).

Перенос pRK415-mmsB1 в A. baldaniorum SK039 увеличивает накопление биомассы в зрелых биопленках комплементарного мутанта

У SK039 вставка Omegon-Km из 3.8 т.п.н. располагается после 479-го п.н. CDS *mmsB1* (Ковтунов с соавт., 2013). В культурах SK039 примерно 20% бактерий продуцировали длинный или короткий Fla (Shelud'ko *et al.*, 2019b). Клетки мутанта оказались не способны к движению в жидких или в полужидких средах (Shelud'ko *et al.*, 2019b). По сравнению с Sp245^T у мутанта наблюдались изменения в физико-химических свойствах клеточной поверхности, также он накапливал меньше биомассы в зрелых биопленках. Чтобы подтвердить данные о биологической роли *mmsB1*, были проанализированы фенотипические последствия комплементации мутанта SK039 (Shelud'ko *et al.*, 2019b) CDS *mmsB1* штамма Sp245^T, клонированного в векторе экспрессии pRK415 (pRK415-*mmsB1*).

На границе раздела между жидкой MSM или LB и гидрофильными или гидрофобными поверхностями штамм Sp245^T накапливает больше биомассы в биопленках, чем мутант *mmsB1::Omegon-Km* SK039. У обоих штаммов первоначальное прикрепление и адгезия клеток к твердой поверхности происходит за 2-3 дня, а пики накопления биомассы приходятся на 5-6 день. Таким образом, стадия созревания биопленки у мутанта, по видимому, нарушена.

Для того чтобы показать, что снижение накопления биомассы SK039 в биопленке вызвано инактивацией вставки *mmsB1*, проанализировали соответствующий фенотип штамма SK039 (pRK415-*mmsB1*). Оказалось, что введение плазмиды pRK415 с CDS *mmsB1* штамма Sp245, оказало положительно влияло на накопление биомассы в биопленках, образованных комплементарным мутантом как на гидрофильной, так и на гидрофобной поверхностях. По сравнению со штаммом Sp245^T, в зависимости от условий роста, восстановление способности к формированию биопленки у SK039 (pRK415-*mmsB1*) было частичным (под MSM) или полным (под LB) (таблица 3).

Введение в клетки плазмиды pRK415-*mmsB1* приводило к значительному увеличению относительного числа бактерий с Fla у штамма SK039. Процент клеток SK039 (pRK415-*mmsB1*), обладающих Fla, приблизился к 46-53% от значений, характерных для Sp245^T. Соотношение клеток с Fla было практически одинаковым в популяциях *A. baldaniorum*, выращенных в жидкой LB или MSM. Скорость плавания подвижных клеток комплементарного мутанта в жидких и в полужидких агаризованных средах равна таковой у Sp245^T. Характер движения бактерий у SK039 (pRK415-*mmsB1*) и Sp245^T был сходным (Shelud'ko *et al.*, 2019b).

Критическим фактором, влияющим на формирование биопленки, является состояние питательной среды. Например, дефицит углерода может активировать производство матрикса биопленки (Zhang *et al.*, 2014), а состав питательных веществ может

способствовать переходу поверхностной биопленки в опускающуюся на дно форму (Paytubi *et al.*, 2017). Обнаружено, что бактерии *A. baldaniorum* Sp245^T накапливали больше биомассы в биопленках, образованных на границах раздела фаз между гидрофобной твердой поверхностью и бедной средой MSM, нежели в биопленках, сформированных на богатой среде LB.

Эти различия можно объяснить наличием у штамма Sp245^T положительного транскрипционного регулятора развития биопленки в условиях роста на бедной питательной среде.

Пока неясно, почему процесс накопления биомассы биопленки в комплементарном штамме SK039 (pRK415-*mmsB1*), выращенном на MSM, был восстановлен только частично.

Возможно, причиной этому послужило отсутствие родного

промотора и предполагаемых регуляторных последовательностей выше *mmsB1* в конструкции pRK415-*mmsB1*. Однако, когда азоспириллы выращивали на LB, в штамме SK039 (pRK415-*mmsB1*) наблюдали полное восстановление накопления биомассы биопленки. Таким образом, несмотря на более низкий (чем у штамма Sp245^T) процент клеток с полярным жгутиком в популяции комплементарного мутанта, его способность создавать и поддерживать биопленки не была подавлена. Интересен тот факт, что гетерогенность подвижности клеток в прикрепленных биопленках *E. coli*, вызванная спонтанными мутациями в опероне *flhDC*, способствовала поддержанию биомассы биопленки в течение длительного времени (Horne *et al.*, 2016). Помимо увеличения числа клеток с полярным жгутиком в популяциях комплементарного штамма SK039 (pRK415-*mmsB1*), восстановленные свойства поверхности его клеток также могут положительно повлиять на коллективную прикрепленную жизнь мутанта. Так клетки SK039 из 20 ч культуральных бульонных культур, выращенных на MSM или LB, имели более высокую относительную гидрофобность, чем клетки Sp245^T (рисунок 6). После введения pRK415-*mmsB1* относительная гидрофобность клеточной поверхности у комплементарного мутанта (но не у контрольного штамма SK039 (pRK415)) снижалась до уровня дикого типа независимо от используемой питательной среды (рисунок 6).

Таким образом, использование комплементарного мутанта (мутант с pRK415-*mmsB1*), удалось продемонстрировать, что именно мутация вставки в *mmsB1* провоцирует изменения на уровне популяции относительной гидрофобности клеточной поверхности SK039.

У граммотрицательных бактерий, в том числе азоспирилл, за закрепление ЛПС на наружной мембране, а также за поддержание основных свойств поверхности клетки отвечают ЖК липида А. Липидные носители используются для синтеза О-полисахаридных цепей ЛПС на цитоплазматической стороне внутренней мембраны (Sperandeo *et al.*, 2011). Различия между диким типом и мутантом признака (поддержание основных свойств

Таблица 3 – Формирование биопленок *A. baldaniorum* в стеклянных пробирках или в лунках полистирольных планшетов под жидкими средами после 6 дней культивирования при 28°C

Штаммы	Относительное количество биомассы в биопленках, образованных в жидкой среде:			
	MSM		LB	
	На поверхности:			
	Стекло	Полистирол	Стекло	Полистирол
Sp245 ^T	0.9±0.03 (a)	1.3±0.10 (a)	0.8±0.05 (a)	0.7±0.05 (a)
Sp245 (pRK415)	0.8±0.05 (a)	1.0±0.10 (b)	0.9±0.02 (a)	0.7±0.08 (a)
SK039	0.4±0.05 (b)	0.4±0.07 (z)	0.5±0.04 (b)	0.3±0.05 (b)
SK039 (pRK415)	0.4±0.03 (b)	0.4±0.04 (z)	0.5±0.02 (b)	0.4±0.04 (b)
SK039 (pRK415- <i>mmsB1</i>)	0.5±0.03 (b)	0.6±0.07 (e)	0.8±0.03 (a)	0.8±0.08 (a)

Биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым, связанный краситель экстрагировали этанолом и измеряли поглощение растворов при 590 нм (A_{590}). Данные были обработаны ANOVA. Разные буквы обозначают значимые различия между образцами ($p \leq 0.05$).

поверхности клетки), который может быть определен изменениями в составе мембранных ЖК (гидрофобность клеточной поверхности), исчезли после того, как SK039 был дополнен CDS *mmsB1*, перенесенным из штамма Sp245^T в плазмиде pRK415. Гипотетически, белок MmsB1 штамма Sp245^T может иметь различную локализацию в бактериальных клетках и может выполнять сложные биологические функции.

Таким образом, данное исследование показало, что CDS *mmsB1* важен для полярного жгутикования и поведения отдельных клеток и популяции штамма *A. baldaniorum* Sp245^T. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе плейотропного воздействия *mmsB1* на бактериальный фенотип, неясны.

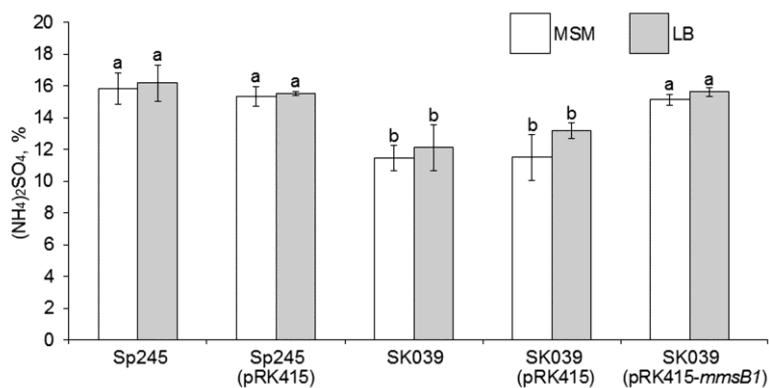


Рисунок 6 – Относительная гидрофобность клеток штаммов *A. baldaniorum* из 20-ч культур, выращенных в жидкой среде MSM или LB с соответствующими антибиотиками, определена с помощью метода высаливания. Данные были обработаны ANOVA. Разные буквы над столбцами обозначают значимые различия между образцами ($p \leq 0.05$).

Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *A. baldaniorum*

Для многих микроорганизмов основными компонентами формирующихся и функционирующих биопленок являются экзополисахариды (Vogino *et al.*, 2013). Компоненты матрикса, в том числе и гликополимеры, обеспечивающие прикрепление биопленок к поверхности и стабилизирующие структурную целостность зрелых биопленок азоспирилл, не охарактеризованы. Биопленки мутантов, лишенных жгутиков, являются удобной моделью для изучения роли прочих структур клеточной поверхности и экзополимеров в организации биопленочного матрикса.

Влияние периода на натрия на биопленки штамма *A. baldaniorum* Sp245^T и его *flhB1*(Sp245.1063), *fabG1*(Sp245.1610) и *mmsB1*(SK039) мутантов

После инкубации с периодатом натрия (окисляет полисахариды) биомасса зрелых биопленок Sp245^T, сформированных на стекле под LB, убывает примерно на 40% (рисунок 7). В случае лишенных жгутиков мутантов Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 эта величина составляет 60-75%. На стекле под MSM или на полистироле под LB/MSM устойчивость биопленок всех штаммов к периодатному окислению возрастает, а величина биомассы биопленок снижается примерно на 20% (рисунок 7).

Стоит отметить, что после инкубации с периодатом нарушается единство клеток, образующих пленку. Часть бактерий из биопленок становятся либо свободными, либо находятся в составе агрегатов. При окрашивании кристаллическим фиолетовым эти и более крупные фрагменты биопленок могут отслаиваться от поверхности даже при осторожном промывании водой. Биомасса в биопленках лишенных жгутиков Sp245.1063 и SK039 существенно уступает этому показателю Sp245^T (рисунок 7). Биопленки мутанта с аналогичным фенотипом Sp245.1610 и Sp245^T на гидрофильной поверхности существенно не отличаются. Тем не менее, в случае всех мутантов после инкубации с окислителем гликополимеров их пленки теряют на 20-35% больше биомассы, чем у штамма Sp245^T. Таким образом, углеводсодержащие составляющие биомассы являются частью многокомпонентной системы механизмов, опосредующих как средство биопленок к поверхностям с разными физико-химическими свойствами, так и их структурную целостность.

Оценка соотношения углеводсодержащих и белковых компонентов в матриксе, полученном из смывой с поверхности стекла биомассы био пленок, показала доминирование углеводных составляющих над белковыми в случае всех исследованных штаммов (рисунок 8). Анализировали легко смываемые компоненты, перешедшие в супернатант при центрифугировании биомассы после ее промывания ФБ (рН 7.0) (ФБ-«экстракты»), и более прочно связанные, которые экстрагировали ЭДТА (ЭДТА-«экстракты»). Отношение углеводы/белок меняется в зависимости от состава среды культивирования. В экстрактах био пленок из LB этот показатель (среднее значение для всех исследованных штаммов и способов экстракции) составляет 4.3 ± 0.6 , а в случае пленок из MSM снижается до 2.8 ± 0.7 .

Вполне вероятно, снижение показателя соотношения углеводы/белок в матриксе сказывается на повышении устойчивости к

периодатному окислению бактериальных пленок, сформированных под MSM. Белковые составляющие матрикса так же, как и углеводсодержащие компоненты, выполняют, в том числе, каркасную функцию. Так, после инкубации с проназой биомасса био пленок Sp245^T, Sp245.1063 или SK039, сформированных под LB на стекле, убывала примерно на 30%, а у Sp245.1610 – на 46% (рисунок 7). В случае пленок на полистироле уменьшение составило 65, 33, 28 и 69%, соответственно (рисунок 7). Проназа одинаково действовала на пленки, сформированные под MSM на стекле или полистироле (рисунок 7). У всех исследованных штаммов биомасса био пленок уменьшалась примерно на 20-30% под действием протеазы. Необходимо отметить, что биомасса био пленок снижалась также после обработки трипсином.

Исследование значения ЛПС для стабилизации биомассы био пленок

Легко смываемые компоненты (ФБ-«экстракты») и более прочно связанные составляющие (ЭДТА-«экстракты») матрикса (рисунок 8) био пленок Sp245^T и его мутантов Sp245.1063, Sp245.1610 или SK039 в иммунохимических реакциях (двойная иммунодиффузия и ИФА) взаимодействовали с поликлональными антителами, специфичными к мембранным ЛПС родительского штамма. Повторяющееся звено O-полисахарида ЛПС (ОПС) штамма Sp245^T является пента-D-рамнаном (Fedonenko *et al.*, 2002). Итогом окисления ЛПС

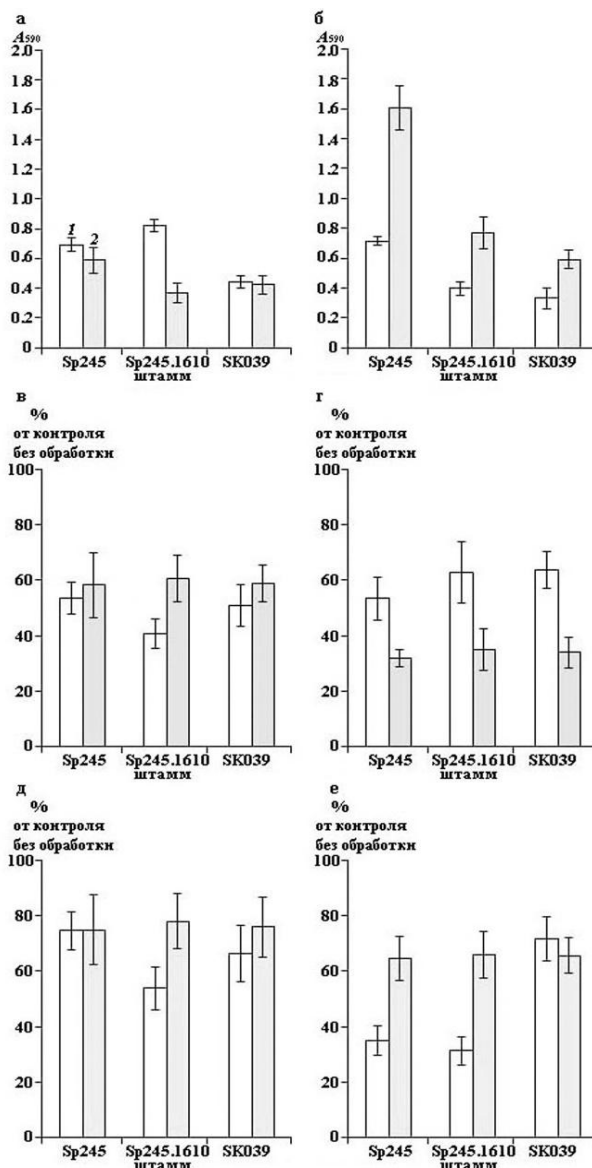


Рисунок 7 – Влияние периодата натрия и проназы на биомассу био пленок *A. baldaniorum*, сформированных на стекле (а, в, д) и полистироле (б, г, е) под жидкой LB (1) или MSM (2). Обозначения: (а, б) – A_{590} (оптическая плотность) кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания био пленок до обработки периодатом натрия и проназой; (в, г) – процентное отношение оптической плотности красителя, десорбированного с окрашенных пленок после их инкубации в растворе периодата натрия или проназы (д, е), к аналогичному показателю без обработки.

периодатом натрия будет модификация О-полисахарида штамма Sp245^T (периодат натрия окисляет полисахариды с образованием диальдегидполисахаридов). В модельном эксперименте после обработки периодатом препаратов ЛПС (5 мкг/мл) штаммов Sp245^T, Sp245.1610 и SK039 снижается уровень взаимодействия Ат с ЛПС (таблица 4).

Очевидно, окисление периодатом оказывает влияние на антигенные характеристики ЛПС. При увеличении количества окисляемого субстрата на порядок (50 мкг/мл) антигенные свойства ЛПС изменяются меньше (таблица 4). В биопленках возможная модификация периодатом натрия гликополимеров, в том числе ОПС, снижает уровень взаимодействия Ат с ними у Sp245^T и Sp245.1610 на 30%, а у Sp245.1063 и SK039 на 20% (таблица 4).

Устойчивость части липополисахаридного антигена к окислению, вероятно, обусловлена высоким содержанием гликополимеров в матрице (рисунок 8), его высоким содержанием в биомассе, особенно в случае «тонких», по сравнению с показателями родительского штамма, пленках мутантов (рисунок 7). Так, отношение показателя, характеризующего содержание ЛПС антигенов в биопленках, сформированных под LB (таблица 4), к показателю, характеризующему их биомассу (рисунок 7), в случае штаммов Sp245^T, Sp245.1063, Sp245.1610 или SK039 составило соответственно 0,5, 0,9, 0,8 или 1,0. Толщина пленок, вероятно, также может влиять на доступность ЛПС для окисления периодатом (таблица 4; рисунок 7).

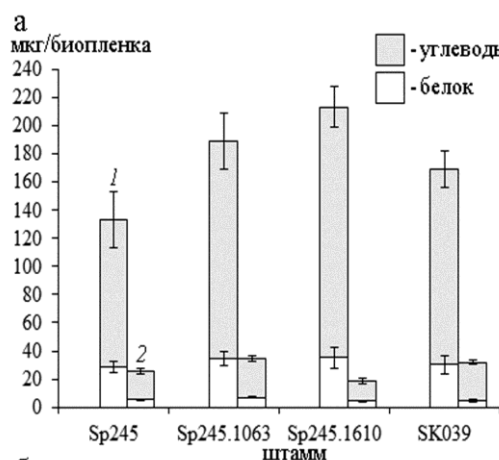


Рисунок 8 – Содержание углеводов и белка в матрице зрелых биопленок *A. baldaniorum*, сформированных на стекле под LB (а) и MSM (б). Обозначения: 1 – ФБ-«экстракты» (легко смываемые компоненты, переходящие в супернатант при центрифугировании биомассы после ее промывания ФБ при pH 7,0); 2 – ЭДТА-«экстракты» (более прочно связанные составляющие); серые столбцы – углеводы; белые столбцы – белок.

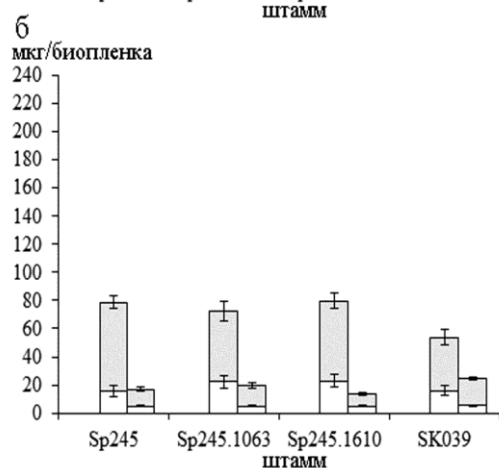


Таблица 4 – Выявление иммуноферментным анализом (ИФА) липополисахаридных (ЛПС) антигенов (3) с различным содержанием углеводов (1) в биопленках *A. baldaniorum* (2 и 4), сформированных на полистироле за 6 сут под жидкой средой LB, после периодатного окисления (3 и 4).

Штамм	(1) Содержание углеводов в препарате ЛПС, весовые %	(2) Результаты ИФА (A_{590}) анти-ЛПС антител с биопленками	Отношение результатов взаимодействия в ИФА анти-ЛПС антител с антигеном после инкубации с периодатом натрия к аналогичному показателю в контроле (2), %		
			(3) препарат ЛПС, мкг/мл*		(4) биоупленки
Sp245 ^T	65.8±2.1	0.38±0.03	84.3±3.7	49.8±8.0	64.1±7.4
Sp245.1063	н.о.	0.24±0.02	н.о.	н.о.	76.8±5.3
Sp245.1610	75.9±5.5	0.24±0.02	86.4±7.2	77.4±5.7	67.5±7.7
SK039	44.1±2.5	0.27±0.04	84.1±7.0	34.3±6.2	87.1±7.7

* – концентрация растворенного препарата внесенного в лунки планшета для ИФА.

Очевидно, в «толстых» биопленках ($Sp245^T$) или пленках с высоким содержанием ЛПС и/или других гликополимеров после периодатного окисления остается значительная доля липополисахарида, сохраняющего антигенные свойства. Тем не менее, даже в этом случае последствиями инкубации с окислителем является снижение биомассы биопленок, наиболее заметное на гидрофильной поверхности (рисунок 7).

Исследование значения структур, связывающих калькофлуор и/или конго красный, для стабилизации биомассы биопленок

Биомасса нативных биопленок всех исследованных штаммов связывает флуоресцирующий краситель калькофлуор и взаимодействует с конго красным. Окрашивание этими анионными красителями позволяет обнаружить β -глюканы, присутствующие в составе сложного комплекса бактериальных полисахаридов (Skvortsov, Ignatov, 1998; Wood, 1980).

Максимум флуоресценции люминофора, накопленного биомассой, смытой с поверхности стекла ФБ рН 7.0, всех исследованных штаммов смещен в сторону более длинных волн по сравнению с аналогичным показателем его раствора в сходном буфере (для всех штаммов сдвиг был примерно одинаковым и составил 8.0 ± 1.0 нм). Похожее смещение максимума интенсивности флуоресценции типично для растворов комплексов калькофлуора с полимерами полисахаридной природы (Wood, 1980; Plasek, Hoskova, 2010). Флуоресценция окрашенных калькофлуором биопленок после инкубации с окислителем гликополимеров периодатом натрия (нарушается единство клеток, образующих пленку, и снижается количество ее биомассы), менее интенсивна в сравнении с необработанными пленками. Очевидно, модифицированные после окисления периодатом компоненты биомассы связывают меньше красителя. Обработка проназой не влияет на связывание красителя с биопленками (флуоресценция окрашенных пленок сохраняется).

Спектроскопия смытой с поверхности стекла биомассы биопленок из среды с калькофлуором или конго красным показала сходные изменения спектра поглощения каждой из красок, накопленной в биопленках $Sp245^T$, $Sp245.1063$, $Sp245.1610$ и $SK039$. Красители, связанные с биомассой штамма $Sp245^T$, поглощали с максимумами при (362.0 ± 3.0) или (515.0 ± 2.0) нм, соответственно, тогда как эти величины для их растворов в фосфатном буфере составляли 349.0 или 495.0 нм (характерные максимумы поглощения красителей при рН 7.0 (Wood, 1980; Plasek, Hoskova, 2010)). Смещение спектров флуоресценции калькофлуора и максимумов поглощения этого красителя (≥ 10 нм) или конго красного (≥ 20 нм) свидетельствует о возможном образовании красителями комплекса с β -глюканами (Wood, 1980). Красители сохраняются в составе биомассы биопленок после промывания и удаления легкосмываемых компонентов матрикса.

Необходимо отметить, что конго красный взаимодействует, помимо глюканов, с белковыми структурами – амилоидами (Fowler *et al.*, 2007). Амилоидные структуры, присутствующие в биопленках грамотрицательных бактерий, опосредуют прикрепление микроорганизмов к множеству субстратов, включая поверхность корней растений (Fowler *et al.*, 2007; Плакунов с соавт., 2017; Jeter, Matthyse, 2005). Определенный вклад в изменение спектра поглощения конго красного, накопленного азоспириллами в биопленках, помимо полисахаридов, могут вносить подобные структуры. Биопленки азоспирилл, окрашенные красителем (краситель прокрашивает всю биомассу), исследованы с помощью поляризованной световой микроскопии. При скрещенных поляризаторах в них обнаруживаются яркие пятна желтого/зеленого двулучепреломления, характерные для комплекса красителя с амилоидными структурами (Nilsson, 2004). Не вся окрашенная конго красным биомасса биопленок азоспирилл демонстрирует подобный эффект. Локализация желтого/зеленого двулучепреломления соответствует окрашенным конго бактериальным агрегатам. В неокрашенных биопленках или в растворе красителя такое двулучепреломление при микроскопии отсутствует.

Анализ микроструктуры биопленок азоспирилл

С помощью просвечивающей электронной микроскопии исследовали биопленки родительского штамма, которые по сравнению с пленками мутантов более устойчивы к таким воздействиям, как гидродинамический сдвиг, что существенно упрощает подготовку препаратов для микроскопии. Напыление тонкого слоя золота на высушенные препараты биопленок позволило повысить контраст матрикса, в который погружены клетки (рисунок 9а). Для анализа распределения в матриксе внеклеточных гликанов использовали в качестве зонда конъюгат коллоидного золота с АЗП (АЗП-К315), специфичный к *N*-ацетил-D-глюкозамину (Lotan, Sharon, 1973; Kamnev, 2013). Возможность использования АЗП в качестве эффективного зонда для выявления внеклеточных полисахаридов азоспирилл обусловлена отсутствием взаимодействия данного лектина с отмытыми от экзополисахаридов и капсулы клетками азоспирилл (Skvortsov, Ignatov, 1998).

Электронная микроскопия биопленок, меченных АЗП-К315, показала, что зонд распределяется по всей поверхности препарата, образуя неоформленные скопления и/или короткие полосы (рисунок 9). Частицы АЗП-К315 также взаимодействуют с «мостиками» матрикса, соединяющими клетки (рисунок 9б).

Стоит отметить, что АЗП-К315 метит не все подобные структуры (рис. 9б, в). В контрольных образцах с заблокированным хитотриозой активным центром АЗП частицы К315 не связываются с биопленками, как и с поверхностью планктонных клеток (рисунок 9г, е). Полученные результаты электронной микроскопии свидетельствуют о присутствии в составе

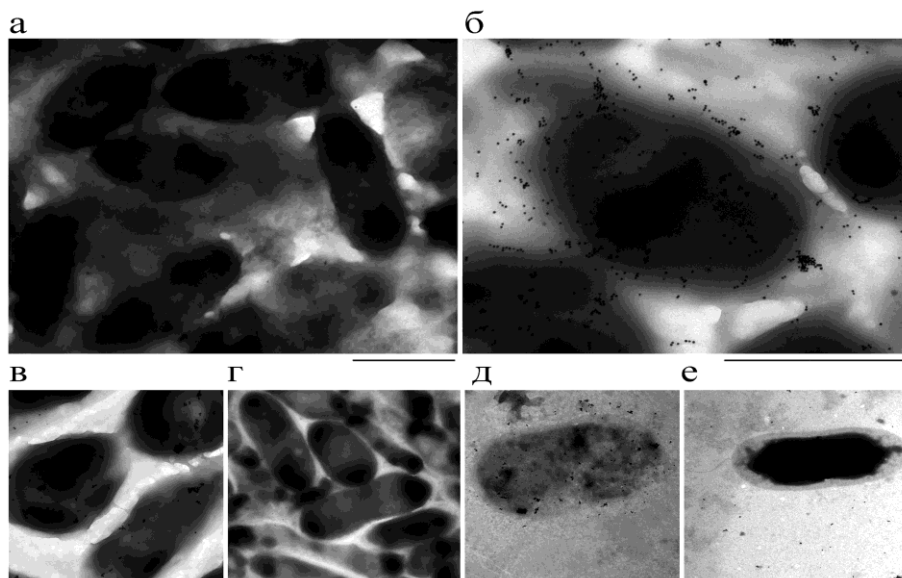


Рисунок 9 – Просвечивающая электронная микроскопия фрагментов биопленок Sp245^T 5 (а-г) и клеток из планктонных 18-ч культур (д, е) после инкубации с АЗП-К315 (б, в, д), АЗП-К315 + хитотриоза (г, е) или напыления золота (а). Бактерии и биопленки культивировали в жидкой ЛВ. АЗП-К315 – конъюгат коллоидного золота (размер частиц 15 нм) с агглютинином зародышей пшеницы (АЗП). Масштаб 1 мкм.

матрикса зрелых биопленок компонентов, имеющих в составе углеводный гаптен, обладающий сродством к АЗП. Сродство к данному лектину проявляют содержащие глюкозамин липополисахарид-белковый (ЛПБК) и полисахарид-липидный (ПСЛК) комплексы капсулы, экзополисахариды азоспирилл из жидких планктонных культур (Skvortsov, Ignatov, 1998). Перечисленные комплексы капсульных гликополимеров клеток Sp245^T и ЛПС их внешней мембраны содержат идентичные антигенные детерминанты (Матора, Щеголев, 2002). После сравнения матрикса зрелых биопленок и мембранных липополисахаридов этого штамма (в случае мутантов Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 получены аналогичные данные) нами выявлен общий антиген.

Таким образом, результаты электронной микроскопии и иммунохимических исследований согласуются и свидетельствуют о наличии компонентов сложных комплексов гликополимеров капсулы в составе матрикса зрелых биопленок.

Присутствие в составе матрикса углеводного гаптена, обладающего специфическим сродством к АЗП, может указывать на то, что лектин-углеводные взаимодействия являются неотъемлемой частью механизмов, опосредующих фиксацию зрелых бактериальных пленок

на поверхности корня пшеницы. Это может играть важную роль при колонизации азоспириллами корневой системы растений (Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями, 2005).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе выполнено исследование микроструктуры биопленок и процесса их формирования культурами штамма *A. baldaniorum* Sp245^T. В качестве объекта изучения помимо штамма Sp245^T использованы его производные с нарушениями в образовании и функционировании жгутиков. Сравнительный анализ образования пленок штаммом Sp245^T и его мутантами позволил получить первичную информацию о характерных для этих бактерий и универсальных механизмах, обеспечивающих формирование сложной архитектуры биопленочных сообществ. На примере дикого и мутантного штаммов (Sp245^T и Sp245.1063 (*flhB1*::Omegon-Km (Fla⁻ Laf⁻))) проанализирован процесс формирования бактериальной биопленки и продемонстрированы все его этапы: адсорбция, адгезия, прирост и стабилизация биомассы. Важным наблюдением за динамикой образования биопленок культурами штамма Sp245^T и его *flhB1* мутанта является выявленная закономерность – плотность популяции бактерий, закрепившихся на субстрате, в значительной степени определяет начало этапа прироста биомассы пленок, вне зависимости от скорости роста планктонных культур. Оказалось, что клетки штамма Sp245^T, использующие полярный жгутик для движения и адгезии, продолжают синтезировать эту флагеллу, оказавшись интегрированными в состав зрелой пленки. Полученные данные доказывающие, что присутствие полярного жгутика на клетках из биопленок Sp245^T необходимо для эффективного накопления биомассы пленки на границах раздела между твердыми и жидкими средами и для стабилизации биопленок на этих границах в условиях гидродинамического сдвига. Эти результаты представляют фундаментальный интерес, поскольку они расширяют существующие представления о роли жгутикования (в основном это органелла, обеспечивающая подвижность) в прикрепленной жизни бактерий. В данной работе показано, что инактивация предполагаемых генов липидного метаболизма *fabG1* и *mmsB1* у бактерий *A. baldaniorum* Sp245^T помимо дефектов в жгутиковании и подвижности клеток, приводит к изменению соотношения ряда жирных кислот в ЛПС, а также относительной гидрофобности, гемагглютинирующей активности, динамики агрегации клеток и эффективности формирования биопленок на абиотических поверхностях у соответствующих мутантов. В работе исследованы структура и функции биополимеров матрикса биопленок Sp245^T, образующихся на границе раздела фаз жидкая среда – твердая поверхность. Для анализа использованы также биопленки мутантов, лишенных жгутиков, которые являются удобной моделью для изучения вклада других структур клеточной поверхности и экзополимеров в процесс формирования и организации матрикса биопленок. Оказалось, что полисахариды, связывающие калькофлуор, и комплексы, содержащие ЛПС и белковые структуры, фиксируют зрелые биопленки на твердой поверхности и выполняют функцию каркаса. У всех исследованных в работе штаммов углеводсодержащие компоненты опосредуют прикрепление биопленок преимущественно к поверхностям с гидрофильными свойствами. Белковые компоненты биомассы, чувствительные к действию протеаз, обеспечивают прочное соединение азоспирилл в биопленках и способствуют их фиксации на гидрофобной поверхности. В составе матрикса зрелых биопленок присутствует углеводный гаптен, обладающий специфическим сродством к АЗП. При реализации поставленных в работе задач открылись новые перспективы для дальнейших исследований. Так, впервые полученные первичные косвенные данные о присутствии в биомассе биопленок азоспирилл структур амилоидной природы дают возможность для развития исследований, направленных на выяснение универсальных механизмов, обеспечивающих формирование сложной архитектуры биопленочных сообществ. Амилоиды широко распространены среди микробов и участвуют в самых различных процессах, в частности, необходимы для образования биопленок (Плакунов с соавт., 2017).

ВЫВОДЫ

1. Адсорбция и адгезия клеток, прирост и стабилизация биомассы являются основными этапами образования биопленок бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T на интерфейсе жидкость – твердая поверхность. Начало этапа прироста биомассы биопленок азоспирилл определяется плотностью популяции бактерий, закрепившихся на субстрате, и не зависит от скорости прироста клеток планктонных культур.

2. Полярный жгутик необходим *A. baldaniorum* Sp245^T для накопления биомассы биопленок и их стабилизации. Биопленки лишённого жгутиков мутанта Sp245^T с инактивированной хромосомной копией гена белка FlhB1 жгутиковой системы секреции III типа, содержащие меньшее количество биомассы, более чувствительны к действию сил гидродинамического сдвига.

3. Инактивация у бактерии *A. baldaniorum* Sp245^T предполагаемых генов липидного метаболизма *fabG1* и *mmsB1*, кроме дефектов в жгутиковании и подвижности клеток, вызывает изменение соотношения жирных кислот в составе липополисахаридов, степени гидрофобности, способности клеток к гемагглютинации и агрегации, уменьшению количества биомассы биопленок. Введение векторной плазмиды с CDS *mmsB1* в клетки соответствующего мутанта, оказывает значительное положительное влияние на накопление им биомассы в биопленках.

4. Углеводсодержащие компоненты, доминирующие над белковыми составляющими матрикса, опосредуют прикрепление биопленок преимущественно к поверхностям с гидрофильными свойствами. Белковые компоненты биомассы, чувствительные к действию протеаз, обеспечивают прочное соединение бактерий в биопленках и способствуют их фиксации на гидрофобной поверхности.

5. Полисахариды, связывающие калькофлуор, и комплексы, содержащие липополисахариды и белковые структуры, фиксируют зрелые биопленки на твердой поверхности и выполняют каркасную функцию. В составе матрикса зрелых биопленок присутствует гаптен, обладающий специфическим сродством к агглютиниону зародышей пшеницы. Получены косвенные данные о наличии в биомассе биопленок азоспирилл структур амилоидной природы.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная работа может послужить основой для продолжения изучения способов адаптации бактерий к обитанию в динамичной почвенной среде, в том числе, в фитосфере. Полученные результаты могут найти дальнейшее практическое применение при подборе и конструировании микроорганизмов, перспективных для использования при разработке аграрных биотехнологий, методов мониторинга окружающей среды (создание биосенсоров) и фиторемедиации загрязненных почв.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science, Scopus и РИНЦ

1. Евстигнеева С.С., Телешева Е.М., Мокеев Д.И., Борисов И.В., Петрова Л.П., Шелудько А.В. Реакция бактерий на механические воздействия // Микробиол. – 2021. – Т. 90, № 5. – С. 531–542. IF=1.268. doi: 10.31857/S0026365621050050. (Scopus).

2. Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Telesheva E.M., Yevstigneeva S.S., Petrova L.P., Katsy E.I. Polar flagellum of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 plays a role in biofilm biomass accumulation and in biofilm maintenance under stationary and dynamic conditions // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – Vol. 35, № 2. – P. 19. IF= 3.312. doi: 10.1007/s11274-019-2594-0. (WoS/Scopus).

3. Shelud'ko A.V., Filip'echeva Y.A., Telesheva E.M., Yevstigneeva S.S., Petrova L.P., Katsy E.I. Restoration of polar-flagellum motility and biofilm-forming capacity in the *mmsB1* mutant of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 points to a new role for a

homologue of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase // *Can. J. Microbiol.* – 2019. – Vol. 65, № 2. – P. 144–154. IF=2.419. doi: 10.1139/cjm-2018-0481. (WoS/Scopus).

4. Шелудько А.В., Филиппчева Ю.А., **Телешева Е.М.**, Буров А.М., Евстигнеева С.С., Бурьгин Г.Л., Петрова Л.П. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 // *Микробиол.* – 2018. – Т. 87, № 5. – С. 483–494. IF=1.268. doi: 10.1134/S0026365618050166. (Scopus).

5. Filip'echeva Y.A., Shelud'ko A.V., Prilipov A.G., Burygin G.L., **Telesheva E.M.**, Yevstigneyeva S.S., Chernyshova M.P., Petrova L.P., Katsy E.I. Plasmid AZOBR_p1-borne *fabG* gene for putative 3-охоacyl-[acyl-carrier protein] reductase is essential for proper assembly and work of the dual flagellar system in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 // *Can. J. Microbiol.* – 2018. – Vol. 64, № 2. – P. 107–118. IF=2.419. doi: 10.1139/cjm-2017-0561. (WoS/Scopus).

6. Filip'echeva Yu., Shelud'ko A., Prilipov A., **Telesheva E.**, Mokeev D., Burov A., Petrova L., Katsy E. Chromosomal *flhB1* gene of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 is essential for correct assembly of both constitutive polar flagellum and inducible lateral flagella // *Folia Microbiol.* – 2018. – Vol. 63, № 2. – P. 147–153. IF=2.099. doi: 10.1007/s12223-017-0543-6. (WoS/Scopus).

7. Филиппчева Ю.А., **Телешева Е.М.**, Евстигнеева С.С., Шелудько А.В., Пономарева Е.Г., Петрова Л.П., Кацы Е.И. О вкладе агрегации клеток и экстраклеточной ДНК в формирование и стабилизацию биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* – 2018. – Т. 18, вып. 4. – С. 399–406. doi: 10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406.

8. **Телешева Е.М.**, Синякин Д.Н., Шелудько А.В., Филиппчева Ю.А., Пономарева Е.Г., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Анализ влияния протеаз на структуру биопленок штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и его дефектных по жгутикованию *mmsB1* и *fabG1* мутантов // *Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология.* – 2017. – Т. 17, вып. 3. – С. 322–327. doi: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-322-327.

9. **Шумилова Е.М. (Телешева Е.М.)**, Шелудько А.В., Филиппчева Ю.А., Евстигнеева С.С., Пономарева Е.Г., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1* // *Микробиол.* – 2016. – Т. 85, № 2. – С. 162–170. IF=1.268. doi: 10.1134/S002626171602017X. (Scopus).

10. Шелудько А.В., Филиппчева Ю.А., **Шумилова Е.М. (Телешева Е.М.)**, Хлебцов Б.Н., Буров А.М., Петрова Л.П., Кацы Е.И. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // *Микробиол.* – 2015. – Т. 84, № 2. – С. 175–183. IF=1.268. doi: 10.7868/S0026365615010127. (Scopus).

Другие публикации

11. Методы изучения формирования биопленок почвенными бактериями, стимулирующими рост растений / Сост.: Мокеев Д.И., Евстигнеева С.С., **Телешева Е.М.**, Дятлова Ю.А., Шелудько А.В., Широков А.А., Матора А.Ю., Тугарова А.В., Камнев А.А., Филиппчева Ю.А., Петрова Л.П.; под ред. Ю.П. Федоненко: учеб.–метод. пособие для студентов и аспирантов хим. и биол. профиля. – Саратов, 2021. – 40 с.