

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ
И МИКРООРГАНИЗМОВ – ОБОСОБЛЕННОЕ СТРУКТУРНОЕ
ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА «САРАТОВСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Телешева Елизавета Михайловна

«Анализ формирования и микроструктуры биопленок
Azospirillum baldaniorum»

1.5.11 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
доктор биологических наук А.В. Шелудько

Саратов – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Общая характеристика бактерий рода <i>Azospirillum</i>	16
1.2 Характеристика процессов, происходящих при наличии достаточной плотности популяции микроорганизмов	23
1.3 Биопленки – структурированные микробные сообщества	26
1.3.1 Формирование биопленок – способ адаптации микроорганизмов к изменению условий окружающей среды, в том числе, обитанию в различных экологических нишах	26
1.3.2 Основные этапы формирования биопленок	28
1.3.3. Матрикс биопленок	30
1.4 Формирование биопленок бактериями рода <i>Azospirillum</i>	34
1.4.1 Подвижность и хемотаксис	35
1.4.2 Прикрепление бактерий	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1 Бактериальные штаммы, использованные в работе	45
2.2 Состав питательных сред и условия культивирования бактерий	47
2.3 Определение скорости роста бактерий в условиях аэрации	48
2.4 Определение относительной гидрофобности бактерий	48
2.5 Выделение ЛПС и характеристика их жирнокислотного состава	49
2.6 Изучение подвижности бактерий	49
2.7 Оценка накопления биомассы в биопленках и роста планктонных культур в статичных условиях	50
2.8 Определение степени агрегации клеток планктонных культур в среде, окружающей биопленки	52
2.9 Определение гемагглютинирующей активности бактерий в биопленках	52

2.10 Иммунохимические реакции: ИФА и двойная иммунодиффузия.....	53
2.11 Обработка биопленок периодатом натрия и протеазами	54
2.12 Анализ углеводсодержащих и белковых компонентов, содержащихся в матриксе биопленок.....	55
2.13 Абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия	55
2.14 Изучение клеток азоспирилл и биопленок с помощью методов микроскопии.....	56
2.14.1 Фазово-контрастная микроскопия биопленок	56
2.14.2 Атомно-силовая микроскопия биопленок.....	56
2.14.3 Просвечивающая электронная микроскопия бактерий из жидких культур, фрагментов биопленок и суспензий их биомассы	57
2.14.4 Маркировка азоспирилл агглютинином зародышей пшеницы, конъюгированным с коллоидным золотом	58
2.15 Статистическая обработка результатов.....	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	60
3.1 Характеристика основных этапов формирования биопленок азоспириллами.....	60
3.1.1 Исследование динамики формирования биопленок штаммом <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T и его <i>flhB1</i> мутантом	61
3.1.2 Характеристика <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T и мутанта Sp245.1063 с применением фазово-контрастной микроскопии	64
3.1.3 Просвечивающая электронная и сканирующая атомно-силовая микроскопия биопленок <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T и Sp245.1063.....	66
3.2 Характеристика роли полярного жгутика в биопленках <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T	70
3.2.1 Наличие полярного жгутика положительно влияет на накоплении биомассы в зрелых биопленках азоспирилл	71
3.2.2 Восстановление синтеза полярного жгутика положительно влияет на формирование биопленок <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T , находящихся в условиях гидродинамического сдвига.....	75

3.3	Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерий <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T по предполагаемым генам липидного метаболизма <i>mmsB1</i> и <i>fabG1</i>	76
3.3.1	Характеристика биопленок штамма <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T и его мутантов Sp245.1610 (<i>fabG1</i>) и SK039 (<i>mmsB1</i>).....	77
3.3.2	Исследование биопленок штамма <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T и его мутантов Sp245.1610 (<i>fabG1</i>) и SK039 (<i>mmsB1</i>) с помощью иммуноферментного анализа.....	84
3.3.3	Анализ гемагглютинирующей активности клеток <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T и мутантов этого штамма Sp245.1610 и SK039.....	84
3.3.4	Характеристика жирнокислотного состава липополисахаридов <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T и его <i>mmsB1</i> и <i>fabG1</i> мутантов.....	86
3.3.5	Перенос pRK415- <i>mmsB1</i> в <i>A. baldaniorum</i> SK039 увеличивает накопление биомассы в зрелых биопленках комплементарного мутанта.....	88
3.4	Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок <i>A. baldaniorum</i> Sp245 ^T	93
3.4.1	Влияние на характеристики зрелых биопленок азоспирилл периодата натрия, окисляющего полисахариды, и протеаз.....	94
3.4.2	Характеристика роли липополисахаридов в стабилизации биопленок азоспирилл.....	98
3.4.3	Анализ участия структур и биополимеров, связывающих красители калькофлуор и/или конго красный, в стабилизации биопленок азоспирилл.....	100
3.4.4	Исследование микроструктуры биопленок азоспирилл.....	104
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	108
	ВЫВОДЫ.....	117
	РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	119
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	120

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	122
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	170

ВВЕДЕНИЕ

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 [154, 155, 116, 170]. Эти бактерии фиксируют азот, продуцируют фитогормоны, нейтрализуют токсические соединения, способны улучшать поступление минеральных веществ в растения и подавлять развитие фитопатогенов [363, 299, 380, 181, 136].

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) [373, 196, 163]. Полярная флагелла обеспечивает контакт и прикрепление азоспирилл к корням растений, с которыми они создают взаимовыгодные ассоциации [141]. Часто, зафиксировавшись на поверхности, микробы способны строить биопленки – бактерии, внедренные в слизистый матрикс [174, 132, 325]. 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 [174, 132, 325]. 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» [259, 132]. 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 [63].

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) [189, 169, 312, 159]. Внимание исследователей привлекает возможная взаимосвязь между метаболизмом азота или его неорганических соединений и образованием азоспириллами биопленок [391].

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 флагаеллы, липополисахаридов (ЛПС) и полисахаридов, связывающих калькофлуор (ПССК), заметно влияли на эффективность формирования биопленок соответствующими мутантами штамма *A. baldaniorum* Sp245^T (ранее *A. brasilense*; [158]) на абиотических поверхностях [79]. Инактивация у Sp245^T генов, предположительно кодирующих гипотетические *tad*-пили, приводила к подавлению образования пленок соответствующим мутантом этого штамма [396]. Информация о микроструктуре биопленок азоспирилл; морфологии клеток, интегрированных в биопленку; основных компонентах матрикса, стабилизирующих ее структуру, фрагментарна [81, 396, 324, 391, 385, 84] 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*; [158]), обладающий всеми характеристиками, необходимыми для образования ассоциаций с растениями, и являющийся факультативным эндофитом [102, 97]. 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 [174, 259, 132].

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 агглютинирующим 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 [102, 158], 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⁻)*) [346, 40, 171, 172, 352, 353]. В работе применяли традиционные и современные микробиологические и биохимические методы. Количество биомассы биопленок оценивали способом, описанным O'Toole, Kolter [309]. 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 Шелудько с соавт. [79]. 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 *Azospirillum 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 лишеного 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 агглютинирующим 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 и 7-й Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Экологические проблемы промышленных городов» (Саратов, 2013; 2015); 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).

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 глубокую, 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.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика бактерий рода *Azospirillum*

В природе популяции микроорганизмов обычно взаимодействуют не только друг с другом, но и с макроорганизмами. Более крупные организмы представляют собой новую экологическую нишу для микробов, которую бактерии стремятся занять. Взаимодействие высших растений и микроорганизмов можно классифицировать как классический симбиоз, ассоциативность и патогенез [69, 152, 322]. Автором термина «симбиоз» является Антуан Де Бари (1879 г.): это совместное сосуществование разных организмов [55]. В основе возникновения симбиозов лежат трофические, пространственные, защитные и другие типы взаимоотношений. Так, бактерии играют ключевую роль в обеспечении макроорганизма азотом или другими минеральными веществами, а растения, в свою очередь, тоже являются источником питания для микроорганизмов и осуществляют их физическую защиту. Широко известным примером микробно-растительного симбиоза является совместное развитие бактерий рода *Rhizobium* и представителей семейства бобовых с образованием специализированных структур – клубеньков [69, 55, 322].

Еще одним типом взаимовыгодного сосуществования бактерий с растениями является ассоциативный симбиоз. Известно, что некоторые микроорганизмы способны стимулировать рост растений. Они относятся к группе бактерий Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) или Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) [55]. Данные бактерии непосредственно или косвенно оказывают благотворное влияние на растения за счет продуцирования физиологически активных веществ, таких как ауксины, гиббереллины, цитокины; перевода в усваиваемую растениями форму нерастворимых фосфатов и окислов железа; нивелирования токсичного действия некоторых

веществ, в частности, этилена; подавления патогенной микрофлоры [363, 299, 27, 380].

К группе RGPB относятся штаммы бактерий, принадлежащие родам *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Gluconoacetobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingobacterium*, *Achromobacter*, *Ralstonia* и, в том числе, *Azospirillum* [202, 362, 363, 274].

Еще в 1922 году голландским микробиологом М. Бейеринком впервые были выделены спириллы, рост которых на питательной среде без содержания азота сопровождался его накоплением. Ученый отнес данный микроорганизм к роду *Spirillum* и назвал его сначала *Azotobacter spirillum*, а затем переименовал в *Spirillum lipoferum* [119]. Группу штаммов *S. lipoferum* стали исследовать далее, – так был классифицирован новый род – *Azospirillum*, изученные штаммы названы *A. lipoferum* и *A. brasilense* [373]. До сих пор два этих штамма остаются самыми изученными.

Интерес к данным бактериям-азотфиксаторам возрос после того, как стало известно об их способности вступать во взаимовыгодные отношения с небобовыми растениями. В 70-е годы XX века ученые из Бразилии под руководством Дж. Доберейнер предложили рассматривать тандем «злаки – азотфиксирующие бактерии рода *Azospirillum*» в качестве модельного объекта для изучения растительно-бактериальной ассоциации [154, 155].

На сегодняшний день известно, что род *Azospirillum* относится к классу *Alphaproteobacteria* [211]. Это свободноживущие бактерии, существующие в разнообразных экологических нишах. Они населяют и пресноводные водоемы, и почву [3, 73, 112, 368, 242, 191]. В течение долгого времени специфичным для азоспирилл местом обитания считали почвы тропического и субтропического поясов [153, 379, 303, 213, 53]. Однако в 1978 году они были обнаружены также в зоне умеренного [387, 31, 388, 7, 46, 70, 47, 53] и даже субарктического климата [194, 195, 256]. Азоспириллы первоначально выделили из корневой системы тропических злаков. Позже их обнаружили на корнях других

представителей семейства Злаковые или Мятликовые (*Gramineae* или *Poaceae*), в частности, пшеницы (*Triticum aestivum*) [154, 155, 53]. Данные бактерии также создают ассоциации, например, с ячменем, кукурузой, рисом, хлопком, горохом [287, 307, 233, 162].

Систематика рода *Azospirillum* постоянно пополняется. К настоящему моменту описано 27 видов азоспирилл, причем, если с момента открытия *A. brasilense* и *A. lipoferum* [373] и до конца XX века было обнаружено еще всего лишь 4 вида: *A. amazonense* [271], *A. halopraeferens* [328], *A. irakense* [233] и *A. largimobile* [149], то в XXI веке совершенно намного больше открытий. Современная систематика пополнилась такими видами, как: *A. doebereinae* [160], *A. oryzae* [403], *A. melinis* [319], *A. canadense* и *A. zae* [283, 284], *A. rugosum* [407], *A. picis* [250], *A. palatum* [412], *A. thiophilum* [242], *A. formosense* [251], *A. fermentarium* [252], *A. humicireducens* [411], *A. himalayense* [378], *A. soli* [253], *A. agricola* [254], *A. palustre* [376], *A. ramasamyi* [94] и *A. griseum* [405], *A. thermophilum* [410], *A. oleiclasticum* [400], *A. baldaniorum* sp. nov. [158].

Выделяют эпифитные и эндофитные бактерии, локализующиеся или на поверхности, или внутри корня растений [368]. Азоспириллы обнаружены на всех частях корневой системы, но большая часть клеток встречается на поверхности корней, в слое муцигеля, а также в межклеточном пространстве эпидермиса, кортекса и стелы [316, 317, 304, 109, 287]. В конце XX века при помощи конфокальной лазерной микроскопии было обнаружено, что штамм *A. baldaniorum* Sp245^T находится в межклетниках корня и внутри корневых волосков пшеницы, то есть относится к эндофитам [97]. Бактерии рода *Azospirillum* колонизируют зону удлинения, зону корневых волосков [304, 109] и верхушки корней [110], ведь здесь происходит выделение аттрактантов, обеспечивающих питание и жизнедеятельность азоспирилл [111]. Именно колонизация корней является самым важным процессом, обеспечивающим успешное взаимодействие растений с азоспириллами [308]. Нужно отметить, что данные бактерии являются факультативными эндофитами и могут существовать в почве самостоятельно, без растения-хозяина [102, 155].

Азоспириллы – грамотрицательные или грамвариабельные бактерии, с клетками округлой, вибриоидной или палочковидной формы (в среднем 1 мкм в диаметре и длиной 2-4 мкм) [373, 238, 368].

Важным преимуществом бактерий рода *Azospirillum* является их подвижность. В лабораторных условиях показано, что за счет Fla они способны к движению в жидких и полужидких питательных средах [197, 291, 77, 81, 53]. У некоторых видов при выращивании на твердых питательных субстратах также обнаруживаются многочисленные дополнительные Laf. По диаметру они меньше полярных жгутиков. У некоторых азоспирилл на каждом полюсе имеется по пучку флагелл [373, 196, 197, 238, 165, 234, 348]. Fla и Laf обеспечивают характерный тип перемещения бактерий – «роение». Наличие полярного пучка пилей, вероятно, способствует еще одному типу подвижности – распространению с образованием микроколоний [77]. Высокая подвижность азоспирилл в природе способствует их перемещению по направлению к зонам с благоприятными условиями питания, то есть к корням [53, 308].

Азоспириллы являются мезофилами, температурный оптимум для них составляет 30-32°C, а диапазон, при котором возможен рост – 5-42°C. Данные бактерии относятся к нейтрофилам, но значения pH, при которых они растут – 4.0-8.8 [101].

При дефиците питания, то есть при существовании в неблагоприятных условиях, выживаемость *Azospirillum* в ризосфере повышается благодаря их способности к образованию цистоподобных форм [340, 53]. Этот процесс сопровождается образованием внешней полисахаридной оболочки, а также накоплением поли-β-гидроксибутирата, который, в условиях стресса, выступает источником углерода и энергии [371, 372, 53].

Азоспириллы – это аэробные гетеротрофы, осуществляющие фиксацию азота в микроаэрофильных условиях [232, 53]. Источниками азота для данных бактерий служит атмосферный азот, аммоний, нитраты и нитриты [408, 414, 334]. Азоспириллы развиваются как аэробы в присутствии источника химически связанного азота и синтезируют гранулы поли-β-гидроксибутирата

– резервуара запасных питательных веществ [302, 342, 112]. Стоит отметить, что *A. melinis*, *A. thiophilum* и *A. humicireducens* являются факультативными анаэробами [335]. Представители рода *Azospirillum* могут снабжать растения азотом за счет азотфиксации (через редукцию C_2H_2) или денитрификации (через образование N_2O) [415, 133, 53].

Данные бактерии способны использовать широкий спектр органических веществ в качестве источника углерода – органические кислоты, спирты и аминокислоты [112].

Размер генома у бактерий рода *Azospirillum* большой и составляет от 4800 т.п.н. (*A. irakense*) до 9700 т.п.н. (*A. lipoferum*) [275]. Важно отметить, что геном представлен одной или несколькими хромосомами и большим количеством крупных плазмид. Показано, что благодаря наличию плазмид происходит определение условий, необходимых для создания ассоциаций с растениями. Так, плазмиды азоспирилл участвуют в определении синтеза O-специфических и связывающих калькофлюор полисахаридов [289, 275, 368, 34, 35, 37, 219, 226, 397]. Также стоит упомянуть о том, что геном азоспирилл пластичен, содержит много нуклеотидных повторов и снабжен мобильными генетическими элементами (IS-элементы, транспозоны, плазмиды, профаги) [219, 397]. Это обуславливает их высокую адаптационную способность, обитание практически во всех климатических зонах и генетическую пластичность.

Известно, что повышение доступности питательных веществ для азоспирилл осуществляется за счет бактериальных сидерофоров. Эти низкомолекулярные вещества хелатируют железо и ряд других металлов с образованием устойчивых комплексов [4]. Кроме того, бактерии рода *Azospirillum* синтезируют и секретируют некоторые витамины – тимин, рибофлавин, пантотеновую кислоту [115]. Они действуют как коферменты и обеспечивают правильное протекание метаболических процессов у растений. Известно, что азоспириллы подавляют рост фитопатогенной микрофлоры, например грибов рода *Penicillium*, *Fuzarium*, *Aspergillus* [327]. У некоторых PGPR ризосферы происходит активация генов синтеза феназинов –

гетероциклических азотсодержащих соединений с антимикробными свойствами. Феназины контролируют активность патогенов и фитогормонов, оказывающих влияние на морфологию и биохимию растительных корней [263].

Важно отметить, что при ассоциативном симбиозе не наблюдается образование каких-либо специализированных структур. Создание ассоциации подтверждается несколькими факторами, а именно: углевод – белковое узнавание лектинов азоспирилл и растений [56]; более активный синтез полисахаридов у бактерий и растений [298]; адсорбция микроорганизмов на корнях [24]; агрегация и флокуляция бактериальных клеток [57] и так далее.

Взаимодействие ризосферных бактерий и растений начинается с узнавания и может происходить двумя способами. В первом случае – с помощью адгезинов, фимбрий, жгутиков и системы секреции III и IV типа происходит физический контакт; во втором случае в узнавании участвуют особые сигнальные молекулы [263].

При взаимодействии азоспирилл с растением-хозяином, например, с пшеницей, ассоциация формируется в результате следующих этапов: хемотаксиса бактерий к экссудатам из корней растений; прикрепления к корням и формирования вокруг них фибриллярного материала; морфологических изменений корневых волосков; попадания бактерий во внутреннюю часть корня [35].

Прикрепление клеток проходит в две стадии [288, 89, 332]. Первая стадия – адсорбция (Ads) – представляет собой быстрый и обратимый процесс непрочного прикрепления одиночных клеток, чувствительный к действию протеаз и опосредованный белковыми структурами бактериальной поверхности и полярным жгутиком [141, 291]. Вторая стадия – заякоривание (Anc) – медленный и необратимый процесс более прочного прикрепления уже бактериальных агрегатов [317]. Он происходит через 8-16 часов после инокуляции, характеризуется продукцией фибрилл и большого количества слизеподобных веществ и опосредуется поверхностными полисахаридами, связывающими калькофлуор (Ca^{+}). Позже мы рассмотрим процесс

прикрепления клеток бактерий к корням растений более подробно. Эти две стадии – взаимно независимые, существуют как $Ads^- Anc^+$, так и $Ads^+ Anc^-$ мутанты *A. brasilense* Sp7 [288].

Отмечено, что взаимодействие ризосферных бактерий с корнями растений приводит к увеличению числа корневых волосков и изменению их морфологических признаков, увеличению количества боковых корней, их удлинению и увеличению поглощающей поверхности [224, 200, 24, 53, 333]. Указанные изменения улучшают водный статус растений [343], что позитивно сказывается на их росте и развитии и, следовательно, на урожайности [317, 304, 305, 100, 124]. Такие морфологические изменения корневой системы связаны с синтезом и секрецией бактериями фитогормонов (например, индолил-3-уксусной кислоты или ауксина) [215, 105, 273]; внеклеточных комплексов, содержащих полисахариды, и ЛПС мембраны [41, 71, 42, 364].

Исследования показали, что азот, фиксируемый азоспириллами, обнаруживается потом в растении-хозяине [118, 339]. Поскольку данные бактерии являются активными природными азотфиксаторами и стимулируют рост растений, стало возможным для минерального обогащения и увеличения урожайности вместо химических удобрений широко применять препараты на их основе [317, 304, 70, 305, 306, 112; 113, 114, 115, 124, 53, 54, 333, 323]. Например, отмечено, что такое бактериальное удобрение как «Азобактерин» способствует увеличению объема корней на 30%, высоты растений – на 8%, сырой массы надземной части – на 25% [52] и повышает урожайность зерна в среднем на 5-6% [45]. В случае применения препарата «Азоризин» урожайность зерна повышается на 14-17%, что составляет 0,33-0,39 т/га [1].

Уже более 40 лет *Azospirillum* изучается в качестве модельного объекта взаимовыгодных отношений между растениями и микроорганизмами, но многое в их генетике и физиологии до сих пор остается недостаточно изученным, в том числе, гены регуляции коллективного поведения азоспирилл как одного из факторов, необходимых, в частности, для образования растительно-бактериальных ассоциаций [37, 227].

1.2 Характеристика процессов, происходящих при наличии достаточной плотности популяции микроорганизмов

Многочисленные исследования показали, что бактерии способны вести, так называемую, «социальную» жизнь, то есть образовывать многоклеточные организованные сообщества, «общаться», разделять между собой функции и «запоминать» прошлый опыт [121, 402].

Подвижные бактерии способны к обратимому переходу от свободного плавания отдельных клеток к социальной подвижности за счет интенсивной межклеточной коммуникации («чувство кворума») [205, 22, 61, 13, 156].

Еще в 50-х годах XX столетия благодаря К. Зобэлл и М. Андерсон стало известно, что большинство микробных сообществ существуют в составе биопленок, и это помогает им выжить в постоянно меняющихся условиях окружающей среды [139, 330, 207], а также в инфицируемых макроорганизмах. Такие бактерии фенотипически отличаются от свободноживущих, так как тесные структурные ассоциации клеток ведут к интенсивному обмену метаболитами и генетическим материалом [55]. Биопленки представляют собой бактерии, погруженные в толстый слой слизистого матрикса, состоящего из воды, полисахаридов, нуклеиновых кислот, протеинов и гликозилфосфатсодержащих биополимеров, таких как тейхоевые кислоты и гликопротеины [139, 64, 11, 14]. В этих пленках микроорганизмы защищены от внешних воздействий или антимикробных факторов.

Известны различные способы межмикробных взаимодействий, которые обеспечиваются продуктами их метаболизма [11]. За счет общего межклеточного матрикса микроорганизмы могут сосуществовать вместе, подобно тканям многоклеточных организмов [11]. Через слизь матрикса бактериальные клетки обмениваются субстратами, продуктами и сигнальными молекулами. Обмен информацией между азоспириллами и другими бактериями происходит через электронно-плотный слой вещества поверхности клеточных стенок. В случае грамотрицательных микроорганизмов данный процесс

осуществляется за счет ацильных производных лактона L-гомосерина; у грамположительных бактерий – с помощью пептидов и аминокислот [55]. Взаимодействия между грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами осуществляются путем слипания двух клеток и за счет многообразных поверхностных структур [60, 11].

Важно отметить, что взаимосвязь между клетками возникает при определенной плотности популяции – это называется «ощущение кворума» (в переводе с английского «quorum sensing», QS) [55, 74]. Термин появился в 1994 году, его ввел в обиход Э. Гринберг с сотрудниками [183]. Однако феномен QS был описан еще в 1970-е годы. Впервые такую систему регуляции обнаружили при исследовании биолюминесценции морских бактерий *Aliivibrio* (ранее *Vibrio*) *fischeri* для группы ответственных за биолюминесценцию клеток *lux*-генов. [17]. Свечение отсутствовало при малых концентрациях клеток и резко усиливалось при достижении популяцией критической плотности [296, 55]. Известно, что по мере того, как плотность клеток увеличивается и достигает критического уровня, происходит накопление аутоиндукторов (низкомолекулярные сигнальные молекулы) до необходимого порогового значения. Далее образуется комплекс аутоиндуктора с определенным рецепторным регуляторным белком. Данный комплекс запускает транскрипцию генов, отвечающих за синтез ферментов, токсинов, антибиотиков и ряда других веществ. Аутоиндукторы способны легко диффундировать из клеток в среду и обратно [55, 25].

Помимо аутоиндукторов (например, ацилированного лактона гомосерина), сравнительно простые химические сигналы (ионы и молекулы экзогенного происхождения) и физические факторы (свет, температура) тоже могут действовать как регуляторы активности эффекторных систем бактерий [103, 231, 86].

Эффект кворума также определяет образование биопленок и появление способности перемещаться по плотному субстрату у некоторых клеток при колониальном развитии микроорганизмов. В частности, QS регулирует процесс

изменения фенотипа бактериальной клетки от планктонной формы к прикрепленной, что необходимо при построении биопленки [237, 285]. Следовательно, благодаря системе QS отдельные клетки микробной популяции могут обмениваться информацией между собой, что дает возможность выбирать оптимальный вариант взаимодействия с окружающей средой и с клетками макро- и микроорганизмов [55].

Существуют значительные межвидовые и даже межштаммовые различия в молекулярных аспектах формирования и поддержания биопленки [406, 241]. Например, на производство биопленки, экзополисахарида (ЭПС) и подвижность клеток штамма *A. brasilense* Ab-V5 влияют внешние лактоны N-ацил-гомосерина, но в случае штамма *A. brasilense* Ab-V6 этого не наблюдается [181].

В природе прокариоты существуют в различных физиологических формах. Так, планктонные формы (свободно плавающие) обладают развитыми системами активной и пассивной подвижности, а также интенсивным клеточным делением и носят временный характер. Считается, что основной формой существования бактерий в естественных условиях все же являются биопленки. В них клетки прикрепляются или друг к другу, или к поверхности субстрата [199]. Микросимбионты формируют растительно-бактериальные ассоциации в виде различных многоклеточных образований: микроколоний, клеточных агрегатов, грибоподобных или других структур [337]. Такие многоклеточные образования во многом сходны с бактериальным сообществом биопленок [146, 294, 295]. Известно, что популяции биопленок существенно отличаются по физиолого-биохимическим свойствам от суспензионных культур [199]. Наблюдения показали, что условия, создаваемые в биопленках, благоприятны для жизнедеятельности бактерий, горизонтального переноса генов и последующей микроэволюции популяции [161].

1.3 Биопленки – структурированные микробные сообщества

1.3.1 Формирование биопленок – способ адаптации микроорганизмов к изменению условий окружающей среды, в том числе, обитанию в различных экологических нишах

Большинство микроорганизмов встречается в природе в прикрепленном (иммобилизованном) состоянии, образуя погруженные в слизь микроколонии, или в виде наростов на твердых субстратах, что очень важно, например, для микроорганизмов, обитающих в текучих водах (ручьях, источниках). Многие из них имеют форму одетой чехлом нити, один конец которой прикрепляется к субстрату, а другой конец, омываемый текущей водой с растворенными питательными веществами, развеивается в потоке [55, 156].

Прикрепленные и взвешенные в воде подвижные бактерии находятся в разных физиологических состояниях, так как условия в биопленке (вязкость, влажность, градиент O_2 , содержание питательных веществ, плотность популяции микроорганизмов, расстояния между клетками и другое) значительно отличаются от условий окружающей биопленку среды. Это ярко выражается в «архитектуре» таких микробных сообществ [55]. Исследования ИК-спектров *Bordetella pertussis* показали, что в случае биопленок наблюдалось появление дополнительной серии полос поглощения, отсутствующих у планктонной культуры [349]. Предполагают, что это связано с наличием в биопленках матрикса – основного компонентом биопленок, которого нет в планктонных культурах клеток.

Субстратом для формирования биопленок могут выступать частицы грунта, металлоконструкции, водопроводные трубы, скалы и камни, и даже тела других организмов. Так, например, микробиота кишечника или кожи человека формирует гигантские пленки на соответствующих поверхностях [106, 326]. Как правило, биопленки состоят из погруженных в матрикс микроколоний. Они окружены каналами с жидкостью, по которым к бактериальным клеткам поступают питательные вещества и кислород, а также

выводятся конечные продукты метаболизма [29, 14]. В природе биопленки формируются на границе соединения двух фаз: несмешивающихся жидкостей; жидкость и воздух; жидкость и твердая поверхность; твердая поверхность и воздух [59].

На сегодняшний день больше всего исследованы биопленки с интерфазы жидкость – твердая поверхность. По типу они бывают простые (несколько слоев клеток из микроорганизмов одного или разных видов) или взвешенные в жидкой среде хлопья, маты, бляшки и другие. На границе фаз жидкость – воздух встречаются простые биопленки; многослойные структуры, напоминающие чайный грибок; пленки бацилл из рыхлых цепочек клеток и плодовых тел, способных к образованию спор [59].

Нужно отметить, что многовидовые биопленки преобладают в природных экосистемах, а одновидовые биопленки – более редкое явление и встречаются они в органах высших животных при их заражении. Например, биопленки, образованные *Pseudomonas aeruginosa*, обнаружены в легких человека [29].

Формирование биопленочных сообществ считается одним из основных механизмов выживания бактерий в той или иной экологической нише [174]. Так, в составе биопленок у клеток в разы возрастает резистентность к воздействию биоцидов и других стрессовых факторов внешней среды, кроме того, более активно протекают многие биохимические процессы [178, 39, 117, 273]. Важно отметить, что в биопленке находятся разные типы клеток – жизнеспособные и мертвые (мумифицированные) [62, 12]. Это динамичная среда. При контакте с жидкостью освобождаются не только отдельные жизнеспособные клетки, но и целые кластеры клеток, способствуя распространению микроорганизмов в природе [59].

Азоспириллы способны формировать биопленки как самостоятельно, так и совместно с другими микроорганизмами, например, они встречаются в консорциуме с бактериями, осуществляющими очистку сточных вод [189, 169].

1.3.2 Основные этапы формирования биопленок

Образование бактериальных биопленок – это сложный многоступенчатый процесс, включающий перемещение бактерий в почве к корням (хемотаксис); закрепление на субстрате; формирование микроколоний; созревание биопленки; дисперсию клеток [344] (рисунок 1).

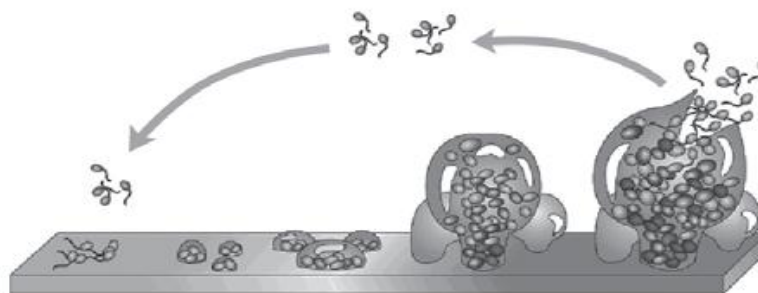


Рисунок 1 – Основные стадии процесса формирования биопленки: 1 – адгезия бактерий к поверхности; 2 – формирование монослоя; 3 – формирование микроколоний; 4 – созревание биопленки; 5 – распад биопленки [18].

При формировании биопленки стадия адгезии является ключевой. Закрепление микробной клетки на поверхности субстрата обратимо и происходит за счет неспецифической адгезии и действия электростатических, гидрофобных и сил Ван дер Ваальса [311]. У грамотрицательных бактерий, в том числе азоспирилл, в хемотаксисе и прикреплении к тому или иному субстрату участвуют жгутики и фимбрии IV типа. Движение с помощью жгутиков помогает микроорганизмам распространяться в почве и образовывать монослой клеток на субстрате, а фимбрии IV типа задействованы в агрегации бактерий [130].

На следующей стадии клетки утрачивают подвижность, прикрепление становится необратимым, увеличивается слой биопленки, из кластеров клеток формируются различные трехмерные структуры [147, 344]. Основную роль на данном этапе играют молекулы адгезинов, которые помогают преодолевать силы отталкивания одноименно заряженных поверхностей. У бактерий

известны два типа данных молекул – адгезины фимбрий и адгезины нефимбриальной природы (ЭПС, S-слои) [19]. Важно отметить, что первые бактерии, закрепившиеся на поверхности, облегчают присоединение последующих клеток, а внеклеточный матрикс поддерживает всю конструкцию. На этом этапе накапливаются питательные вещества, и начинается процесс деления клеток [6].

Заключительная стадия – дисперсия, при которой бактерии снова становятся подвижными и выходят через открытые каналы. Азоспириллы возвращаются к планктонному способу существования, и цикл развития биопленки завершается [344, 29]. Зрелая биопленка является динамичной структурой, от которой все время отщепляются микроорганизмы. Распад биопленок может происходить несколькими способами – эрозией, сбрасыванием или дисперсионным распылением клеток [223]. На протяжении всего цикла развития биопленки осуществляется непрерывное высвобождение небольшого количества клеток – этот процесс и есть эрозия. Сбрасывание происходит на поздних стадиях формирования биопленки и заключается во внезапном отторжении крупных клеточных пластов. Дисперсионное распыление – это быстрый выход клеток из пустых полостей, образующихся внутри микроколоний биопленок [51].

Данная стадия чрезвычайно важна, так как в результате появляются новые свободноживущие бактерии, также способные к образованию биопленки [345].

Дисперсия может быть активной или пассивной. Активное отторжение связано с процессами, протекающими в самих бактериях, а пассивное совершается под воздействием внешних факторов (питательные вещества перестают поступать, или наоборот, внезапно появляются; конкуренция с другими бактериями). Обычно распад является ответом на изменения внешней среды [345, 188, 51]. Таким образом, распад биопленки является фенотипическим ответом на влияние тех факторов внешней среды, воздействие которых микроорганизмам выгоднее переживать в свободном состоянии.

Нужно отметить, что данный процесс сопровождается перестройками матрикса за счет синтезируемых бактериями ферментов, а также дерепрессии синтеза компонентов жгутика [222, 345]. Кроме того, в дисперсии биопленки участвуют специфические механизмы клеточной сигнализации [393].

На биотических поверхностях биопленки формируются, например, на корнях растений [315]. Процесс образования биопленок зависит от физико-химической вариативности в пределах корневой поверхности и от многих абиотических факторов (температура, относительная влажность и доступность питательных веществ) [367]. Разные виды бактерий смогли приспособиться к постоянно меняющимся условиям окружающей среды благодаря способности заселять различные части корня и создавать микроколонии, постепенно превращающиеся в зрелые биопленки.

Установлено, что корневые экссудаты являются источником питания для микросимбионтов. Растения выделяют от 10 до 40% первичных продуктов фотосинтеза именно в виде корневых экссудатов [55]. Они инициируют заселение растений бактериями [262] и формирование биопленок [389]. Динамичная среда обитания, в свою очередь, оказывает влияние на взаимодействие растения и микробного сообщества в ризосфере. Если в ассоциации с растением участвует более одного вида бактерий, взаимоотношения усложняются [99, 143].

Резистентность PGPR к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам увеличивается при образовании биопленок на поверхности подземных и надземных органов растения-хозяина. Растение тоже получает пользу – биопленка защищает его от фитопатогенов и снабжает необходимыми физиологически активными веществами, продукция которых зачастую активируется благодаря QS [145].

1.3.3. Матрикс биопленок

Помимо своеобразного скелета или каркаса, матрикс в биопленках выполняет разнообразные функции, в том числе сорбционную, посредством

регулирования поступления катионов, анионов, неполярных соединений, а также различных частиц из водной фазы [173]. Тяжелые металлы (Ni^{2+} , Zn^{2+} и Cd^{2+}) связываются с клеточной стенкой бактерий, а гидрофобные соединения (фенол, ксилен, толуол) накапливаются непосредственно в матриксе биопленки [401].

Одной из основных функций матрикса также является протекторная. Он защищает клетки от неблагоприятных физико-химических факторов среды (например, высыхание, изменение pH и температуры) [347, 68]. В частности, благодаря матриксу, который представляет собой сильно гидратированную среду и, следовательно, медленно высыхает, биопленка не страдает от изменений водного потенциала [310].

Как говорилось ранее, бактерии, существующие в виде биопленок, обладают высокой устойчивостью к стрессовым воздействиям, антибиотикам или другим биоцидам. Возможно, это связано с индукцией систем, отвечающих за выведение антибиотиков из клеток [300, 68]; медленным прохождением антибиотиков сквозь внеклеточный матрикс [249]; образованием клеток-персистеров [375, 350, 248] и снижением скорости метаболизма бактерий в биопленках [140, 68]. Так, имеются данные о том, что именно матрикс биопленок может связывать или не пропускать и даже инактивировать антибиотики [148].

Помимо всего перечисленного, матрикс – это запас факторов, необходимых для роста, ферментов и других веществ [330].

Итак, можно выделить следующие функции матрикса [174]:

1. Участие в адгезии клеток. Матрикс обеспечивает начальные этапы колонизации различных поверхностей бактериями и их долговременное прикрепление.

2. Участие в агрегации клеток. Осуществляется за счет создания связей между клетками, временной иммобилизации популяции и повышения плотности клеток в определенной точке пространства.

3. Когезия. Происходит формирование полимерных сетей, обеспечивающих механическую стабильность биопленок и формирование их сложной архитектуры.

4. Удержание воды. Процесс осуществляется благодаря гидротированной среде биопленок, вследствие чего в сухих условиях клетки не теряют жидкость.

5. Защитный барьер. Матрикс обеспечивает устойчивость к специфическим и неспецифическим факторам защиты организма; устойчивость к противомикробным препаратам; защиту ферментных систем от неблагоприятного воздействия; препятствует поеданию некоторыми простейшими.

6. Сорбция. Матрикс заполняет межклеточные пространства и образует трехмерную фильтрующую систему бактериальных клеток, сорбируя органические соединения и неорганические ионы.

7. Каталитическая активность. За счет иммобилизации экзоферментов на полисахаридной матрице повышается их активность и осуществляется переработка питательных веществ.

8. Запасание источников питания (углерод-, азот- и фосфорсодержащих соединений), утилизируемых клетками биопленки.

9. Обеспечение генетической изменчивости – горизонтального переноса генетического материала между клетками биопленки.

10. Поддержание окислительно-восстановительного потенциала, который способствует обеспечению межклеточного переноса электронов.

11. Экспорт клеточных компонентов. Матрикс обеспечивает обмен с окружающей средой благодаря наличию везикул, содержащих белки, ЛПС, нуклеиновые кислоты и фосфолипиды.

Итак, матрикс – основной структурный элемент биопленки [68]. Он состоит из смеси таких компонентов, как гликополимеры, нуклеиновые кислоты, белки [64, 139, 14]. Матрикс может составлять до 85% массы биопленки, а бактерии – 15% [67]. Он покрывает отдельные клетки, их группы,

всю колонию в целом и вместе с поверхностными органеллами обеспечивает физический контакт клеток [61].

ЭПС матрикса выполняют следующие функции: сорбируют металлы, минералы и растворенные органические вещества из окружающей среды; поддерживают постоянство среды внутри клетки; концентрируют питательные вещества, ферменты и ростовые факторы. Кроме того, с помощью ЭПС матрикса азоспириллы заякориваются в экологических нишах, где могут оказаться смытыми с поверхности субстрата. [39]. В среднем, в зависимости от конкретной биопленки, ЭПС занимает 50-90 % от общей сухой массы веществ матрикса. [17]. В основном ЭПС биопленок – это длинные полимеры с молекулярной массой от $0,5 \times 10^6$ до 2×10^6 Да [174]. Химический состав у различных бактерий варьирует, но основные вещества ЭПС – гомо- (производные сахарозы) и гетерополисахариды (нейтральные и заряженные остатки сахаров, уроновые кислоты и другие аминокислоты и моносахара, например, β -1,6-N-ацетил-D-глюкозамина, D-манноза, D-галактоза) [338, 146, 416, 67, 68].

ЭПС обеспечивают агрегацию клеток между собой [265]. Для многих микроорганизмов именно ЭПС являются ключевыми компонентами процесса формирования биопленки, так как мутантные штаммы этих микроорганизмов, дефектные по синтезу ЭПС, либо совсем не могут формировать зрелые биопленки, либо этот процесс у них значительно нарушен [144, 265].

Высокая вязкость матрикса обеспечивается входящими в его состав полисахаридами. С одной стороны, это позволяет сосредоточить синтезируемые экзоферменты рядом с клетками, увеличивая их концентрацию в определенной точке пространства, с другой, – не допускает равномерное распределение по всей биопленке неблагоприятных для нее веществ, например, антибиотиков и дезинфектантов. В случае прекращения поступления питательных веществ в биопленки компоненты матрикса также могут выступать в качестве резервных источников основных биогенных элементов, что позволяет клеткам, входящим в состав биопленки некоторое время существовать в условиях уменьшения количества питательных веществ [174].

Как было отмечено ранее, матрикс, помимо ЭПС, состоит из белков, нуклеиновых кислот и ЛПС. В белковых фракциях обнаружены адгезины, лектины, клеточные фимбрии и пили, без которых не формируется полноценная биопленка [68, 135].

ЭПС, белки и нуклеиновые кислоты – гидрофильные составляющие с высокой степенью гидратации, а липиды – гидрофобные компоненты [297], причем, они могут находиться в ассоциации с ЭПС или в свободной форме [138].

У многих микроорганизмов в матриксе биопленок также содержится экстрацеллюлярная ДНК (эДНК) [179]. В результате исследований выяснилось, что для ряда бактерий рода *Rhodovulum* эДНК является важным компонентом, участвующим в агрегации клеток [293]. У данных бактерий, обработанных нуклеазами, отмечено прекращение процесса самоосаждения, тогда как применение пептолитических ферментов не вызывает подобного эффекта [392].

1.4 Формирование биопленок бактериями рода *Azospirillum*

Как было рассмотрено ранее, бактерии в природе чаще существуют в биопленочных сообществах. Известно, что они формируются в 5 этапов, и что этот процесс связан с синтезом клетками особого вещества – матрикса. Довольно подробно изучено такое биологическое явление как хемотаксис азоспирилл, множество исследований посвящено особенностям процесса прикрепления данных бактерий к абиотическим и биотическим поверхностям и роли разнообразных структур поверхности клеток в этих процессах, важных для формирования биопленок. Но все вышеупомянутые явления в литературных источниках широко описаны в целом, и особое внимание стоит уделить именно их взаимосвязи с процессом образования биопленочных сообществ на примере бактерий рода *Azospirillum*.

1.4.1 Подвижность и хемотаксис

Многочисленные исследования говорят о том, что бактерии осуществляют хемотаксис по направлению к аттрактантам и в противоположную сторону от репеллентов. Питательные вещества, например, являются аттрактантами, а токсины – репеллентами; они видоспецифичны [87]. Различные тактические реакции необходимы для оптимального взаимодействия с окружающей средой, хемотаксис является одной из важнейших поведенческих реакций микроорганизмов [244, 386, 236, 307, 184].

У азоспирилл обнаружены гены, кодирующие метил-акцептирующие белки (МАБ) [292]. Они представляют собой рецепторы трансдукции, опосредующие хемотаксисный ответ клеток на ряд веществ, в том числе аминокислоты, пептиды, некоторые сахара и ионы [204, 128]. Связывание хемоэффекторов с периплазматическим участком таких МАБ меняет их конформацию. Это приводит к модификации строения цитоплазматического домена, и, как следствие, к изменению процесса передачи сигнала к цитоплазматическим сигнальным молекулам [94].

Так, секвенирован и описан большой кластер генов хемотаксиса («Che» от англ. «chemotactic») *A. brasilense* Sp7, состоящий из генов, потенциально кодирующих белки метилэстеразу (CheB), метилтрансферазу (CheR), и участвующие в трансдукции сигнала от МАБ к мотору жгутиков белки CheW, CheY и протеинкиназу (CheA) [208, 203, 184]. Гены в кластере расположены в том же порядке, при этом степень идентичности индивидуальных генных продуктов составляет 60%. При определенных условиях CheB и CheR могут оказывать влияние на аэро- и хемотаксис *A. brasilense*. У мутантов, лишенных CheB и CheR отмечены нарушения в аэротаксисе [369]; *A. brasilense* и *E. coli* имеют большие отличия в адаптации к аттрактантам [369, 129].

Корневые выделения растений формируют градиенты различных соединений в почве [264]. Почвенные бактерии могут чувствовать источник питательных веществ и двигаться к нему. Так, исследования различных Che⁻ мутантов *Rhizobium meliloti*, в том числе привлекаемых корневыми

экссудатами, но потерявших способность чувствовать градиент аминокислот и сахаров, позволили предположить, что хемотаксис ризобий двух типов. Один нужен для обнаружения питательных веществ, другой – для специфических аттрактантов растения-хозяина [142, 186, 125]. Fla⁻/Mot⁻ и Che⁻-мутанты удобны в качестве модели для изучения роли жгутиков, подвижности и хемотаксиса при формировании ассоциаций между бактериями и растениями [33].

Обнаружено, что азоспириллы в почве способны двигаться по направлению к растительным корням [107, 108, 308]. Эти бактерии также перемещаются в сторону органических и аминокислот, моно- и дисахаридов [104, 328, 413, 38], ароматических соединений [257, 258]. Энергетический таксис азоспирилл направлен на максимальное обеспечение клеток энергией и позволяет двигаться в направлении тех веществ, которые метаболизируются в данных условиях окружающей среды [91]. Считается, что подобная система более выигрышна в местообитаниях с бедными по составу субстратами.

Известно, что передвижение большинства бактерий обеспечивается вращением спиралевидных жгутиков [272, 374]. Для передвижения необходимы три группы генов: *fla* (синтез жгутиков), *mot* (движение) и *che* (хемотаксис). Сборка бактериального жгутика *in vivo* включает синтез специфического экспортного аппарата, посредством которого транспортируются белки, составляющие жгутик. Так, исследования показали, что в геноме *Azospirillum* sp. B510 имеется кластер из 31 гена жгутикования, около 30 из них кодируют белки, участвующие в хемотаксисе [219].

Бактериальный жгутик состоит из длинной нити (филамента), прикрепленной к базальному телу с помощью гибкого крюка [268, 123, 361, 374, 290].

Филамент спиралевидной формы представляет собой полый цилиндр, состоящий из множества копий одного сократительного белка (флагеллина) [243, 394, 187, 126, 192]. У разных видов и штаммов молекулярный вес флагеллина может составлять от 15 до 100 кДа [243, 197, 239, 348]. Например, у

A. brasilense в случае Fla это значение равняется примерно 100 кДа, а в случае Laf – 45 кДа [348]. Субъединицы белка полярной флагеллы *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *A. brasilense* закручены в левостороннюю гибкую спираль [243, 413], а у *Rhizobium meliloti*, *R. lupine* и *Bradyrhizobium japonicum* – в правостороннюю жесткую спираль [239, 190, 221].

Крюк («колени») – это белковая структура изогнутой формы в основании филамента жгутика, соединяющая его с базальным телом [225]. Именно за счет крюка движение передается от базального тела филаменту [357].

За прикрепление жгутика к клеточной стенке и его вращение отвечает полипептидное базальное тело [290, 357]. Данный элемент состоит из «двигателя», приводимого в действие протонным или натриевым насосом [272, 182], и «переключателя», определяющим, в каком направлении жгутик будет вращаться [96]. В базальном теле выделяют стержень и L-, P-, M- и S-кольца у грамотрицательных бактерий или M- и S-кольца у грамположительных [151]. Помимо перечисленных элементов, тут же находятся структурные Mot- и Switch-белки, участвующие в работе жгутика [267, 88, 177]. Вращение «двигателя» или «мотора» происходит благодаря разности концентрации протонов H^+ или Na^+ – $\Delta\mu H^+$ и $\Delta\mu Na^+$, соответственно, на внешней и внутренней стороне мембран клеток [66]. Полярный жгутик *A. brasilense* Sp7 вращается за счет возникающей на клеточной мембране бактерий $\Delta\mu Na^+$ [399]. Вращение жгутика и клетки происходит в противоположных направлениях, но клетка значительно массивнее жгутика, поэтому совершает намного меньшее число оборотов [20].

Успешное взаимодействие азоспирилл с растениями во многом обеспечивается благодаря полярному жгутику [141]. Именно эта клеточная структура отвечает за направленное движение бактерий [413], обеспечивает реализацию социальной подвижности [37], является адгезином [120, 288, 89] и одним из основных поверхностных антигенов азоспирилл [9, 5, 355]. Было доказано, что флагеллы *A. brasilense* Sp7 участвуют в адсорбции клеток на

корнях растений [141].

Расположение жгутиков может быть различным. Для азоспирилл, а также вибрионов и родоспирилл характерно смешанное жгутикование [282, 291, 217]. В жидких питательных средах у *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans* и *A. irakense* [373, 271, 197, 165, 329, 234] имеется всего одна полярно расположенная флагелла, а на полужидких и плотных субстратах у трех из перечисленных штаммов (*A. brasilense*, *A. baldaniorum*, *A. lipoferum*, *A. irakense*) дополнительно также образуются более короткие и тонкие Laf. Жгутики с полярным и боковым расположением имеют серологические различия [373, 196, 197, 234, 348, 268, 269, 124]. Можно считать, что бактерии адаптируются к жизни в различных условиях окружающей среды, меняя характер жгутикования в зависимости от значения рН, состава и вязкости субстрата или температуры [235, 278, 197, 16, 331].

Обнаружено, что у штамма *A. brasilense*, выращенного в жидкой среде, при скользящем поступательном движении Fla вращается против часовой стрелки. В случае происходящих каждые 1-3 с «кувырках», меняющих ориентацию клетки перед следующим плавательным движением, флагелла закручивает азоспириллу по часовой стрелке [413]. Продолжительность «пробегов» и «кувыркания» («дрожания») клеток варьируется при изменении концентрации хемоэффекторов [266, 122, 134]. Длина «пробега» увеличивается при движении бактерий в сторону аттрактантов и уменьшается при приближении к репеллентам, но спустя некоторое время (время адаптации) после изменения концентрации хемоэффектора, бактерия возвращается к перемещению с исходной продолжительностью «пробегов» и «кувырков» [356, 15].

Для бактерий известен такой тип движения как роение (swarming motility) – это коллективное перемещение бактерий на различных субстратах со значительной степенью вязкости, зависящее от работы жгутиков, наличия межклеточных контактов, продукции ЛПС и ЭПС, а также других факторов, которые пока мало изучены [61, 201]. Изменение способа движения

сказывается на размерах клеток. Так, при переходе от свободного плавания к роению увеличиваются продольные размеры бактерий; жгутиков на клетке становится больше или меняется их структура. Например, у *A. brasilense* на средах с повышенной плотностью, помимо Fla, образуются многочисленные Laf и немного увеличивается продольный размер клеток [197, 291, 76]. Переход от плавающего типа клеток к роящемуся происходит, в частности, благодаря мастер-оперону *flhDC*. Именно он регулирует работу генов, определяющих структуру жгутиков и отвечающих за хемотаксис и деление клеток [268].

1.4.2 Прикрепление бактерий

Как упоминалось ранее, прикрепление бактерий является ключевым этапом формирования биопленок [67]. После соприкосновения с твердой поверхностью не обязательно происходит окончательное закрепление на ней бактерий [26, 67]. Начальная стадия адгезии представляет собой комплекс физико-химических взаимодействий, она обратима. В переходе к необратимой стадии образования биопленки участвуют адгезины, способствующие преодолению сил отталкивания при соприкосновении одноименно заряженных поверхностей [21, 67]. Адгезины бактерий подразделяются на две основные группы. К первой относятся адгезины, связанные с органеллами – фимбриями, ко второй – адгезивные факторы нефимбриальной природы. Так, в процессе закрепления азоспирилл на корнях растений участвуют жгутики и фибриллы полисахаридной природы [141, 43, 381]. К нефимбриальной группе относятся ЭПС и другие соединения [65, 67].

Для азоспирилл описаны различные механизмы, способствующие их адгезии на корнях. Например, синтез целлюлозы – один из механизмов, с помощью которого бактерии могут плотно связываться с корнями [332, 397]. Гены, участвующие в синтезе целлюлозы обнаружены у *A. lipoferum* 4В и *Azospirillum* sp. В510. Предполагают, что у штамма *A. baldaniorum* Sp245^T существенную роль в формировании биопленки на модельной поверхности стеклянных трубочек играют tad-пили [377, 396, 397].

Пили бактерий находятся на поверхности клеток и представляют собой белковые структуры нитевидной формы длиной 1-4 мкм и диаметром 2-8 нм [336, 261]. Так, при конструировании и изучении мутантов *A. baldaniorum* Sp245, лишенных жгутиков, обнаружено, что данные бактерии осуществляют сборку полярного пучка пилей [77].

Филамент пилей представляет собой спираль из белка пилина, состоящего из 145-160 аминокислот. [313]. Диаметр спирали составляет 6 нм, высота витка – 4 нм; на один виток приходится пять мономеров [175]. По форме филамент похож на ковш, «ручка» которого образована N-концевой α -спиралью, а «чаша» – β -слоями и гипервариабельным участком из дисахаридов, ковалентно связанных с серином. Белки филамента расположены гидрофобными «ручками» внутрь таким образом, что, в отличие от жгутиков, места для канала нет. «Чаша» размещается по кругу гипервариабельными участками наружу. Антигенные свойства пилей формируются именно за счет таких участков [313].

В верхней части пилей находятся адгезины; процесс прикрепления клетки к любой поверхности сопровождается сокращением пилей за счет их АТФ-зависимой разборки [281]. Возможно, движения с помощью пилей обеспечиваются их повторяющимися сжатием и вытягиванием и могут быть короткими и отрывистыми или протяженными и гладкими [205, 370, 390, 358].

Известно четыре класса пилей, обладающих различными физическими свойствами, особенностями антигенных детерминант и адгезивными характеристиками [261, 35]. Пили I и IV типов исследованы наиболее полно [168, 279]. У них имеются существенные различия по молекулярным механизмам секреции и сборки [35]. В процессе сборки пилей I типа для закоривания во внешней мембране необходим минорный белок пилин [168]. В случае пилей IV типа требуются белки внешней мембраны, которые образуют структуры с крупными порами, через которые пили выбрасываются [360, 354], а также препилин-пептидаза, интегральный мембранный белок – платформа для

сборки пилей и компонент внешней мембраны, строящий канал для переноса собранных пилей через мембрану [92, 360].

Показано, что именно с помощью пилей IV типа осуществляются скольжение (*gliding motility*) по влажным поверхностям у бактерий *Mucococcus xantus* и тянущая подвижность (*twiching motility*) у *P. aeruginosa* [370, 395, 22, 201, 35, 37]. Скольжение бактерий происходит при попадании клеток на твердый субстрат. Этот тип движения заключается в следующем: происходит относительно медленное, прекращающееся и затем снова возобновляющееся перемещение в направлении, параллельном продольной оси бактерий [205, 272, 366]. Тянущая подвижность – это способ передвижения бактерий по поверхности твердых субстратов короткими, прерывистыми рывками [205, 206, 390]. При формировании биопленки перемещение данным способом возможно только в том случае, если бактерии находятся в контакте с другими микроорганизмами, что свидетельствует о «социальной» природе подвижности [29].

Кроме того, пили IV класса участвуют в таких процессах, как агрегация клеток, образование микроколоний и биопленок [205, 22, 201]. Еще эти структуры участвуют в адгезии бактерий к тканям хозяина и абиотическим субстратам [360]. Примером является прикрепление фитопатогена *Xantomonas campestris* pv. *hyacinthi* и ассоциативных бактерий *Azoarcus* к листьям и корням растений [383, 157].

Основными физиологическими функциями поверхностных гликополимеров азоспирилл являются: обеспечение прикрепления, образование гидратированного слоя вокруг клетки, защита от негативных воздействий окружающей среды, участие в создании биопленок и в адгезии к различным поверхностям [43]. Источником энергии на более поздних этапах развития азоспирилл являются ЭПС, продуцируемые во время экспоненциальной фазы роста [290, 98].

Азоспириллы секретируют слизистый, легко смываемый ЭПС и плотно связанный с клеточной поверхностью капсульный полисахарид [43].

Внеклеточные полисахариды (ВПС), к которым относятся кислые капсульные полисахариды (КПС или К-антигены), и полисахариды, ассоциированные с поверхностью, а так же ЛПС и внеклеточные ЭПС представляют собой потенциальные факторы растительно-микробного симбиоза [43]. Данные полисахариды связываются с красителями калькофлуор и конго красным, а также с агглютинином зародышей пшеницы. Фенотип микроорганизмов, способных к синтезу ЭПС и КПС относится к Ca^{2+} . ЭПС защищают бактерии от УФ-облучения, изменения pH, осмотического шока, высыхания, воздействия антибактериальных препаратов и ряда других неблагоприятных факторов окружающей среды [42, 198].

Полисахариды клеточной поверхности азоспирилл могут вступать в контакт с лектинами растений различной специфичности [404], например, АЗП, присутствующий на корнях растений и выделяющийся во внешнюю среду [2]. Взаимодействие бактериальных полисахаридов с лектинами растений обуславливает начальные этапы прикрепления азоспирилл к корням проростков пшеницы. [24].

В качестве элемента распознавания, помимо лектинов растительного происхождения, выступают бактериальные лектины или гемагглютинины. Лектины азоспирилл представляют собой гликопротеины и обладают углеводной специфичностью при взаимодействии с моно- и дисахаридами [32, 58]. У некоторых видов *Rhizobium*, *Klebsiella* и *Enterobacter* агглютинины, ассоциированные с пиями, участвуют в адгезии клеток бактерий к корням [209, 195]. Показано, что у азоспирилл лектины, как и фимбрии с пиями других бактерий, участвуют в прикреплении к корням пшеницы и образовании азотфиксирующей ассоциации. Поверхностные лектины также задействованы в агрегации клеток, которая происходит благодаря их специфическому и неспецифическому взаимодействию с ЭПС бактерий того же штамма [56, 58].

У азоспирилл КПС связан с внешней мембраной и, в отличие от ЭПС, который постоянно экспортируется в окружающую среду, по мере роста культуры переходит в культуральную жидкость [43]. ВПС состоят из

нейтральных β -глюканов и кислых гетерополисахаридов, участвующих в образовании фибрилл [150]. Так, исследования, проведенные с мутантами *A. brasilense*, *Rhizobium leguminosarum* и *Pseudomonas fluorescens*, обладающими различной способностью к продуцированию данных полисахаридов, показали, что именно они играют решающую роль в адгезии и дальнейшем формировании биопленок на корнях растений. Отмечено, что у штаммов *A. brasilense* и *R. leguminosarum* со сниженной продукцией ВПС наблюдается уменьшение числа адгезированных клеток [127, 44].

Азоспириллы – это грамотрицательные бактерии, поэтому ЛПС является основным компонентом их клеточной стенки и занимает приблизительно 75% бактериальной поверхности [220, 247]. Молекула ЛПС состоит из липидной и полисахаридной частей. К бифосфорилированному липиду А (гидрофобная составляющая) через олигосахарид (кор) присоединяется О-специфический полисахарид (ОПС или О-антиген). ОПС – это наиболее вариабельная часть молекулы ЛПС, представляющая собой полимер, состоящий из повторяющихся звеньев олигосахаридов [30]. Кор и ОПС направлены наружу, а липид А обеспечивает прочную связь ЛПС с наружной мембраной [90].

Известно, что *A. baldaniorum* Sp245^T синтезируют ЛПС I и ЛПС II, несущие, соответственно, кислый ОПС I и нейтральный ОПС II [228, 36, 43, 50] с повторяющимися звеньями из идентичных пентасахаридов, состоящих из остатков *D*-рамнозы [166]. ЛПС наружной мембраны азоспирилл способны вызывать морфологические изменения корневых волосков пшеницы [214, 24, 71, 72]. Показано, что ЛПС-содержащие экстракты бактериальных клеток стимулируют агрегацию бактерий [277, 8] и их адгезию к поверхности корня [276, 8]. Например, в случае мутантного штамма *A. brasilense* KM252, который дефектен по синтезу ЛПС, на корнях растений обнаружено снижение количества адсорбированных бактерий [71, 8].

В литературных источниках имеются сведения, позволяющие получить представления о способности азоспирилл к направленному движению к корням растений и о закреплении бактерий на различных типах поверхности

(биотической и абиотической) – феноменах, обуславливающих начало образования биопленок. Дальнейшее развитие биопленок бактерий рода *Azospirillum* охарактеризовано недостаточно. Мало что известно о роли полимеров и структурных элементов клеточной поверхности азоспирилл, в том числе жгутиков, в формировании и поддержании биопленки. Мутации в ЛПС и ЭПС *A. baldaniorum* Sp245^T и *A. brasilense* Sp7 оказывают влияние на процесс накопления биомассы биопленки, формирующейся на различных типах поверхностей [351, 245, 246]. У *A. brasilense* Sp7 ген *cdgA*, кодирующий дигуанилатциклазу, которая участвует в образовании второго мессенджера циклического di-GMP, важен для производства экзополисахарида и формирования биопленки. Биопленки мутанта *cdgA* тоньше биопленок родительского штамма [324]. Инактивация у *A. baldaniorum* Sp245^T предполагаемого гена (*cpaB*) гипотетической *tad*-пили, отвечающей за плотную адгезию, подавляет развитие биопленки [396]. Таким образом, имеющиеся сведения о морфологии клеток азоспирилл, находящихся в составе биопленки, и основных компонентах матрикса, стабилизирующих ее структуру, разрознены и фрагментарны. Изучение азоспирилл в данном контексте очень важно для понимания взаимосвязи между процессами, обеспечивающими образование биопленочных сообществ азоспирилл и адаптацией этих бактерий к существованию в корневой системе растений.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Бактериальные штаммы, использованные в работе

Исследуемые штаммы бактерий перечислены в таблице 1.

Таблица 1 – Бактериальные штаммы *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T и плазмиды, использованные в работе

Штамм	Характеристика	Источник
Sp245 ^{T*}	Дикий тип, полученный в Бразилии из корней пшеницы	[102, 158]
Sp245.1063	Fla ⁻ Laf ⁻ –мутант Sp245 (flhB1::Omegon-Km), Km ^R	[40]
Sp245.1610	leaky Fla ⁻ /Mot ⁻ Laf ⁻ Swa ⁻ –мутант Sp245 (fabG1::Omegon-Km), Km ^R	[40]
SK039	leaky Fla ⁻ /Mot ⁻ Swa ⁻ –мутант Sp245 (mmsB1::Omegon-Km), Km ^R	[346]
Sp245 (pRK415)	Штамм Sp245, содержащий векторную плазмиду pRK415, Tc ^R	[171, 172, 352]
Sp245 (pRK415–150176)	Штамм Sp245, содержащий плазмиду pRK415 с кодирующим участком AZOBR_150176, Tc ^R	[171, 172, 352]
Sp245.1063 (pRK415)	Мутант Sp245.1063, содержащий векторную плазмиду pRK415, Km ^R , Tc ^R	[171, 172, 352]
Sp245.1063 (pRK415–150177)	Мутант Sp245.1063, содержащий плазмиду pRK415 с кодирующим участком AZOBR_150177, Km ^R , Tc ^R	[171, 172, 352]
Sp245.1063 (pRK415–150176)	Fla ⁻ Laf ⁻ –мутант Sp245.1063, содержащий плазмиду pRK415 с кодирующим участком AZOBR_150176, Km ^R , Tc ^R	[171, 172, 352]]
SK039 (pRK415)	Мутант SK039, содержащий векторную плазмиду pRK415, Km ^R , Tc ^R	[353]
SK039 (pRK415–	Комплементарный мутант SK039,	[352, 353]

mmsB1)	несущий pRK415-mmsB1, Km ^R	
Плазмиды:		
pRK415**	RK2-derived, broad-host-range, low-copy-number expression vector, 10.7 kb, Tc ^R Вектор-дериват RK2 с большим диапазоном хозяев и низким количеством копий, 10.7 т.п.н., Tc ^R	[279]
pRK415–150177	pRK415, содержащий фрагмент <i>Bam</i> HI размером 1172 п.н. с хромосомными кодирующими участками гена 1077 п.н. AZOBR_150177 штамма Sp245 плюс 79 вверх и 16 вниз п.н.	[171, 172, 352]
pRK415–150176	pRK415, содержащий фрагмент <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI размером 2616 п.н. с хромосомными кодирующими участками гена 2526 п.н. AZOBR_150176 штамма Sp245 плюс 28 вверх и 62 вниз п.н.	[171, 172, 352]
pRK415– mmsB1	pRK415, содержащий фрагмент <i>Hind</i> III- <i>Eco</i> RI в 912 п.н. с предсказанным геном mmsB1 в 882 п.н. <i>A. brasilense</i> Sp245 плюс 14 восходящих и 16 нижестоящих п.н.	[353]

Примечание: * – ранее *A. brasilense*; ** – lac-промотор pRK415 является конститутивным в клетках *A. baldaniorum* Sp245^T [210], которые не используют лактозу [373].

Штамм *A. baldaniorum* Sp245^T предоставлен Коллекцией ризосферных микроорганизмов Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук» (ИБФРМ РАН, г. Саратов).

На основании недавних исследований рядом зарубежных ученых генома азоспириллы произошли некоторые изменения в систематике этих бактерий. Штаммы *Azospirillum brasilense* Sp245, Vi22 и BR12001 выделены в отдельную

группу и представляют собой новый вид рода *Azospirillum* – *Azospirillum baldaniorum* sp nov. *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T является типовым штаммом этой группы [158].

2.2 Состав питательных сред и условия культивирования бактерий

Культуры бактерий выращивали на питательных средах двух типов – бедной азотом малатно-солевой среде (MSM) [153] или богатой среде Luria–Bertani (LB) [341].

Ниже подробно описан состав используемых в экспериментах питательных сред (г/л):

LB: триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5.

MSM: малат натрия (яблочная кислота) – 5; K₂HPO₄ – 0.4; KH₂PO₄ – 0.4; NaCl – 0.1; NH₄Cl – 1; Na₂MoO₄ × 2H₂O – 0.002; FeSO₄ в нитрил-3-уксусной кислоте (FeNTA, 0.17% раствор) – 10 мл [76]. После автоклавирования в MSM добавляли стерильные растворы MgSO₄×7H₂O и CaCl₂. Конечная концентрация данных элементов в среде составляла 0.2 и 0.02 г/л, соответственно.

Показатель pH для LB и MSM доводили до оптимального значения 6.8–7.0 на цифровом pH-метре METTLER TOLEDO 320 (Испания).

Концентрация Васто-агара в плотных средах составляла 20 г/л, а в полужидких – 4–6 г/л.

В обе среды, в случае мутантных штаммов, добавляли антибиотики – канамицин (Km) до концентрации 50 мкг/мл и/или тетрациклин (Tc) до концентрации 25 мкг/мл. Присутствие Tc в питательной среде, обеспечивает стабильную поддержку pRK415 и ее производных в бактериях. Также при необходимости в LB и MSM добавляли прижизненный флуоресцентный краситель калькофлуор (Fluorescent Brightener 28) до концентрации 0.5 или 1 мг/мл и прижизненный краситель конго красный («Sigma–Aldrich», США) до концентрации 37.5 мкг/мл.

Бактериальные культуры азоспирилл выращивали при температуре 28°C или 30°C в стационарных условиях в термостате без покачивания или при постоянном покачивании (140 об/мин) на платформе шейкера-инкубатора Excella E-24/24 R («New Brunswick Scientific», США).

2.3 Определение скорости роста бактерий в условиях аэрации

Оптимальные условия для образования биопленок бактериями *A. baldaniorum* Sp245^T были подобраны ранее [79]. В конические колбы со 100 мл стерильной питательной среды MSM или LB добавляли ночные (18-ч) культуры бактерий до получения значения оптической плотности $A_{590} = 0.05\text{--}0.10$ ($l = 0.5$ см). Для обеспечения более интенсивного доступа кислорода колбы размещали на горизонтальной поверхности шейкера-инкубатора Excella E-24/24 R («New Brunswick Scientific», США) и выращивали при температуре 30°C, покачивая при 140 об/мин. Оптическую плотность культуры бактерий измеряли каждые 2 ч при A_{590} ($l = 0.5$ см) на фотоколориметре КФК-2 («Загорский оптико-механический завод», Россия).

Основываясь на полученных данных, строили кривую роста бактерий, отображающую зависимость оптической плотности от времени инкубирования.

2.4 Определение относительной гидрофобности бактерий

Относительную гидрофобность поверхности клеток азоспирилл определяли методом высаливания в полистирольных планшетах для иммуноферментного анализа (ИФА). Суть метода заключается в осаждении бактерий солями [255]. Данная методика подробно описана в работе [85]; есть несколько основополагающих этапов. Сначала ночные клетки бульонных культур (18-ч) отделяли 2 мМ фосфатным буфером (ФБ; pH 7.0) от MSM или LB, в которых они культивировались. В лунки планшета добавляли по 25 мкл серийных разведений раствора сульфата аммония ((NH₄)₂SO₄) в 2 мМ ФБ. Затем ночную культуру суспендировали в том же ФБ, которым отделяли от

питательной среды, и вносили в лунки полистирольного планшета по 25 мкл ($A_{590} = 1.2$). Далее вычисляли минимальную концентрацию $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (в процентах), при которой наблюдалась агрегация бактерий. Регистрировали следующую зависимость: чем ниже концентрация сульфата аммония, тем больше гидрофобность у агрегирующих клеток [255].

2.5 Выделение ЛПС и характеристика их жирнокислотного состава

Препараты ЛПС получали следующим способом: клетки азоспирилл 18 ч культивировали в жидкой MSM, затем отделяли от капсулы, выделяли растворением горячим водным фенолом и обрабатывали ацетоном. Согласно методике, описанной в работах [72, 85] в препаратах ЛПС анализировали соотношение содержания углеводов, белков и нуклеиновых кислот. Состав липида А определяли с помощью газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) метиловых эфиров жирных кислот (ЖК) на газовом хроматографе GC-2010 («Shimadzu», Япония) с использованием капиллярной колонки Equity-1 («Supelco», США). Метилирование осуществляли согласно методике [280]. Для выявления ЖК в препаратах использовали стандартную смесь метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) для бактерий. Сумма площадей пиков всех МЭЖК, идентифицированных с помощью хроматографии (в процентах), и есть показатель относительного содержания МЭЖК.

2.6 Изучение подвижности бактерий

Препарат «висячая капля» готовили на предметном стекле из суспензии ночных (18-ч) культур клеток азоспирилл ($A_{590} = 0.5$), выращенных в жидкой среде. Препараты исследовали на просвечивающем фазово-контрастном микроскопе Jenaval («Jena», Германия). В поле зрения микроскопа изучали подвижность всех бактерий, выращенных в бульоне и на полужидких питательных средах.

Скорость и направление движения клеток определяли с помощью

световой микроскопии. Видео записывали на камеру DCR-TRV900E («SONY», Япония). Полученные файлы с видеоизображениями были проанализированы способом, описанным в работе [78]. Положение клетки в декартовых координатах в покадровом режиме отслеживали с помощью компьютерной программы, созданной в ИБФРМ РАН [80]. Для анализа подвижности бактерий на агаризованных средах 42-ч культуры азоспирилл, выращенные на плотной питательной среде, точно инокулировали в полужидкий агар на чашках Петри. Морфологию зон распространения бактерий определяли визуально.

2.7 Оценка накопления биомассы в биопленках и роста планктонных культур в статических условиях

Ночные культуры бактерий (18-ч), выращенные в жидкой LB или MSM, разводили соответствующей свежей стерильной питательной средой до значений $A_{590} = 0.05-0.10$ ($l = 0.5$ см) и анализировали процесс образования биопленок, формируемых на границе между жидкостью и твердой фазой, на разных типах поверхности (гидрофобной или гидрофильной) и в различных условиях культивирования. Для этого взвесь бактерий по 200 мкл вносили в лунки полистирольных планшетов и по 2 мл в стеклянные пробирки объемом 5 мл. Также по 4 мл суспензии добавляли в полистирольные чашки Петри диаметром 30 мм со стерильными покровными стеклами размером 24×24 мм на дне.

Планшеты для ИФА, пробирки и чашки Петри с бактериальными культурами инкубировали стационарно при 30°C до 6 суток и более. Еще в одной серии экспериментов суспензию бактерий в стеклянных пробирках также инкубировали в течение 6 дней, но при постоянном, равномерном покачивании на горизонтальной поверхности шейкера-инкубатора Excella E24 со скоростью 140 об/мин (New Brunswick Scientific, США) [84].

Чтобы оценить относительное количество биомассы в биопленках, после инкубирования их окрашивали 1%-м водным раствором красителя кристаллический фиолетовый [309]. Сначала из пробирок или лунок планшета осторожно стерильно отбирали планктонные культуры, окружающие биопленки, и добавляли 2 мл или, соответственно, 200 мкл красителя. Далее оставляли на 10 мин при комнатной температуре, чтобы кристаллический фиолетовый связался с биомассой биопленок. Затем раствор удаляли, и пробирки дважды осторожно ополаскивали от лишнего красителя дистиллированной водой. Затем связавшийся с биопленками кристаллический фиолетовый элюировали в 2 мл или 200 мкл этанола, соответственно [85]. Оптическую плотность полученного раствора через 5 мин измеряли на фотоколориметре КФК-2 («Загорский оптико-механический завод», Россия) или фотометре микропланшетного формата MultiskanAscent («ThermoLabsystems», Финляндия) при A_{590} ($l = 0.5$ см).

Также измеряли оптическую плотность планктонных культур, отобранных из пробирок (A_{590} ($l = 0.5$ см)), и модифицированным методом [270] определяли степень агрегации клеток в питательной среде вокруг биопленок.

Была проведена еще одна серия экспериментов, в которой биопленки сначала ополаскивали дистиллированной водой, затем на 30 мин оставляли в растворе калькофлуора (50 мкг/мл) или конго красного (37.5 мкг/мл) и еще раз промывали дистиллированной водой.

На покровных стеклах со дна полистирольных чашек Петри формировались биопленки. Из этих чашек Петри отбирали планктонную культуру и изучали методами фазово-контрастной, флуоресцентной и просвечивающей электронной микроскопии. Исследование биопленок и отдельных клеток проводили с помощью оборудования Цетра коллективного пользования «Симбиоз» ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия) – на микроскопах Leica DM6000 B («Leica-Microsystems», Германия) и Libra 120 («Carl Zeiss», Германия). Проведение эксперимента описано в работе [83].

2.8 Определение степени агрегации клеток планктонных культур в среде, окружающей биопленки

Культуры азоспирилл 18 ч выращивали в жидкой LB или MSM, после чего разводили стерильной LB или MSM до значений $A_{590} = 0.05-0.10$ ($l = 0.5$ см). Далее культуру с определенной оптической плотностью по 2 мл вносили в стеклянные пробирки (объем пробирки – 5 мл) и выдерживали при 30°C в течение 6 суток. Степень агрегации планктонных культур, отобранных из пробирок, определяли модифицированным методом [270]. Жидкую культуру бактерий отстаивали полчаса на воздухе, затем очень осторожно отбирали супернатант, а осевшие клеточные агрегаты разбивали 50 мМ ФБ (рН 7.0). Полученную взвесь азоспирилл отстаивали в течение 2 ч и измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости. Далее бактерии 2 мин диспергировали на магнитной мешалке и снова измеряли оптическую плотность суспензии. Агрегацию клеток (в процентах) определяли по следующей формуле: $A = [((A_{590})_2 - (A_{590})_1) / (A_{590})_2] \times 100\%$, где $(A_{590})_1$ – оптическая плотность супернатанта, полученного после оседания клеточных агрегатов, а $(A_{590})_2$ – оптическая плотность суспензии, полученной после диспергирования осажденных агрегатов бактерий [85].

2.9 Определение гемагглютинирующей активности бактерий в биопленках

Подход, использованный для анализа гемагглютинирующей активности, описан нами в работе [85]. Сначала культуру азоспирилл 6 суток выращивали в стеклянных пробирках. Затем планктонные бактерии стерильно удаляли, а оставшиеся биопленки споласкивали 50 мМ фосфатно-солевым буфером (ФСБ; рН 7.0) и элюировали с помощью дозатора в этом же буфере. Полученную суспензию клеток ($A_{590} = 0.5$) раскапывали в лунки полистирольных планшетов по 50 мкл и делали серию их двукратных разведений в ФСБ. Далее к разведениям добавляли по 50 мкл 2%-й взвеси трипсинизированных эритроцитов кролика в ФСБ, выдерживали 18 ч при 4°C и

определяли титр гемагглютинации. Реакцию клеток считали положительной при наличии на дне лунки осадка эритроцитов неправильной формы (похож на перевернутый зонтик).

2.10 Иммунохимические реакции: ИФА и двойная иммунодиффузия

В течение 6 суток биопленки культивировали в полистирольных планшетах для ИФА, а затем из лунок отбирали планктонную культуру. Биомассу биопленок, экстракты матрикса и препараты ЛПС использовали для проведения твердофазного непрямого ИФА. Водные растворы ЛПС или матрикс по 5 и 50 мкг/мл, соответственно, вносили в лунки планшетов, выдерживали 12 ч при 4°C, после чего удаляли. При необходимости, закрепившиеся на стенках лунок планшетов биопленки или препараты ЛПС, обрабатывали периодатом натрия. Свободные сайты на поверхности полистирола блокировали следующим способом: в лунки вносили по 100 мкл 0.05% водного раствора полиэтиленгликоля 2000 и оставляли на 40 мин. Далее эксперимент проводили по методике [79]. Антигены выявляли с помощью антител (Ат) кролика на ЛПС штамма *A. baldaniorum* Sp245^T [48]; титр составлял 50 мкг/мл. В качестве вторичных использовали Ат козы антикроличьи, конъюгированные с пероксидазой хрена («Sigma», США); титр составлял 1 мкг/мл. Для определения пероксидазной активности использовали раствор 0.03% о-фенилендиамина и 0.02% перекиси водорода, разведенной в 0.1 М натрий-цитратном буфере (рН 4.5). Методика описана нами в работе [83]. Величину оптической плотности (A_{490}) анализируемых образцов измеряли с помощью фотометра Multiskan Ascent («ThermoLabsystems», Финляндия) в Центре коллективного пользования «Симбиоз» ИБФРМ РАН (г. Саратов, Россия).

Двойную иммунодиффузию проводили в 1%-ых агарозных гелях по стандартной методике с образованием линий преципитации. Гели окрашивали красителем Кумасси R-250.

2.11 Обработка биопленок периодатом натрия и протеазами

Для подтверждения структурной роли белков в образовании матрикса использовали протеиназу и трипсин, а для выявления полисахаридов биопленки обрабатывали периодатом натрия. Биопленки инкубировали 6 суток. 40 мМ периодат натрия (NaIO_4) разводили в дистиллированной воде, а трипсин (Thermo Scientific, Финляндия) и проназу (Amresco, США) – в 100 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.5) до концентрации 1000 мкг/мл. Ферменты разводили 50 мМ ФБ (pH 7.0) и добавляли к биопленкам в соотношении 1:9. Проназу выдерживали 2 ч при 37°C. Фракции ферментов или NaIO_4 добавляли в стеклянные пробирки общим объемом 5 мл и полистирольные планшеты для ИФА с выращенными биопленкам по 2 мл и по 200 мкл, соответственно. Перед этим осторожно удаляли планктонную культуру. Пробирки и планшеты с ферментами или периодатом натрия инкубировали 2 ч при 37°C. Среду с планктонными бактериальными клетками предварительно удаляли в стерильных условиях.

В контрольных образцах использовали ФБ (pH 7.0) без добавления ферментов. Выдерживали 23 ч при 4°C с NaIO_4 . Контролем выступала дистиллированная вода с 40 мМ NaIO_4 и 40 мМ глюкозы. Биопленки с покровных стекол и препараты ЛПС со стенок лунок планшетов также обрабатывали протеазами и NaIO_4 [83].

После инкубации биопленки окрашивали 1%-м раствором кристаллического фиолетового и два раза ополаскивали дистиллированной водой. Далее краситель элюировали в этаноле (1:1) и определяли оптическую плотность как описано в разделе 2.7. Таким способом оценивали целостность биопленки.

Результаты выражали в процентах относительно контрольных образцов.

2.12 Анализ углеводсодержащих и белковых компонентов, содержащихся в матриксе биопленок

Выделение компонентов матрикса проводили методом, описанным коллегами [391]. Планктонную культуру удаляли, после чего биомассу зрелых биопленок, образованных на поверхности стекла, ополаскивали 50 мМ ФБ (рН 7.0) и элюировали с помощью дозатора этим же буфером. Далее биомассу центрифугировали и изучали перешедшие в супернатант легко смываемые компоненты (ФБ-«экстракты»). Таким образом поступали три раза, чтобы собрать надосадочную жидкость. Затем из отмытой биомассы с помощью 0.5 М этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) осуществляли экстракцию более прочно связанных составляющих матрикса (ЭДТА-«экстракты»). В полученных ФБ-«экстрактах» и ЭДТА-«экстрактах» содержание углеводсодержащих и белковых компонентов определяли в первом случае фенол-серным методом, а во втором – реакцией по Бредфорду [391]. Данная методика подробно описана нами в работе [74].

2.13 Абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия

С помощью спектроскопии проводили анализ биомассы зрелых биопленок, сформированных в пробирках на поверхности стекла. Данное исследование описано нами в работе [83]. В питательные среды добавляли витальные красители калькофлуор или конго красный. Планктонную культуру отбирали и ополаскивали биопленки 50 мМ ФБ (рН 7.0). Затем их элюировали, промывали три раза и доводили тем же буфером до значений $A_{590} = 0.2-0.5$ ($l = 1.0$ см). Для контрольных спектров использовали растворы калькофлуора в концентрации 50 мкг/мл и конго красного с титром 12.5 мкг/мл, растворенные в ФБ. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре SPECORD 40 («Analytik Jena», Германия) в кварцевых кюветах ($l = 1.0$ см). С помощью спектрофлуориметра Agilent Cary Eclipse (США) в флуориметрической кювете

($l = 1.0$ см) осуществляли флуоресцентную спектроскопию. Полоса пропускания для эмиссии составляла 2 нм. Флуоресценцию спектров эмиссии возбуждали $\lambda_{exc} = 365$ нм. Эта длина волны соответствует типичному режиму возбуждения калькофлуора, применяемому во флуоресцентной микроскопии бактерий и других микроорганизмов, окрашенных данным красителем.

2.14 Изучение клеток азоспирилл и биопленок с помощью методов микроскопии

2.14.1 Фазово-контрастная микроскопия биопленок

Толщину (высоту) биопленок измеряли с помощью световой фазово-контрастной микроскопии на приборе Leica DM6000 B («Leica-Microsystems», Германия). Согласно стандартной методике на предметное стекло с лункой помещали покровное стекло биопленкой вниз. Сначала в объективе микроскопа находили «нижнюю часть» биопленки и отмечали фокусное расстояние Z_1 (в мкм). Затем определяли фокусное расстояние до ее «верхней части» – Z_2 . По формуле определяли толщину пленок: $Z = (Z_2 - Z_1) \times (n/n_1)$, где n – показатель преломления стекла, составляющий 1.5; n_1 – показатель преломления воздуха, равный 1.0. Подход описан нами в работе [82].

2.14.2 Атомно-силовая микроскопия биопленок

Поверхность биопленок исследовали на атомно-силовом микроскопе SolverBio («НТ-МДТ», Россия). Препараты для атомно-силовой микроскопии (АСМ) подготавливали следующим образом: промывали 50 мМ ФБ (рН 7.0) бактериальные клетки биопленки, образованной на покровном стекле; на 10 мин оставляли в 75%-ом этаноле для удаления воды; высушивали на воздухе. Биообразцы исследовали полуконтактным сканированием поверхности с помощью кремниевых кантилеверов NSG 10 («НТ-МДТ», Россия) с модулем жесткости 11.8 Н/м и средним радиусом закругления острия 10 нм. При данном способе сканирования кантилевер практически не касается поверхности

образцов во время колебаний, сохраняя их целостность. Фазы колебаний кантилевера меняются в зависимости от взаимного расположения бактерий и матрикса, их размеров и способности к адгезии. Границы зоны сканирования равнялись 60×60 мкм, максимальное разрешение составляло 1024×1024 точки, а частота – 1 Гц. АСМ осуществляли на воздухе при комнатной температуре. Обработка полученных изображений выполняли с использованием программного комплекса NOVA («НТ-МДТ», Россия), что способствовало увеличению контрастности образцов и позволяло не учитывать влияние наклона поверхности объекта относительно зонда [82].

2.14.3 Просвечивающая электронная микроскопия бактерий из жидких культур, фрагментов биопленок и суспензий их биомассы

Просвечивающая электронная микроскопия позволяет изучать объемные образцы с максимальным размером 3 мм и толщиной не более 0.2 мкм, а толщина исследуемой области составляет не более 50-70 нм согласно подходу, описанному нами в работе [82]. Для приготовления препаратов на первом этапе удаляли планктонную культуру из биопленок, сформированных на поверхности пробирок или покровных стекол со дна полистирольных чашек Петри диаметром 30 мм. Затем биопленки два раза осторожно ополаскивали 50 Мм ФБ (рН 7.0), элюировали и суспендировали в ФБ (рН 7.0). Далее полученные смывы или ночные (18-ч) жидкие культуры использовались непосредственно для подготовки препаратов просвечивающей электронной микроскопии – бактерии наносили на формваровые ультратонкие пленки-подложки. Формваровая пленка нетоксична и быстро растворяется, не оказывая воздействия на живой объект.

Через 20 мин излишки жидкости убирали с помощью фильтровальной бумаги. Препараты сохли естественным путем на воздухе.

Электронно-микроскопический анализ образцов проводили на приборе Libra 120 («Carl Zeiss», Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ.

2.14.4 Маркировка азоспирилл агглютинином зародышей пшеницы, конъюгированным с коллоидным золотом

Для данного эксперимента использовали биопленки, сформированные на покровных стеклах, находящихся на дне полистирольных чашек Петри диаметром 30 мм. Методика описана нами в работе [83]. Фрагменты биопленок ополаскивали 50 мМ ФБ (рН 7.0) и переносили с покровных стекол на никелевые сетки с формваровой подложкой, используемые в электронной микроскопии. Клетки из планктонной культуры наносили на аналогичные подложки флотацией, то есть переносили с жидкой фазы на твердую поверхность за счет естественного прилипания бактерий. Затем сетки с биообразцами сушили и маркировали агглютинином зародышей пшеницы, конъюгированным с коллоидным золотом. Средний диаметр золотых частиц равнялся 15 нм (АЗП-К315). Любезно предоставленный д.б.н. Богатыревым В.А. (лаборатория нанобиотехнологии ИБФРМ РАН, Саратов) АЗП-К315 получали способом, описанным в работе [23]. Сначала подготовленные сетки 20 мин выдерживали на капле ФБ с 0.02% Twin-20, после чего на 30 мин переносили в раствор АЗП-К315. Последующее споласкивание сетки сначала ФБ, содержащим 0.02% Twin-20, а потом бидистиллированной водой способствовало удалению избытка золота. Далее препараты высушивали и просматривали на электронном микроскопе. В контрольных образцах активные центры агглютина предварительно в течение 60 мин блокировали хитотриозой (олигомер *N*-ацетил- β -D-глюкозамина (*N,N',N''*-триацетилхитотриоза)), добавленной к раствору АЗП-К315 в концентрации 0.05 мг/мл. При замене хитотриозы на глюкозу изменений во взаимодействии АЗП-К315 с азоспириллами не наблюдали.

2.15 Статистическая обработка результатов

Для анализа динамики накопления биомассы в биопленках их окрашивание кристаллическим фиолетовым и измерение оптической плотности

раствора десорбированного красителя проводили 30-50 раз в каждой временной точке. В случае любого из анализируемых штаммов окрашивали биопленки из пяти стеклянных пробирок общим объемом 5 мл или из десяти лунок полистирольных планшетов для ИФА. Для количественных измерений относительного количества биомассы взяты данные не менее пяти независимых экспериментов в трех повторностях. В случае остальных анализов проводили не менее трех независимых экспериментов в двух или трех повторностях.

Статистическая обработка данных выполнена методом вариационной статистики. Достоверность различий оценивали с помощью непарного t-критерия Стьюдента с использованием платформы Microsoft Office Excel 2010. Различия считали достоверными при $P < 0.05$. Порог доверительной вероятности составлял 95%.

Результаты также обработали с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Наименее значимые различия ($LSD_{0.05}$) определяли при $p = 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Характеристика основных этапов формирования биопленок азоспириллами

Азоспириллы являются подвижными бактериями. Подвижность клеток штаммов *A. brasilense* и *A. baldaniorum* обеспечивается одиночной полярной флагеллой, которую они синтезируют на жидких и плотных средах, а также многочисленными латеральными жгутиками. Индукция синтеза Laf происходит только в случае повышения плотности окружающей среды [373, 196]. Полярная флагелла является органеллой, которую *Azospirillum* используют не только для перемещения. Fla необходим этим бактериями для закрепления на различных поверхностях, в том числе и на корнях колонизируемых азоспириллами растений [141]. Образование азоспириллами биопленок и участие в этом процессе различных компонентов поверхности клеток данных бактерий, в частности флагелл, изучены недостаточно подробно. Тем не менее, важным является тот факт, что свободно плавающие («планктонные») бактерии утрачивают зависящую от жгутиков подвижность при переходе к существованию в составе биопленки. В тоже время инактивация генов, отвечающих за подвижность, оказывает негативное влияние на формирование микробами биопленок [321, 344, 384, 193]. В работе в качестве главного объекта исследования выбран типовой штамм *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T – модельный штамм для исследований ассоциативных растительно-микробных взаимодействий [102, 97] и его производные с нарушениями в образовании и функционировании флагелл.

Флагеллы интегрированы в матрикс и способствуют поддержанию архитектуры бактериальных биопленок, зависящей от многих показателей, таких как механические свойства окружающей среды, концентрация доступных питательных соединений, подвижность микроорганизмов, видовой состав биопленочной популяции бактерий и их коммуникация друг с другом [174, 259, 132]. Сравнительный анализ образования пленок штаммом *A. baldaniorum*

Sp245^T и его мутантами интересен в контексте выявления индивидуальных (характерных для азоспирилл) и универсальных механизмов, обеспечивающих формирование сложной архитектуры биопленочных сообществ.

В связи с этим, на начальном этапе исследований была поставлена задача – охарактеризовать основные стадии формирования биопленок и сравнить, как данный процесс происходит у штамма *A. baldaniorum* Sp245^T и его инсерционного *flhB1* мутанта, потерявшего способность синтезировать полярный и латеральные жгутики.

3.1.1 Исследование динамики формирования биопленок штаммом *A.*

baldaniorum Sp245^T и его *flhB1* мутантом

С помощью окрашивания бактерий кристаллическим фиолетовым и методов микроскопии проанализировали и сравнили процесс формирования пленок исследуемых штаммов на границе раздела жидкость (жидкая питательная среда) – стекло (гидрофильная поверхность) в стационарных условиях выращивания.

При инкубировании бактерий штаммов *A. baldaniorum* Sp245^T и Sp245.1063 в жидкой LB на протяжении 24 ч на стенках пробирок наблюдалось образование тонких пленок. С помощью микроскопии на данном этапе удалось обнаружить разрозненные клеточные агрегаты, которые можно было легко смыть при ополаскивании поверхности стеклянных пробирок водой. На 2-е сутки количество биомассы азоспирилл, закрепившихся на поверхности стекла, возросло (рисунок 2а).

После 2-х дней культивирования в биопленках Sp245^T наблюдалось повышение количества биомассы примерно в 1.5 раза по сравнению с суточными значениями, характерными для этого штамма (рисунок 2а). На 2-3 сутки стабилизировалась биомасса бактерий, зафиксировавшихся на поверхности стекла. В этот период культивирования значимых различий между родительским штаммом и мутантом Sp245.1063, лишенным жгутиков, не наблюдалось (рисунок 2).

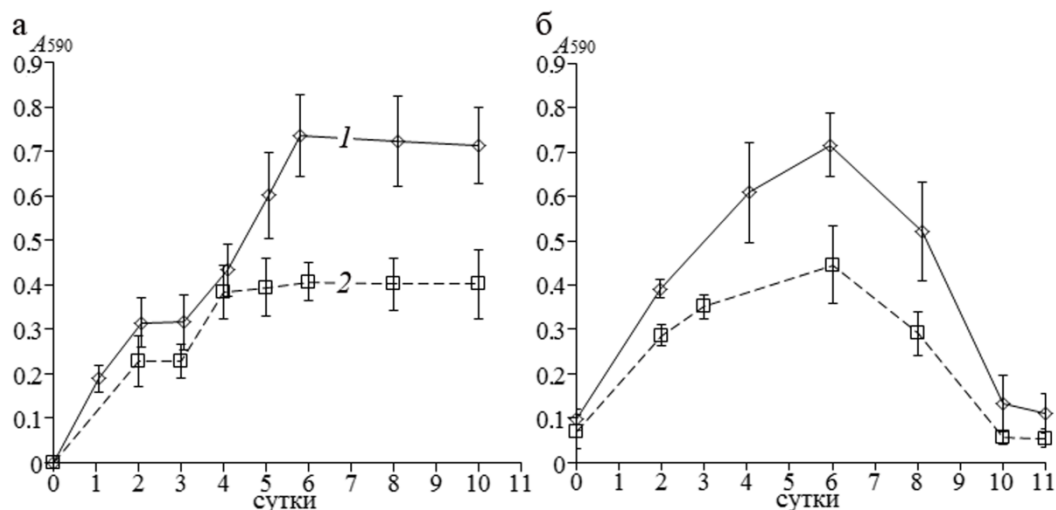


Рисунок 2 – Анализ накопления биомассы в биопленках, образованных *A. baldaniorum* Sp245^T (1) и Sp245.1063 (2) на гидрофильной поверхности (а), и изменения плотности планктонных культур (б) этих штаммов. Бактерии культивировали в жидкой среде LB в стационарных условиях. A_{590} – оптическая плотность кристаллического фиолетового, иллюстрированного из окрашенных пленок (а), или оптическая плотность планктонных культур (б). Доверительные интервалы для средних значений определяли на уровне значимости 95%.

Очевидно, на данном временном интервале заканчивался процесс адгезии бактерий на поверхности пробирок. К 3-м суткам инкубации в результате соединения бактериальных микроколоний происходило формирование пленки с более ровной поверхностью, начинался прирост биомассы. К 4-5 суткам культивирования в случае мутанта количество биомассы в пленке стабилизировалось и далее не менялось (рисунок 2). В биопленках, образованных родительским штаммом, количество биомассы стабилизировалось позже – после 6 дней инкубации (рисунок 2).

Фазовоконтрастная микроскопия показала, что за 6 суток культивирования родительского штамма и мутанта в жидкой LB эти штаммы образуют биопленки высотой 33.7 ± 3.5 и 23.7 ± 2.5 мкм, соответственно. Толщина биопленок Sp245.1063 составляет $(70.3 \pm 7.5)\%$ от этого показателя, характерного для Sp245^T. Необходимо заметить, что при окрашивании кристаллическим фиолетовым (определяли относительное количество

биомассы биопленок) 6-суточных пленок оптическая плотность красителя, десорбированного из биопленок мутанта, составляла $(58.6 \pm 4.4)\%$ от показателя, характерного для *Sp245^T* (рисунок 2а). Таким образом, результаты измерений толщины и количества биомассы биопленок хорошо согласовывались.

Итак, используя *A. baldaniorum Sp245^T* и его мутант, лишенный жгутиков, мы рассмотрели динамику образования азоспириллами биопленки. Удалось показать, что в стационарных условиях на границе раздела жидкость – твердая поверхность процесс формирования пленок протекает в несколько этапов: адсорбция, адгезия, прирост и стабилизация биомассы.

Возможно, что прикрепление и адгезия азоспирилл на гидрофильной поверхности стекла протекают вне зависимости от способности бактерий синтезировать флагеллы. Например, к 3-м суткам культивирования *Sp245.1063* биомасса клеток, закрепившихся на стекле, существенно не отличалась от показателей родительского штамма (рисунок 2). После 4-х суток инкубации показатели биомассы пленок *Sp245.1063* уже существенно уступали значениям, характерным для родительского штамма.

Оптическая плотность планктонных культур *Sp245^T* и *Sp245.1063* при сохранении толщины биопленок у этих штаммов начинала снижаться на 8-е сутки культивирования (рисунок 2б). Планктонная культура мутанта уже на 2-3 сутки отставала в росте от *Sp245^T*. Пленки *Sp245.1063* продолжали сохранять толщину, близкую к таковой у *Sp245^T* до 4-х суток инкубации (рисунок 2а). Вероятно, клетки мутанта, лишенного жгутиков, оседали на разделе твердой и жидкой среды, но легко смывались при окрашивании биопленок. С 5-го дня культивирования толщина пленок *Sp245.1063* была уже значительно меньше, чем у родительского штамма *Sp245^T* (рисунок 2).

Следует отметить, что скорость роста в жидких средах LB или MSM у *Sp245^T* и *Sp245.1063* в условиях интенсивного перемешивания была практически одинаковой. В богатой среде LB оптическая плотность культуры *Sp245^T* снижалась и была меньше, чем у *Sp245.1063* после 48 ч

культивирования. Возможно, это связано с флокуляцией бактерий, которая у родительского штамма была выражена в большей степени.

Результаты анализа динамики формирования азоспириллами биопленок, представленные на рисунке 2, позволяют заключить, что на начало этапа прироста толщины биопленок Sp245^T и Sp245.1063 не влияли различия в росте планктонных культур этих штаммов. Этот этап начинался с 3-х суток инкубации после того, как количество биомассы азоспирилл, зафиксировавшихся на твердой поверхности, становилось стабильным (рисунок 2а). Необходимо отметить, что на 2-3 день культивирования в жидкой среде значительных различий в толщине пленок исследуемых штаммов азоспирилл не наблюдалось (рисунок 2). Вероятно, начало этапа прироста биомассы биопленок у *Azospirillum* в значительной степени определяется плотностью популяции микробов, закрепившихся на субстрате, независимо от скорости роста планктонных клеток, обитающих в окружающей пленки жидкой среде. Дальнейшее развитие биопленок обуславливают поверхностные структуры бактериальных клеток. Примером, иллюстрирующим это предположение, являются результаты сравнительного анализа динамики формирования биопленок штаммом Sp245^T и его мутантом, лишенным жгутиков.

3.1.2 Характеристика *A. baldaniorum* Sp245^T и мутанта Sp245.1063 с применением фазово-контрастной микроскопии

Изучение поведения 18-ч жидких культур Sp245^T и Sp245.1063 позволило выявить разницу в поведении бактерий. В жидкой среде подвижные бактерии штамма Sp245^T образовывали клеточные агрегаты (рисунок 3). Вследствие аэротаксиса, число таких агрегатов в зоне наибольшей концентрации подвижных клеток через 10-15 мин быстро увеличивалось (рисунок 3). Клетки мутанта Sp245.1063 утратили двигательные органеллы и не могли быстро агрегировать. Можно отметить, что пленки родительского штамма к 4-6 суткам состояли из компактно примыкающих друг к другу клеток, а в случае

Sp245.1063 биопленки образовывали бактерии с разреженным расположением (рисунок 3).

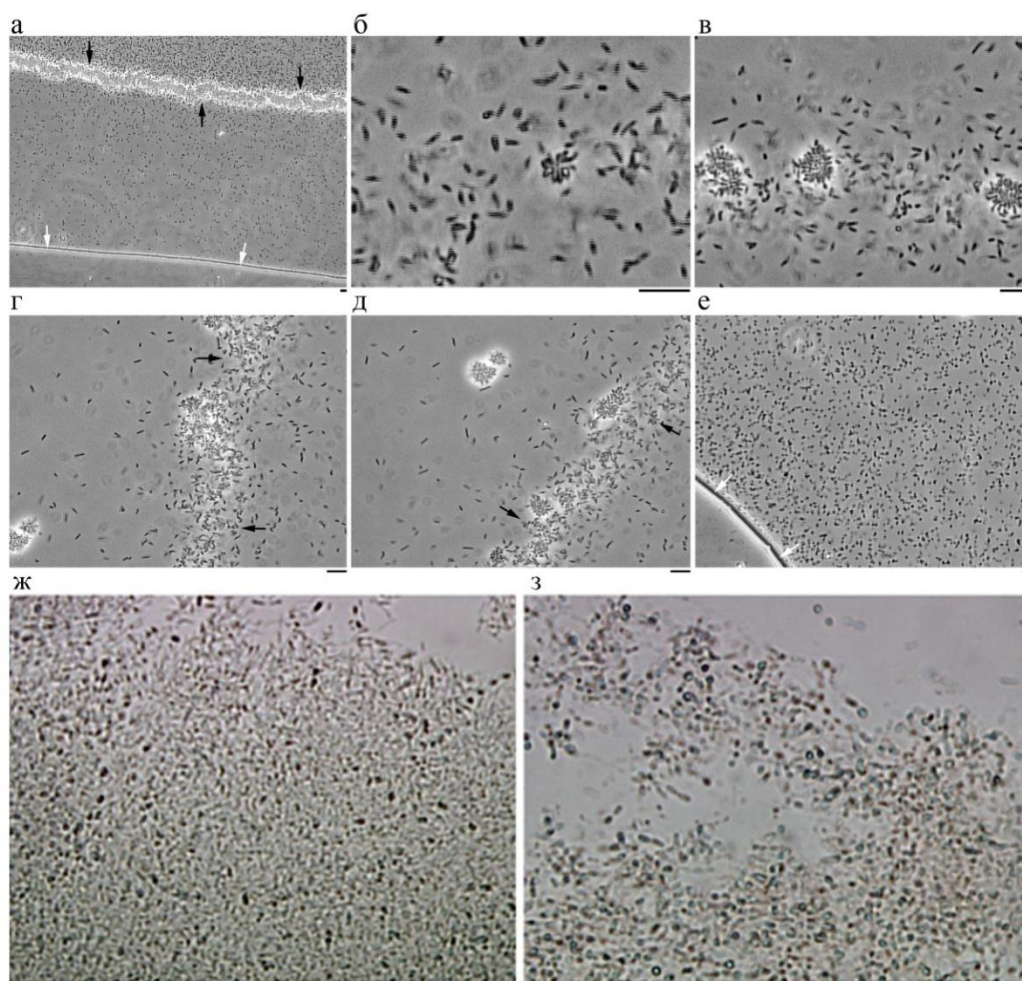


Рисунок 3 – Фазово-контрастная микроскопия 18-ч жидких культур (а-е) и выращенных на стекле 6-суточных биопленок (ж, з) *A. brasilense* Sp245^T (а-д, ж) и Sp245.1063 (е, з) спустя 1 (б), 5 (в), 10 (г, д) и 15 мин (а, е) после приготовления препарата для микроскопии. Среда культивирования – LB. Черными стрелками обозначена область максимального сосредоточения подвижных клеток недалеко от отмеченной белыми стрелками границы раздела жидкость/воздух. Масштаб – 10 мкм.

Полярная флагелла *A. baldaniorum* Sp245^T покрыта полисахаридной оболочкой, антигенные детерминанты которой идентичны ЛПС детерминантам [10]. Присутствующий на поверхности клеток этого штамма гемагглютинин, обладает сродством к О-полисахариду ЛПС Sp245^T [80]. Следовательно, взаимодействие полярного жгутика с гемагглютинином могло оказывать

содействие процессу агрегации клеток. Скорее всего, взаимодействия между бактериями, опосредованные флагой, осуществляются на начальных этапах формирования биопленок. Остается невыясненным вопрос, сохранялся ли жгутик у клеток биопленки на этапах прироста и стабилизации ее биомассы. Для того чтобы ответить на данный вопрос, прибегли к АСМ.

3.1.3 Просвечивающая электронная и сканирующая атомно-силовая микроскопия биопленок *A. baldaniorum* Sp245^T и Sp245.1063

Анализ изменения микроструктуры формирующейся биопленки показал, что к 4-6 суткам инкубации внешний слой пленки Sp245^T состоял из прилегающих друг к другу кластеров бактерий (рисунок 4а). Каждый кластер был образован в среднем из пяти (5 ± 1) клеток, соприкасающихся друг с другом вдоль своей длинной оси. В случае биопленок Sp245.1063 расположение клеток было разреженным.

С помощью АСМ в биопленках были обнаружены клетки родительского штамма, на полюсе которых находился филамент, сходный с полярной флагой (рисунок 4б-г). Изображения жгутиков на клетках в/из биопленок показаны на рисунках 4 и 5 (а-в). Для получения иллюстративного материала использовали результаты атомно-силовой микроскопии нативных биопленок и электронной микроскопии смывов со стекла клеток биопленок.

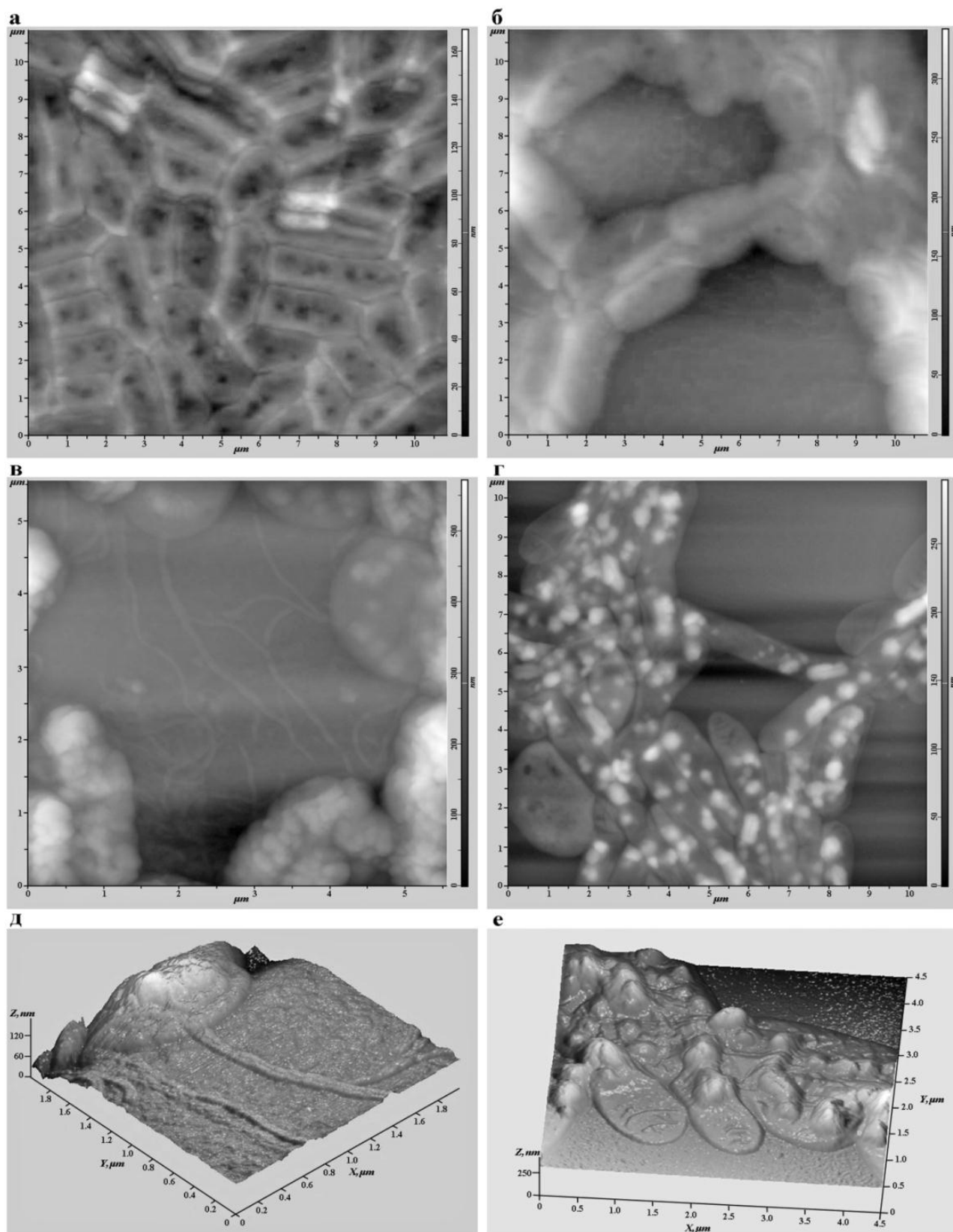


Рисунок 4 – Биопленки *A. baldaniorum* Sp245^T (а-в, д) и Sp245.1063 (г, е), сформированные на стекле под жидкой LB за 6 суток культивирования. Рисунки получены с применением атомно-силовой микроскопии. Изображения (д, е) получены методом квазитрехмерной реконструкции.

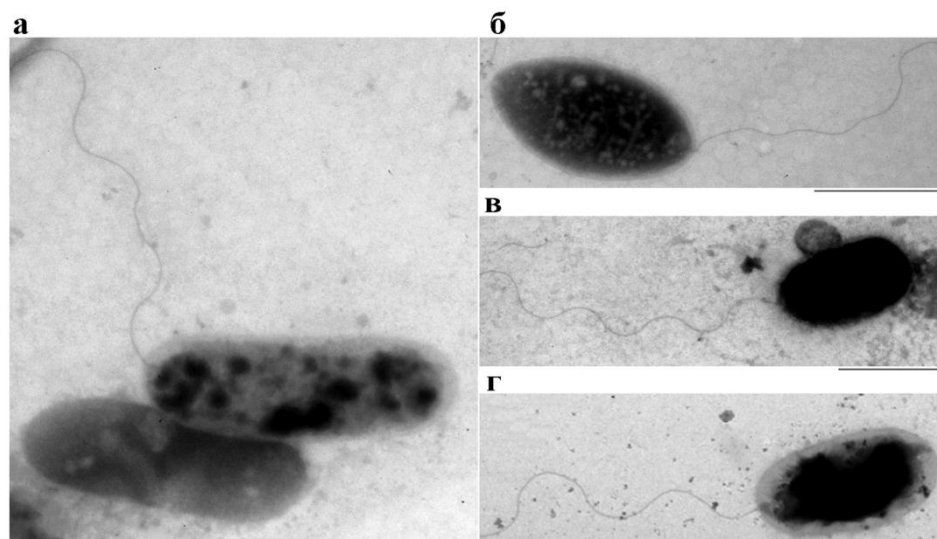


Рисунок 5 – Результаты просвечивающей электронной микроскопии *A. baldaniorum* Sp245^T из 6- (а) и 8- (б, в) суточных биопленок, смытых с поверхности стекла, или из 18-ч жидких культур (г). Среда культивирования – LB (а, в) или MSM (б, г). Масштаб – 1 мкм.

Сравнение изображений позволило выявить сходство морфологии флагелл и их расположения на клетках как из биопленок, так и из планктонной 18-ч культуры Sp245^T (рисунок 5г). Необходимо отметить, что в фиксированных нативных биопленках этого штамма при АСМ клетки с полярным жгутиком находились в тесном контакте с бактериями, образующими пленку (рисунок 4в). Эти наблюдения позволили сделать заключение, что особи с полярным жгутиком интегрированы в биопленку.

Для атомно-силовой или электронной микроскопии материал нативных и смытых с поверхности стекла биопленок отбирали на этапе прироста биомассы (через 4-5 суток инкубации) пленок, а также из зрелых биопленок (через 6 и более суток) (рисунки 2, 4, 5).

Во всех отобранных образцах *A. baldaniorum* Sp245^T обнаружены клетки с филаментом полярной флагеллы, из чего следует, что ее синтез происходит не только на этапе прироста биомассы биопленок, но также и в зрелых биопленках. Вот и получен ответ на наш вопрос.

В биопленках Fla⁻ Laf⁻-мутанта Sp245.1063 жгутики у клеток не обнаружены. Необходимо отметить, что клетки из биопленок родительского

Fla⁺ Laf⁺–штамма, как и в случае Fla⁻ Laf⁻–мутанта, не имели латеральных жгутиков. Вероятно, присутствие функционирующей полярной флагеллы в поверхностном слое жидкости позволяет клеткам родительского штамма формировать на стекле пленку без затрат энергии для синтеза латеральных жгутиков. Также стоит отметить, что азоспириллы способны перемещаться, используя способ альтернативной коллективной подвижности с образованием микроколоний [77] и других внеклеточных органелл (гипотетических tad-пилей) [396].

Анализ литературы показывает, что микроорганизмам при формировании биопленок необходимо прикрепление к субстрату. Данный процесс опосредуют, в том числе, и жгутики. Подвижность бактерий является важной составляющей, определяющей архитектуру биопленок. Способность к движению необходима микроорганизмам для высвобождения из зрелых биопленок и их миграции в поисках новых мест обитания [321, 344, 193]. Тем не менее, описано множество примеров, когда переход плавающих планктонных клеток к существованию в биопленках у многих бактерий сопровождается подавлением активности флагелл и их синтеза [321, 344, 384, 193]. Анализ полученных нами результатов показал, что бактерии *A. baldaniorum* Sp245^T, использующие полярную флагеллу для движения и адсорбции на заселяемых поверхностях, продолжают синтезировать эту двигательную органеллу, даже находясь в составе сформированной зрелой биопленки.

Таким образом, инактивация хромосомной копии гена *flhB*, кодирующего компонент жгутикового экспортного аппарата *A. baldaniorum* Sp245^T, сопровождающаяся дефектами в образовании полярного и латеральных жгутиков, оказывает негативное влияние на способность клеток штамма Sp245.1063 формировать биопленки на гидрофильной поверхности, что приводит к уменьшению толщины зрелых биопленок.

3.2 Характеристика роли полярного жгутика в биопленках *A. baldaniorum* Sp245^T

Ранее был идентифицирован неподвижный Fla⁻ Laf⁻-мутант *A. baldaniorum* Sp245^T, Sp245.1063 с одиночной инсерцией Omegon-Km [167] в кодирующую последовательность (CDS) AZOBR_150177 (предполагаемый ген *flhB1*) [40]. Как отмечено нами в разделе 3.1.1. на начальных стадиях образования биопленки штаммов Sp245^T и Sp245.1063 на стекле не различались. Однако зрелые 5-6-дневные биопленки Sp245.1063 были значительно тоньше, и биомассы в них было меньше, чем у Sp245^T.

В данном разделе исследования предпринята попытка доказать гипотезу о том, что присутствие жгутиков положительно влияет на накопление биомассы и поддержание стабильности биопленки *A. baldaniorum*. Именно поэтому свойства биопленок были изучены не только у штамма дикого типа 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 предполагаемого белка FlhB аппарата жгутикового экспорта [171]. 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 [171]). Пытаясь получить больше данных о биологической роли предполагаемой мультисенсорной HSHK-RR, кодируемой AZOBR_150176, мы подробно изучили также некоторые свойства биопленок Sp245^T (pRK415–150176) и Sp245.1063 (pRK415–150176). Чтобы исключить влияние вектора экспрессии pRK415 на свойства биопленок *A. baldaniorum*, использовались контрольные штаммы Sp245 (pRK415) и Sp245.1063 (pRK415).

3.2.1 Наличие полярного жгутика положительно влияет на накоплении биомассы в зрелых биопленках азоспирилл

На начальном этапе исследования мы сравнили биомассу в зрелых 6-дневных биопленках, сформированных в статических условиях на разделе между гидрофильной (стекло) или гидрофобной (полистирол) поверхностями и жидкими минимальной (MSM) или богатой (LB) средами (рисунок 6; таблица 2).

Таблица 2 – Формирование биопленок *A. baldaniorum* в лунках полистирольных планшетов под жидкими средами после 6 дней культивирования при 28°C

Штаммы <i>A. baldaniorum</i>	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)

Примечание: биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым, связанный краситель экстрагировали этанолом и измеряли поглощение растворов при A_{590} . Доверительные интервалы для средних значений определяли на уровне значимости 95%. Данные были обработаны ANOVA. Средние значения сгруппированы с помощью теста $LSD_{0.05}$. Разные буквы обозначают значимые различия между образцами ($p \leq 0.05$).

В различных условиях культивирования встраивание пустого вектора pRK415 или плазмиды pRK415–150176 с дополнительной копией CDS AZOBR_150176 для предполагаемого мультисенсорного HSHK-RR не влияло на способность к формированию биопленок штаммом Sp245^T (рисунок 6; таблица 2). Встраивание pRK415–150176 в мутант Sp245.1063 сопровождалось небольшим увеличением количества биомассы в 6-дневных биопленках,

выращенных на жидкой среде LB на полистироле, и не оказывало влияния на накопление биомассы биопленок в других условиях культивирования. Однако статистически значимых различий между относительным количеством биомассы в биопленках мутантов Sp245.1063 (pRK415–150176) и Sp245.1063 (pRK415) не наблюдалось (рисунок 6; таблица 2).

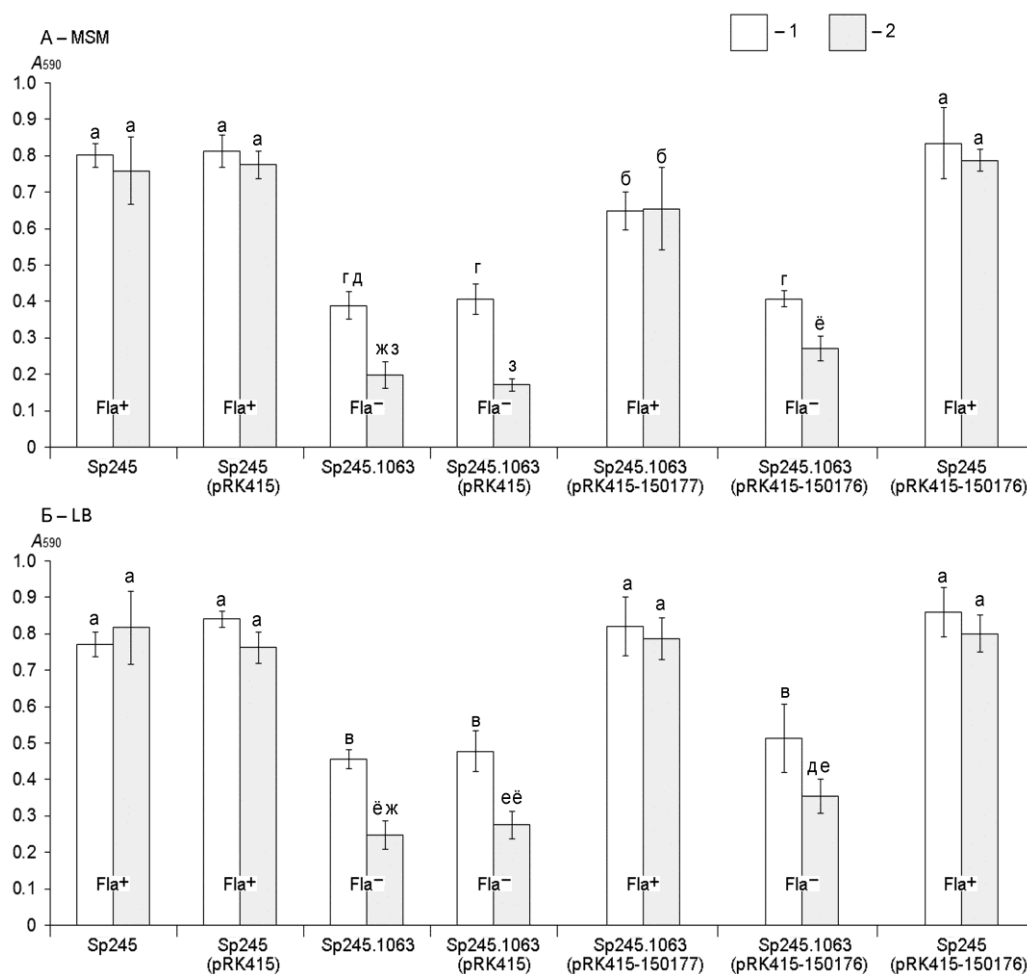


Рисунок 6 – Относительное количество биомассы в 6-дневных биопленках, образованных на поверхности стеклянных пробирок штаммами *A. baldaniorum* Sp245^T, выращенными в жидких MSM (А) и LB (Б) в стационарных условиях (1) и при встряхивании при 140 об/мин (2). Биопленки окрашивали, как описано в разделе «Материалы и методы», связанный кристаллический фиолетовый экстрагировали этанолом и измеряли значения A_{590} растворов красителя. Доверительные интервалы для средних значений определяли на уровне значимости 95%. Данные были обработаны ANOVA. Средние значения сгруппированы с помощью теста $LSD_{0,05}$. Разные буквы над столбцами обозначают значимые различия между образцами ($p \leq 0.05$).

У комплементарного мутанта Sp245.1063 (pRK415–150177) с восстановленным жгутиком и подвижностью как у дикого типа [171] существенное положительное изменение в количестве биомассы в биопленках наблюдалось в культурах, выращенных как на гидрофильных, так и на гидрофобных плотных питательных средах на бедной или богатой жидкой питательной среде. Восстановление способности накопления биомассы биопленки в 6-дневных биопленках штамма Sp245.1063 (pRK415–150177) было частичным или полным на границах раздела между твердой поверхностью и жидкой средой MSM или LB, соответственно (рисунок 6; таблица 2).

Данные, представленные в разделе 3.1, показывают, что Laf не были обнаружены на клетках в составе биопленок ни одного из исследуемых штаммов *A. baldaniorum*. Однако Fla присутствовал у большого количества клеток из биопленок штаммов Sp245^T, Sp245 (pRK415), Sp245 (pRK415–150176) и Sp245.1063 (pRK415–150177), образованных на границах раздела жидкость – твердая фаза (рисунок 7).

Соответственно, эти штаммы накапливали больше биомассы в зрелых биопленках, чем штаммы без жгутиков Sp245.1063, Sp245.1063 (pRK415) и Sp245.1063 (pRK415–150176).

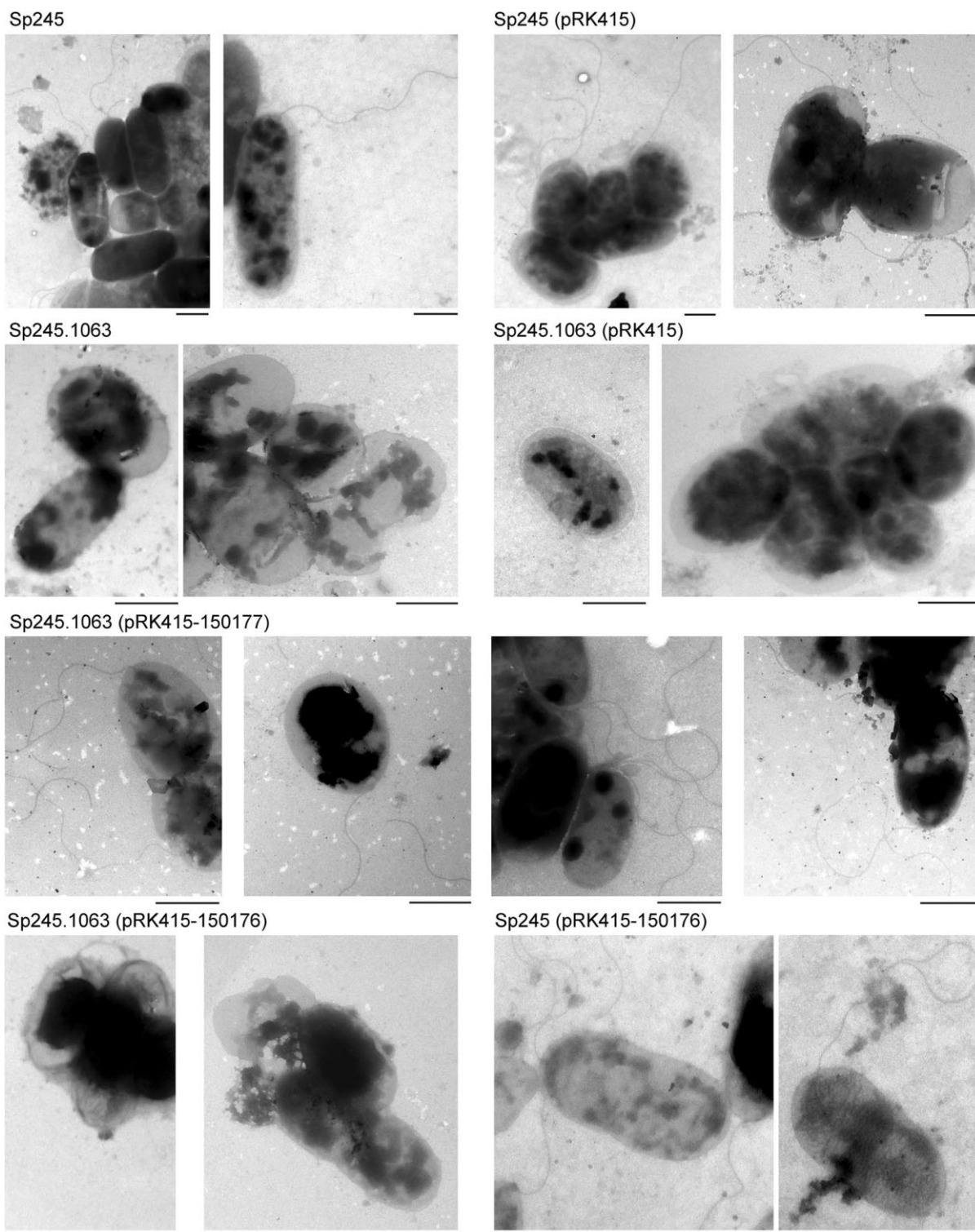


Рисунок 7 – Электронные микрофотографии клеток *A. baldaniorum* из 6-дневных биопленок, сформированных на границе раздела между жидкой питательной средой и поверхностью стекла. Полярные жгутики отчетливо видны в образцах штаммов Sp245^T, Sp245 (pRK415), Sp245.1063 (pRK415–150177) и Sp245 (pRK415–150176).

Масштаб – 1 мкм.

3.2.2 Восстановление синтеза полярного жгутика положительно влияет на формирование биопленок *A. baldaniorum* Sp245^T, находящихся в условиях гидродинамического сдвига

Мы сравнили процесс формирования биопленок изучаемых нами азоспирилл на твердой гидрофильной поверхности при выращивании пленок стационарно или в условиях интенсивного перемешивания (140 об/мин). Показано, что при использовании бедной или богатой питательных сред биопленки комплементарного мутанта Sp245.1063 (pRK415–150177), образованные на границах раздела жидкость – твердая поверхность при встряхивании (140 об/мин), содержали такое же относительное количество биомассы, как и их аналоги, выращенные в статических условиях (рисунок б). 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 (pRK415-15076) зависели от условий культивирования. Биопленки этих штаммов при встряхивании накапливали значительно меньше биомассы по сравнению с их же биопленками, выращенными на границе раздела жидкость – стекло в статических условиях (рисунок б).

В этом разделе мы сравнили биопленки, образованные штаммом Sp245^T, его мутантом Sp245.1063 и их ранее полученными производными [171] на границах раздела между минимальной (MSM) или богатой (LB) жидкой средами и гидрофильной (стеклянная) или гидрофобной (полистирольная) твердой поверхностью в статических или динамических условиях. В ходе всех экспериментов количество биомассы в зрелых биопленках было частично (в MSM) или полностью (в LB) восстановлено у комплемента Sp245.1063 (pRK415–150177), который получил в составе вектора pRK415 последовательность предполагаемого белка FlhB1 жгутиковой системы секреции III типа. Хотя Laf не был найден в биопленках азоспирилл, Fla присутствовал в клетках из биопленок комплементарного мутанта Sp245.1063

(pRK415–150177) и других изучаемых штаммов, которые имели нормальное жгутирование на жидких и твердых питательных средах, соответственно. Зрелые биопленки этих штаммов содержали больше биомассы и были значительно более устойчивы к встряхиванию при 140 об/мин по сравнению с биопленками мутантов без жгутиков. Полученные данные доказали, что для накопления биомассы биопленок и их стабилизации (в условиях гидродинамического сдвига) необходим полярный жгутик *A. baldaniorum* Sp245^T.

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

В разделах 3.1 и 3.2 описано, что, по сравнению с пленками родительского штамма, биопленки Fla⁻ Laf⁻-мутанта *A. baldaniorum* Sp245.1063, сформированные под жидкой средой на твердой поверхности, содержали меньше биомассы и оказались менее стабильными в условиях гидродинамического сдвига. У мутанта инактивирована хромосомная копия гена *flhB* (*flhB1*), являющегося компонентом FlhB системы сборки полярного жгутика.

Нарушения в подвижности и продукции жгутиков были обнаружены в лаборатории генетики микроорганизмов ИБФРМ РАН у мутантов *A. baldaniorum* Sp245^T по предполагаемым генам липидного метаболизма – 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназы *MmsB1* (accessionno. ADT80774) и 3-оксоацил-[ацил-переносающий белок (АПБ)]-редуктазы *FabG1* (accessionno. CCD01190) [40]. Мутанты имели инсерцию искусственного транспозона Omega-Km в предполагаемые гены *mmsB1* и *fabG1*. Полученные мутанты SK039 и Sp245.1610 не отличались от родительского штамма Sp245^T по таким показателям, как жизнеспособность, скорость роста, средний размер клеток. Анализ содержания хроматографически детектируемых жирных кислот в

экстрактах общих клеточных липидов Sp245^T и его *mmsB1* и *fabG1* мутантов не показал существенных межштаммовых различий [40]. Присутствие в геноме штамма *A. baldaniorum* Sp245^T нескольких генов, кодирующих перечисленные выше ферменты (accessionnosHE577327–HE577333; HM776586), скорее всего, способствовало сохранению жизнеспособности этих мутантов. Мы предположили, что мутации в генетических локусах *mmsB1* и *fabG1* привели к модификации в структуре клеточной оболочки азоспирилл, которые оказали существенное влияние на сборку и функционирование флагелл, межклеточные взаимодействия и коллективное поведение бактерий, в том числе и способность к формированию биопленок.

В данном разделе диссертационной работы нами проведены исследования, позволяющие сравнить свойства клеточной поверхности и способность к формированию биопленок у *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутантов SK039 (*mmsB1*::Omegon-Km) и Sp245.1610 (*fabG1*::Omegon-Km), поскольку в стабилизации и поддержании архитектуры биопленок, помимо жгутиков, участвуют и другие структуры бактериальных клеток.

3.3.1 Характеристика биопленок штамма *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутантов Sp245.1610 (*fabG1*) и SK039 (*mmsB1*)

Начальные этапы формирования биопленок под жидкой средой на стекле или полистироле мутантами Sp245.1610 и SK039 (адсорбция и адгезия клеток) завершались на 2-3 сутки культивирования, как и в случае Sp245^T. К 5-6 суткам инкубации происходили максимальный прирост и стабилизация биомассы пленок всех исследованных штаммов. На этапе адгезии азоспириллы формировали тонкие биопленки. При фазово-контрастной микроскопии этих «молодых» пленок были видны разрозненные агрегаты бактерий (микроколонии). Микроколонии объединялись в пленку с ровной поверхностью спустя 2-е суток после начала культивирования штаммов Sp245^T и Sp245.1610, а в случае SK039 – после 3-х суток. При формировании пленок у SK039 наблюдалось увеличение длительности этапа прикрепления клеток к

поверхности. Закрепление азоспирилл на колонизируемой поверхности происходило вне зависимости от их способности продуцировать жгутики. Необходимо отметить, что на 2-е сутки культивирования все штаммы часто формировали биопленку также и на поверхности жидкой среды. Пленки, сформированные на разделе жидкость – воздух, порой оседали на дно пробирки.

Показатели, характеризующие количество биомассы биопленок штаммов Sp245^T, Sp245.1610 и SK039, начинали значительно отличаться к 6-м суткам культивирования (рисунок 8).

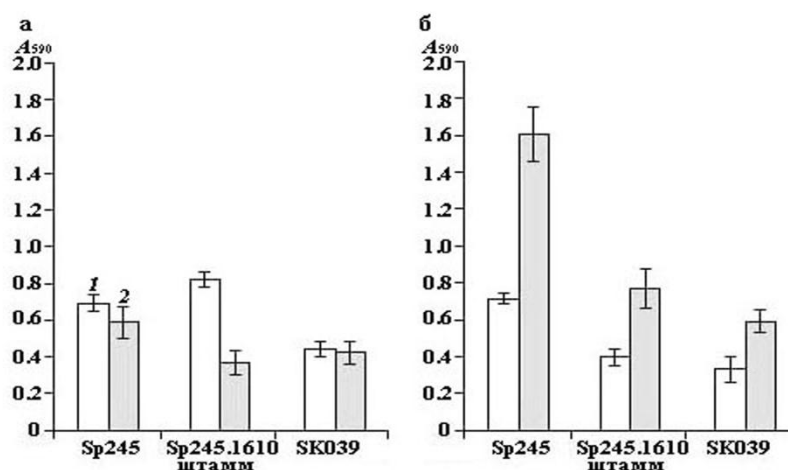


Рисунок 8 – Содержание биомассы в биопленках *A. baldaniorum* Sp245^T и мутантов этого штамма Sp245.1610 и SK039, сформированных за 6 дней культивирования на стекле (а) или полистироле (б) под жидкой средой LB (1) или MSM (2). A_{590} – оптическая плотность кристаллического фиолетового, элюированного из окрашенных биопленок (показатель соответствующий относительно количеству биомассы). Доверительные интервалы определяли на уровне значимости 95%.

У родительского штамма Sp245^T и его мутанта Sp245.1610 показатели, характеризующие количество биомассы в биопленках, образованных на гидрофильной поверхности под жидкой средой LB, были примерно одинаковыми (рисунок 8а). В случае SK039 биомассы пленок оказалось существенно меньше по сравнению с Sp245^T и Sp245.1610 в этих условиях культивирования. На стекле под жидкой средой MSM относительное

количество биомассы было снижено в биопленках обоих мутантов (рисунок 8а).

На гидрофобной поверхности под жидкими средами LB и MSM Sp245.1610 и SK039 образовывали биопленки с меньшим количеством биомассы по сравнению с родительским штаммом (рисунок 8б). Можно также отметить, что в пленках на гидрофобном полистироле биомассы накапливалось больше под MSM, по сравнению с показателями под LB в случае всех трех исследованных штаммов (рисунок 8б).

На всех этапах образования биопленок штаммом Sp245^T выявлены многочисленные клетки с длинными полярными флагаеллами, которые, переплетаясь, образовывали сеть (описано в разделах 3.1 и 3.2). В пленках SK039 (фенотип leakyFla⁻Mot⁻Swa⁻) обнаружена незначительная доля клеток с длинным полярным жгутиком, а на некоторых клетках Sp245.1610 (фенотип leakyFla⁻/Mot⁻Laf⁻Swa⁻) присутствовал короткий полярный жгутик (рисунок 9).

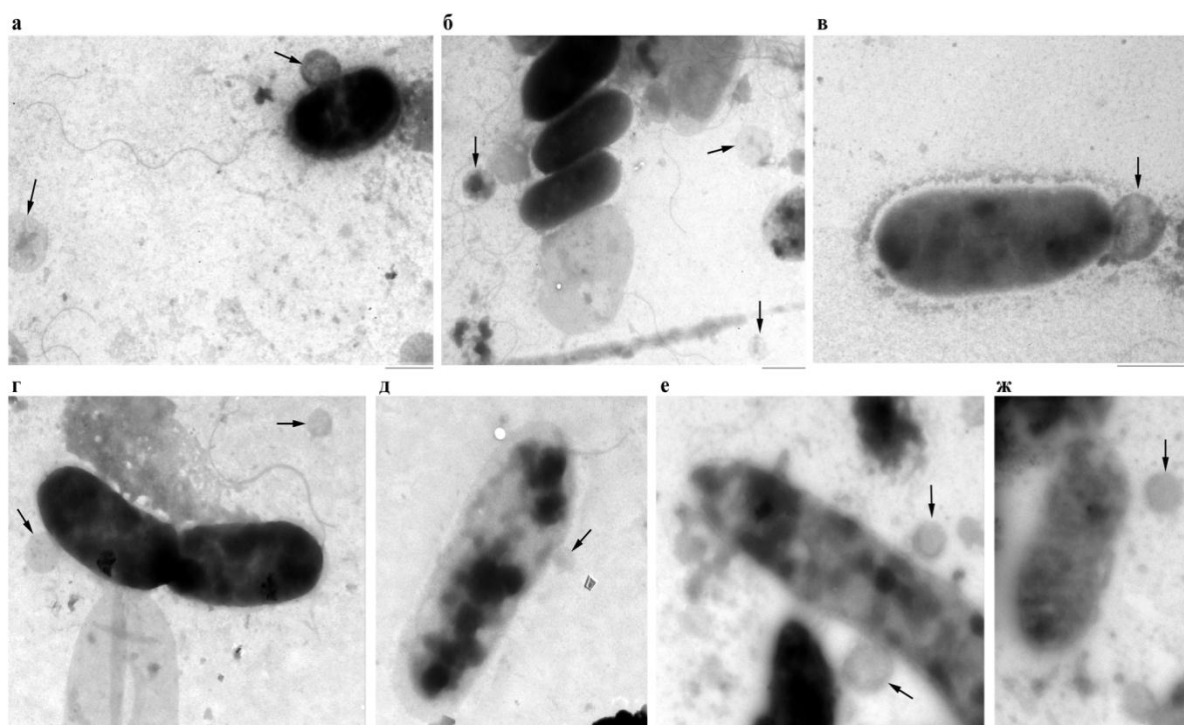


Рисунок 9 – Результаты просвечивающей электронной микроскопии биопленок *A. baldaniorum* Sp245^T (а-в), Sp245.1610 (г, д) и SK039 (е, ж), смытых с поверхности стекла. Исследованы 6-дневные биопленки, сформированные под жидкой LB (а, б, г, е) или MSM (в, д, ж). Стрелками обозначены везикулы. Масштаб 1 мкм.

Мы не обнаружили клеток с латеральными жгутиками как в пленках Sp245^T, Sp245.1610, SK039, так и Sp245.1063. Биопленки всех перечисленных штаммов содержали везикулы разного размера. На рисунке 9 представлены фотографии результатов микроскопии суспензий, смытой с поверхности стекла биомассы биопленок Sp245^T, Sp245.1610 и SK039, на которых везикулы обозначены стрелками. С помощью АСМ мы выявляли везикулы чаще в образцах, отобранных с границы раздела жидкость – воздух, чем с твердой поверхности. Для атомно-силовой микроскопии использованы нативные биопленки, высушенные на воздухе. Наличие везикул в биопленках азоспирилл не является уникальным явлением. Они встречаются в пленках других микробов, могут формироваться из внешней мембраны грамотрицательных бактерий и содержать липополисахариды, фосфолипиды, ферменты и другие составляющие компоненты микробной клетки [174].

Мы сравнили свойства бактериальной поверхности родительского штамма, Sp245.1610 и SK039, поскольку было сделано предположение о том, что мутации в генах липидного метаболизма привели к модификации в структуре клеточной оболочки соответствующих мутантов. Анализ степени агрегации планктонных культур показал, что в жидкой 2-суточной культуре, выросшей в LB, этот показатель у Sp245.1610 и SK039 оказался выше такового у Sp245^T (рисунок 10б, в). К 6-м суткам культивирования агрегация клеток у мутантов не менялась, а у родительского штамма повышалась в 2 раза (до показателей Sp245.1610). Полученные данные позволяют полагать, что интенсивная агрегация азоспирилл уже в планктонной культуре способствовала их адсорбции к твердому субстрату (рисунок 10б, в), особенно в случае мутантов, лишенных полноценного полярного жгутика, участвующего в прикреплении клеток к заселяемым бактериями поверхностям.

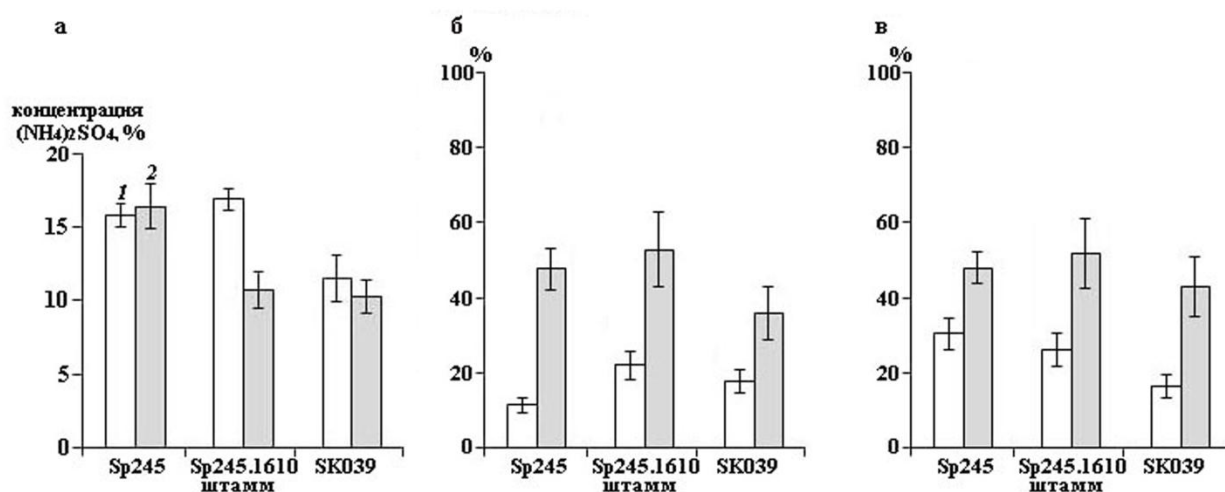


Рисунок 10 – Характеристика планктонных клеток *A. baldaniorum* Sp245^T, мутантов этого штамма Sp245.1610 и SK039, выросших в жидкой LB (1) или MSM (2). Определенная методом высаливания гидрофобность клеток из 20-ч культур (а); степень агрегации клеток после 2-х (б) и 6-ти (в) суток культивирования без перемешивания. Доверительные интервалы определяли на уровне значимости 95%.

При выращивании в жидкой среде MSM клетки Sp245^T, Sp245.1610 и SK039 агрегировали примерно одинаково (рисунок 10б, в). Этот показатель не зависел от длительности культивирования бактерий и был выше, чем при выращивании в LB (рисунок 10б, в). Вероятно поэтому, в биопленках, сформированных на гидрофобной поверхности под MSM за 6 дней культивирования, накапливалось большее количество биомассы, по сравнению с пленками, образованными под LB (рисунок 10б). Тем не менее, как под MSM, так и под LB толщина биопленок мутантов и родительского штамма отличалась.

Мы также провели сравнение штаммов Sp245^T, Sp245.1610 и SK039 по такому показателю, позволяющему охарактеризовать бактериальную поверхность, как гидрофобность клеток. Данный показатель был практически одинаковым у бактерий Sp245.1610 и Sp245^T, выращенных в жидкой LB (рисунок 10а), но существенно возрастал у Sp245.1610 при выращивании в MSM (рисунок 10а). Клетки SK039 выделялись более высокой гидрофобностью независимо от состава среды выращивания (рисунок 10а). Мы не отслеживали

изменения гидрофобности бактерий в ходе формирования и созревания биопленок.

У азоспирилл, использованных в работе, толщина (количество биомассы) пленок менялась после изменения физико-химических параметров среды, окружающей биопленки. Так, после замены культуральной жидкости, окружающей зрелые биопленки (6-дневные пленки), на 50 мМ ФБ (рН 7.0) спустя 2 ч часть бактерий из пленки мигрировала в буфер. В буфер переходили свободные особи или клетки, находящиеся в составе агрегатов. Количество биомассы биопленок всех использованных в работе штаммов снижалось на 40-50% (рисунок 11в, г). Дисперсия пленок, которые были сформированы на полистироле под MSM, превышала 50%. Аналогичное уменьшение биомассы случалось у биопленок Sp245.1610, сформированных на стекле под LB (рисунок 11в, г). Необходимо отметить, что величина рН жидких сред LB или MSM, в которых формировались биопленки, за 6 дней культивирования возрастала с 7.0 (на момент инокуляции в среду бактерий) до величины (8.3 ± 0.1) или (9.3 ± 0.1) (рН культуральной жидкости с планктонными клетками, окружающей зрелые пленки), соответственно. Если вместо ФБ (рН 7.0) использовали культуральную жидкость, из которой удалили 6-суточные планктонные бактерии, снижение количества биомассы (диссоциации) биопленок не происходило. Например, после подобной инкубации с LB (рН 8.3) через 2.5 ч в биопленках Sp245^T, Sp245.1610 и SK039 сохранялось (93.3 ± 6.6), (95.8 ± 14.8) и (88.0 ± 12.2)% биомассы, соответственно.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что в биопленках азоспирилл прикрепление/контакт/фиксация некоторой доли бактерий (клетка/клетка/поверхность) опосредуют взаимодействия, чувствительные к таким условиям окружающей среды как рН и/или ионная сила. Состав сред LB и MSM отличается по последнему показателю от 50 мМ ФБ (рН 7.0). Распад биопленки является финальным этапом ее формирования и развития [345, 188]. В то же время диссоциация может происходить и в ответ на изменения физико-химических параметров среды [345, 188]. Таким образом,

наличие определенной доли особей, непрочно зафиксированных в биопленках, позволяет азоспириллам быстро покинуть пленку в момент ее диссоциации. Завершая анализ результатов данного раздела необходимо отметить, что способность к диссоциации в одинаковой степени выражена как у подвижных клеток штамма *A. baldaniorum* Sp245^T, так и у его мутантов, не способных к подвижности, обусловленной активностью жгутиков (рисунок 11 в, г).

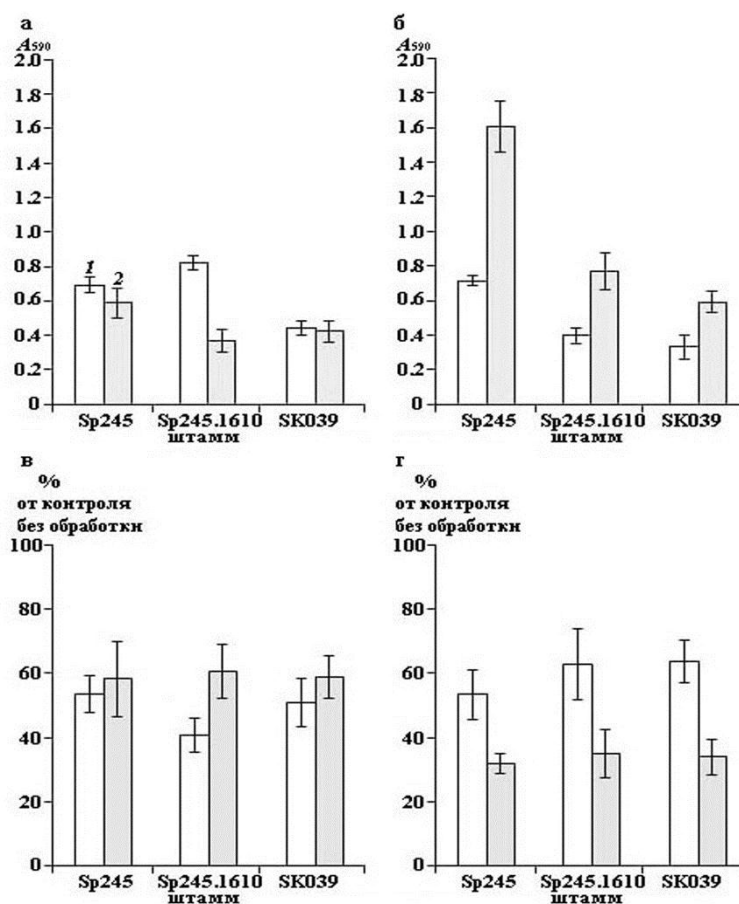


Рисунок 11 – Влияние ФБ (pH 7.0) (в, г) на биомассу 6-суточных биопленок (а, б) *A. baldaniorum*, сформированных на стекле (а, в) и полистироле (б, г) под жидкой LB (1) или MSM (2). A_{590} – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок (а, б). % – процентное отношение оптической плотности красителя, десорбированного с окрашенных пленок после их инкубации в фосфатном буфере (pH 7.0) (в, г) к аналогичному показателю без обработки. Доверительные интервалы определяли на уровне значимости 95%.

3.3.2 Исследование биопленок штамма *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутантов Sp245.1610 (*fabG1*) и SK039 (*mmsB1*) с помощью иммуноферментного анализа

С целью оценить продукцию ЛПС в биопленках, сформированных на гидрофобной поверхности под средой LB или MSM (таблица 3), был проведен иммуноферментный анализ с использованием поликлональных Ат на ЛПС штамма Sp245^T. В случае Sp245^T, SK039 и Sp245.1610 отношение величины показателя, характеризующего содержание липополисахаридных антигенов (таблица 3) к показателю, характеризующему содержание относительного количества биомассы биопленок (рисунок 8б), составляло, соответственно, 0.5/0.3, 1.0/0.8 и 0.8/0.6.

Таблица 3 – Результаты иммуноферментного анализа содержания ЛПС-антигенов в биопленках *A. baldaniorum* Sp245^T и мутантов этого штамма Sp245.1610 и SK039, сформированных на гидрофобной поверхности за 6 суток

Штамм <i>A. baldaniorum</i>	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

Примечание: доверительные интервалы определяли на уровне значимости 95%.

Отношение количества липополисахаридов к биомассе биопленок наглядно говорит о том, что в биопленках мутантов Sp245.1610 и SK039, имеющих нарушения в продукции жгутиков, относительное содержание липополисахаридных антигенов в пленках выше, чем у Sp245.

3.3.3 Анализ гемагглютинирующей активности клеток *A. baldaniorum* Sp245^T и мутантов этого штамма Sp245.1610 и SK039

Характеристика гемагглютинирующей активности клеток позволяет оценить природу структур, обуславливающих формирование в биопленках

специфических контактов между бактериями. У азоспирилл, помимо других структур, такие взаимодействия обуславливают гемагглютинины [57]. Нами проведен сравнительный анализ гемагглютинирующей активности клеток, находящихся в составе зрелых биопленок родительского штамма и его мутантов, Sp245.1610 и SK039. Агглютинацию трипсинизированных эритроцитов вызывали смытые с поверхности стекла суспензии 6-суточных биопленок Sp245^T, Sp245.1610 и SK039, сформированных на стекле под LB/MSM, с титром реакции (1:16)/(1:16), (1:4)/(1:4) и (1:1)/(1:4), соответственно штамму. Известно, что белок-гемагглютинин поверхности клеток Sp245^T взаимодействует с O-полисахаридом липополисахаридов этого штамма [80]. Предполагается, что эти взаимодействия способствуют установлению контактов между клетками [80]. В случае клеток мутантов нами отмечено уменьшение гемагглютинирующей активности в 4-16 раз. В культурах соответствующих штаммов снижение этого показателя, несомненно, влияет на межклеточные взаимодействия, опосредуемые гемагглютинами. Контакты между клетками могут быть ослаблены. Еще одной причиной сниженной по сравнению с Sp245^T гемагглютинирующей активности бактерий Sp245.1610 и SK039 также могли послужить изменения в структуре или аранжировке на поверхности клеток других макромолекул (не обладающих активностью, характерной для гемагглютининов), не участвующих в реакции, но влияющих на активность агглютининов.

В биопленках Sp245.1610 и SK039 содержание липополисахаридов оказалось выше, чем в случае пленок штамма Sp245^T, что, вероятно, сказалось на титре гемагглютинирующей активности. Необходимо отметить, что трипсинизированные клетки Sp245^T утрачивали способность агглютинировать обработанные трипсином эритроциты. Биопленки Sp245^T, Sp245.1610 и SK039, сформированные на стекле под LB, после обработки трипсином (100 мкг/мл) сохраняли лишь $(78.6 \pm 7.4)\%$, $(71.0 \pm 13.3)\%$ и $(76.0 \pm 8.3)\%$ биомассы, соответственно. Снижение биомассы пленок и их разрушение можно связать с деструктивной активностью протеазы в отношении поверхностных

биополимеров, которые обуславливают гемагглютинацию и участвуют в образовании межклеточных контактов.

3.3.4 Характеристика жирнокислотного состава липополисахаридов *A.*

baldaniorum Sp245^T и его *mmsB1* и *fabG1* мутантов

Ранее при характеристике *mmsB1* и *fabG1* мутантов незначительные межштаммовые колебания были обнаружены в относительном содержании практически всех детектируемых жирных кислот в экстрактах суммарных липидов клеток штаммов Sp245^T, Sp245.1610 и SK039, выращенных в жидких и на плотных LB и MSM [40]. В экстрактах всех исследованных штаммов общее содержание транс-9-октадекановой, цис-9-гексадеценовой и гексадекановой кислот превышало 84%. Примерно 6.5-8.0% приходилось еще на долю октадекановой и цис-9-октадекановой кислот [40].

Штаммы SK039 и Sp245.1610, являющиеся мутантами по генам *mmsB1* и *fabG1*, сохранили способность к синтезу полисахаридов, связывающих калькофлюор, а их липополисахариды взаимодействовали с антителами на ЛПС штамма Sp245^T. Ферменты MmsB обладают широкой субстратной специфичностью и могут выступать катализаторами обратимого окисления 3-гидроксиизобутирата и других 3-гидроксикислот, а также ряда аминокислот [137]. Ферменты FabG ускоряют процесс восстановления 3-оксоацил-[АПБ] до 3-гидрокси-[АПБ] на первом этапе *de novo* синтеза жирных кислот (accessionno. CCD01190). Для того, чтобы подтвердить предположение о возможном изменении жирнокислотного состава ЛПС после инактивации генов *mmsB1* и *fabG1* у родительского штамма и мутантов был проведен сравнительный анализ ЖК профилей липида А, являющегося одним из основных компонентов бактериальных ЛПС.

На гидрофобность клеток Sp245^T состав среды культивирования практически не влиял (рисунок 10). Отличия в количестве биомассы биопленок Sp245^T и его мутантов оказались наиболее заметны при использовании MSM (рисунок 8а, б), поэтому для получения препаратов липополисахаридов и их

последующего химического анализа использовали бактерии, выращенные в этой среде.

Характеристика профилей жирных кислот ЛПС с помощью ГЖХ метиловых эфиров ЖК (МЭЖК) показала, что в ЛПС Sp245.1610 и SK039 снижалось содержание 3-гидроксигексадекановой (3-ОН-С_{16:0}) и гексадекановой кислот (С_{16:0}) по сравнению с ЛПС Sp245^T (таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика липополисахаридов *A. baldaniorum* Sp245^T, Sp245.1610 и SK039

Компоненты		ЛПС штамма <i>A. baldaniorum</i>			
		Sp245 ^T	Sp245.1610	SK039	
Содержание, весовые %	Углеводы	65.8±2.1	75.9±5.5	44.1±2.5	
	Белки	0.7±0.1	0.5±0.2	0.5±0.1	
	КДО*	0.6±0.02	1.8±0.2	1.8±0.1	
	Фосфор	2.7±0.1	4.6±0.2	2.7±0.4	
	% от веса МЭЖК**	3-ОН-С _{14:0}	42.0±0.6	35.4±0.2	44.0±0.2
		С _{16:1}	сл.***	3.1±0.1	сл.
		С _{16:0}	29.2±1.3	3.1±0.1	3.0±0.4
		3-ОН-С _{16:0}	22.0±0.9	11.2±0.4	14.2±0.8
		С _{18:1}	6.8±0.2	43.1±1.1	33.4±1.2
		С _{19:0}	сл.	5.1±0.6	4.8±0.5

Примечание: *КДО – 3-дезоксид-манно-2-октулозоновая кислота;

**МЭЖК – метиловые эфиры жирных кислот;

***сл. – следовые количества.

Доверительные интервалы определяли на уровне значимости 95%.

В случае SK039 отмечалось незначительное уменьшение содержания 3-гидрокситетрадекановой (3-ОН-С_{14:0}) и увеличение количества гексадеценной кислоты (С_{16:1}). Количество октадеценной (С_{18:1}) и нонадекановой кислот (С_{19:0}) в ЛПС обоих мутантов возрастало (таблица 4).

Вполне вероятно, что изменение состава жирных кислот в ЛПС стало причиной представленных выше различий в физико-химических свойствах

клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок азоспирилл (например, вследствие изменения степени экспонирования биомолекул, важных для взаимодействия азоспирилл друг с другом и с различными поверхностями).

3.3.5 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* [40]. В культурах *A. baldaniorum* SK039 примерно 20% бактерий продуцировали длинный или короткий Fla (рисунок 12) [353].

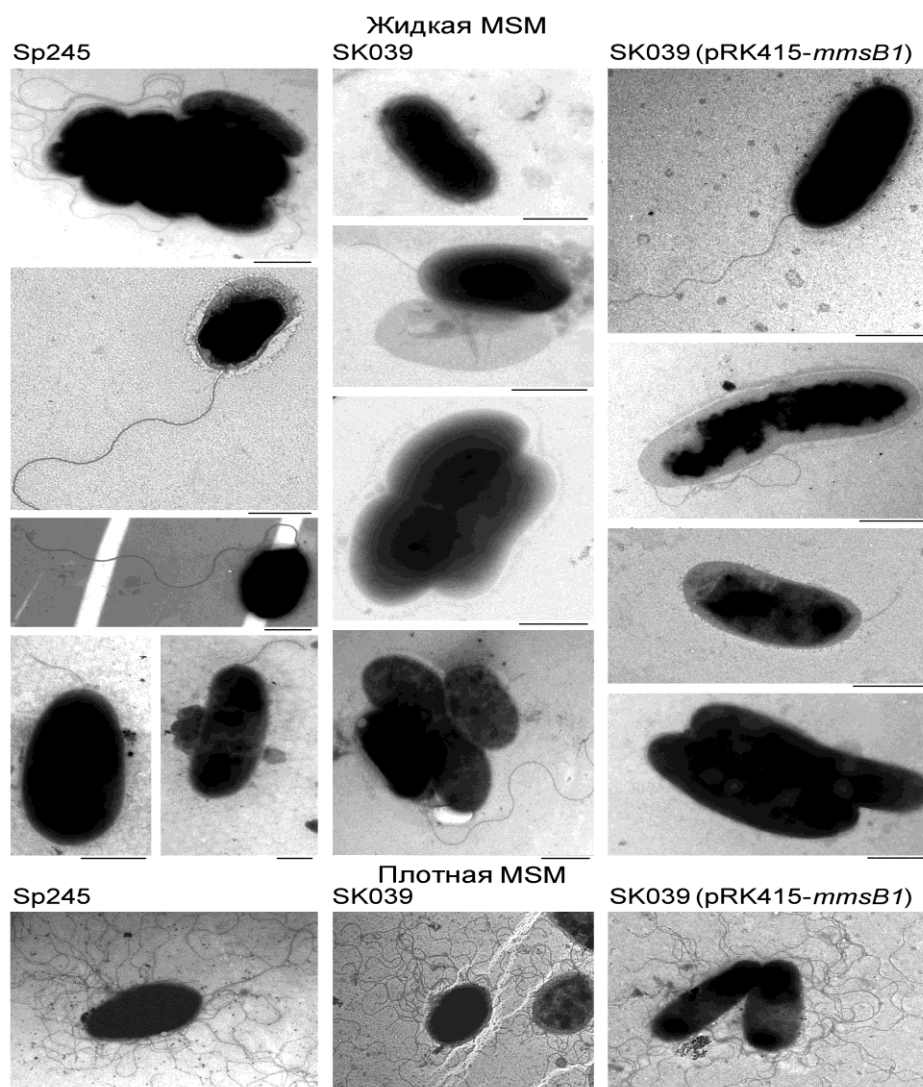


Рисунок 12 – Электронные микрофотографии клеток азоспирилл из 24-ч жидких культур и колоний, выросших за 48 ч на плотной агаризованной среде. Масштабная линейка соответствует 1 мкм.

Клетки мутанта оказались не способны к движению в жидких или в полужидких средах [40, 353]. По сравнению с *A. baldaniorum* Sp245^T у мутанта наблюдались изменения в физико-химических свойствах клеточной поверхности, также он накапливал меньше биомассы в зрелых биопленках (подраздел 3.3.1).

Для того чтобы подтвердить данные о биологической роли *mmsB1*, были проанализированы фенотипические последствия комплементации мутанта SK039 [353] CDS *mmsB1* штамма Sp245, клонированного в векторе экспрессии pRK415 ниже его lac-промотора (pRK415-*mmsB1*). Известно, что этот промотор pRK415 является конститутивным в клетках азоспирилл [210], которые не используют лактозу [373].

На границе между жидкой средой MSM или LB и гидрофильными или гидрофобными поверхностями штамм Sp245^T накапливает больше биомассы в зрелых биопленках, чем мутант *mmsB1*::Omegon-Km SK039 (подраздел 3.3.1). У обоих штаммов первоначальное прикрепление и адгезия (прилипание) 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*, был проанализирован соответствующий фенотип штамма SK039 (pRK415-*mmsB1*). Показано, что введение плазмиды pRK415 с CDS *mmsB1* штамма Sp245^T, оказало значительное положительное влияние на накопление биомассы в биопленках 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 5).

Таблица 5 – Формирование биопленок азоспириллами в стеклянных пробирках или в лунках полистирольных планшетов под жидкими средами после 6 дней культивирования при 28°C

Штаммы <i>A. baldaniorum</i>	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 (б)	0.9 ± 0.02 (a)	0.7 ± 0.08 (a)
SK039	0.4 ± 0.05 (в)	0.4 ± 0.07 (z)	0.5 ± 0.04 (б)	0.3 ± 0.05 (б)
SK039 (pRK415)	0.4 ± 0.03 (в)	0.4 ± 0.04 (z)	0.5 ± 0.02 (б)	0.4 ± 0.04 (б)
SK039 (pRK415- <i>mmsB1</i>)	0.5 ± 0.03 (б)	0.6 ± 0.07 (z)	0.8 ± 0.03 (a)	0.8 ± 0.08 (a)

Примечание: биопленки окрашивали кристаллическим фиолетовым, связанный краситель экстрагировали этанолом и измеряли поглощение растворов при A_{590} . Доверительные интервалы для средних значений определяли на уровне значимости 95%. Данные были обработаны ANOVA. Средние значения сгруппированы с помощью теста $LSD_{0.05}$. Разные буквы обозначают значимые различия между образцами ($p \leq 0.05$).

Формирование биопленок – прикрепленных бактериальных сообществ, удерживаемых благодаря выделению клетками собственного внеклеточного матрикса, – это энергоемкий и многофакторный процесс, который может иметь видоспецифичные и штаммоспецифичные особенности [259].

У *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутанта *mmsB1::Omegon-Km* SK039 охарактеризованы зрелые биопленки (подраздел 3.3.1). Показано, что для клеток *A. baldaniorum* Sp245^T и SK039 характерно полное отсутствие Laf в биопленках, образованных за 6 суток культивирования на границе между бульонной питательной средой и твердыми поверхностями, как и в случае других исследованных штаммов (разделы 3.1, 3.2, подраздел 3.3.1). В биопленках SK039 обнаружена незначительная часть клеток с длинным Fla (подраздел 3.3.1). Клетки с Fla были обнаружены в зрелых (4-6-дневных)

био пленках штамма *A. baldaniorum* Sp245^T (разделы 3.1, 3.2). Наличие Fla, возможно парализованного [131], на клетках Sp245 повышает стабильность био пленки (раздел 3.2).

Введение в клетки плазмиды pRK415-*mmsB1* приводило к значительному увеличению относительного числа бактерий с полярным жгутиком у штамма SK039. Процент клеток SK039 (pRK415-*mmsB1*), обладающих Fla (рисунок 12), приблизился к 46-53% от значений, характерных для Sp245^T [353]. Соотношение клеток с полярными жгутиками было практически одинаковым в популяциях *A. baldaniorum* 245^T, выращенных в жидкой LB или MSM [353]. Средняя скорость плавания подвижных клеток комплементарного мутанта в жидких и в полужидких агаризованных средах равна таковой у родительского штамма Sp245^T. Характер движения бактерий у SK039 (pRK415-*mmsB1*) и Sp245^T был сходным [353].

Определенно, критическим фактором, влияющим на формирование био пленки, является состояние питательной среды. Например, дефицит углерода может активировать производство матрикса био пленки [409], а состав питательных веществ может способствовать переходу поверхностной био пленки в опускающуюся на дно форму [318]. В предыдущих разделах (разделы 3.1, 3.2, подраздел 3.3.1) обнаружено, что бактерии *A. baldaniorum* Sp245^T накапливали больше биомассы в био пленках, образованных на границах раздела фаз между гидрофобной твердой поверхностью и бедной питательной средой MSM, нежели в био пленках, сформированных на богатой среде LB. Эти различия можно объяснить наличием у штамма Sp245^T положительного транскрипционного регулятора развития био пленки в условиях роста на бедной питательной среде. Пока неясно, почему процесс накопления биомассы био пленки 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*)

наблюдалось полное восстановление накопления биомассы биопленки. Таким образом, несмотря на более низкий (чем у штамма Sp245) процент клеток с полярным жгутиком в популяции комплементарного мутанта [353] 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 [212]. Помимо увеличения числа клеток с полярным жгутиком в популяциях комплементарного штамма SK039 (pRK415-*mmsB1*) [353], восстановленные свойства поверхности его клеток также могут положительно повлиять на коллективную прикрепленную жизнь мутанта.

Так клетки *A. baldaniorum* SK039 из 20-ч бульонных культур, выращенных на MSM или LB, имели более высокую относительную гидрофобность, чем клетки штамма Sp245^T (рисунок 13). 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 13).

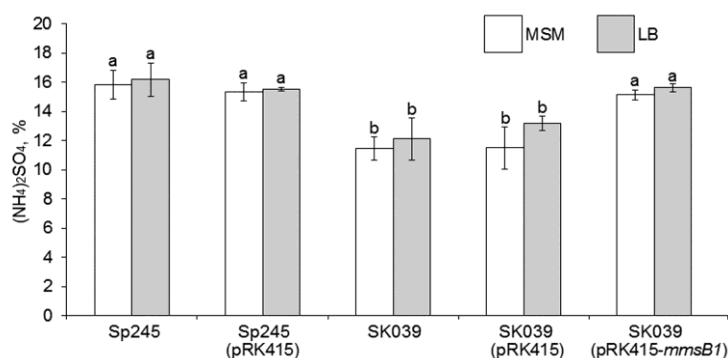


Рисунок 13 – Относительная гидрофобность клеток азоспирилл из 20-ч культур, выращенных в жидкой среде MSM или LB с соответствующими антибиотиками, определена с помощью метода высаливания. Доверительные интервалы для средних значений определяли на уровне значимости 95%. Данные были обработаны ANOVA. Средние значения сгруппированы с помощью теста LSD_{0,05}. Разные буквы над столбцами обозначают значимые различия между образцами ($p \leq 0.05$).

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

У грамотрицательных 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 [365]. Различия между диким типом и мутантом признака (поддержание основных свойств 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, 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. Интересно будет описать регуляцию экспрессии хромосомно расположенного гена *mmsB1* от его собственного промотора, дать биохимическую характеристику MmsB1 и отследить внутриклеточную локализацию MmsB1 под воздействием различных условий.

3.4 Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *A.*

baldaniorum Sp245^T

Экзополисахариды/углеводсодержащие полимеры являются доминирующими составляющими формирующихся и функционирующих биопленок микроорганизмов, обитающих в различных экологических нишах

[174, 132]. Ранее было показано, что изменения в биосинтезе липополисахаридов; полисахаридов, связывающих калькофлуор; и нарушения активности полярной флагеллы, наблюдающиеся у соответствующих мутантов *A. baldaniorum* Sp245^T, оказывали видимое влияние на результативность формирования биопленок [79]. Такие составляющие матрикса, как гликополимеры, обеспечивающие фиксацию бактериальных пленок на поверхности и стабилизацию структурной целостности зрелых биопленок азоспирилл, в указанной работе не охарактеризованы. На наш взгляд биопленки мутантов, которые утратили флагеллы, являются подходящей и интересной моделью для изучения роли иных компонентов клеточной поверхности бактерий в организации матрикса биопленок. Мы предположили, что с данной точки зрения является интересным изучение мутанта с инактивированным геном *flhB1*, мутантов Sp245^T по генам *mmsB1* и *fabG1*. Эти азоспириллы имеют нарушения в синтезе жгутиков и, соответственно, в коллективном роении и самостоятельном плавании клеток. Мутация по генам *fabG1* или *mmsB1* оказала влияние на свойства поверхности клеток. У клеток соответствующих мутантов изменились гидрофобность и способность к агрегации планктонных бактерий (раздел 3.3).

3.4.1 Влияние на характеристики зрелых биопленок азоспирилл периодата натрия, окисляющего полисахариды, и протеаз

Биомасса биопленок Sp245^T, образованных на стекле под LB, уменьшалась на 40% после инкубации с окисляющим полисахариды периодатом натрия (рисунок 14в).

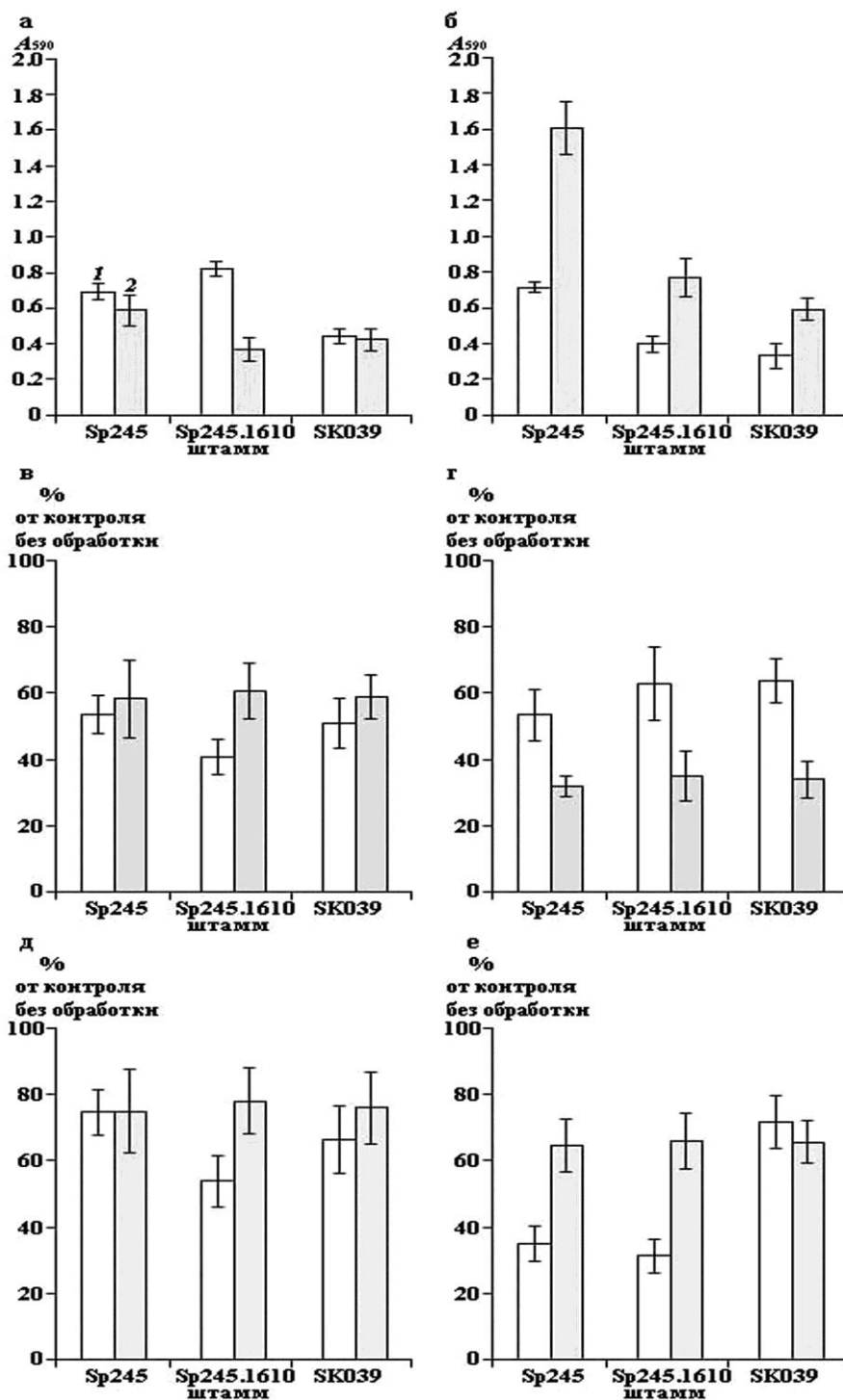


Рисунок 14 – Влияние периодата натрия и проназы на биомассу зрелых биопленок азоспирилл, сформированных на стекле (а, в, д) и полистироле (б, г, е) под жидкой LB (1) или MSM (2). Обозначения: (а, б) – A_{590} оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок 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. Доверительные интервалы определяли на уровне значимости 95%.

У лишенных флагелл мутантов Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 снижение количества биомассы составило 60-75%. В том случае если биопленки были сформированы на стекле под MSM или на полистироле под LB/MSM, устойчивость биопленок всех исследованных штаммов к периодатному окислению возрастала (рисунок 14в, г). Величина биомассы биопленок Sp245^T, Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 снижалась только на 20% (рисунок 14в, г).

При световой микроскопии биопленок видно, что после инкубации с периодатом нарушается целостность пленок, как на гидрофильной, так и на гидрофобных поверхностях. Часть бактерий утрачивают связь с биопленкой. Некоторое количество клеток находится в составе агрегатов. Также сохраняются крупные фрагменты пленок. Во время окрашивания кристаллическим фиолетовым, даже при осторожном промывании водой, отдельные особи, агрегаты бактерий и крупные фрагменты биопленок могут отслаиваться от стекла. Количество биомассы в биопленках Sp245.1063 и SK039 существенно ниже, чем у Sp245^T (рисунок 14а). Оба мутанта лишены жгутиков (таблица 1). Биопленки мутанта с похожим фенотипом Sp245.1610 (таблица 1) и штамма Sp245^T, являющегося родительским, на гидрофильной поверхности под LB практически не отличаются (рисунок 14а). Тем не менее, у всех трех мутантов после инкубации с окислителем гликополимеров (периодатом натрия) биопленки теряли на 20-35% больше биомассы, чем в случае Sp245^T. Таким образом, углеводсодержащие составляющие являются частью многокомпонентной системы механизмов, опосредующих средство биопленок к поверхностям с разными физико-химическими свойствами и их структурную целостность.

Из биомассы биопленок, смытых с поверхности стекла, выделен матрикс. При сравнении соотношения компонентов выделенного матрикса в случае всех исследованных штаммов можно отметить доминирование углеводных составляющих над белковыми (рисунок 15).

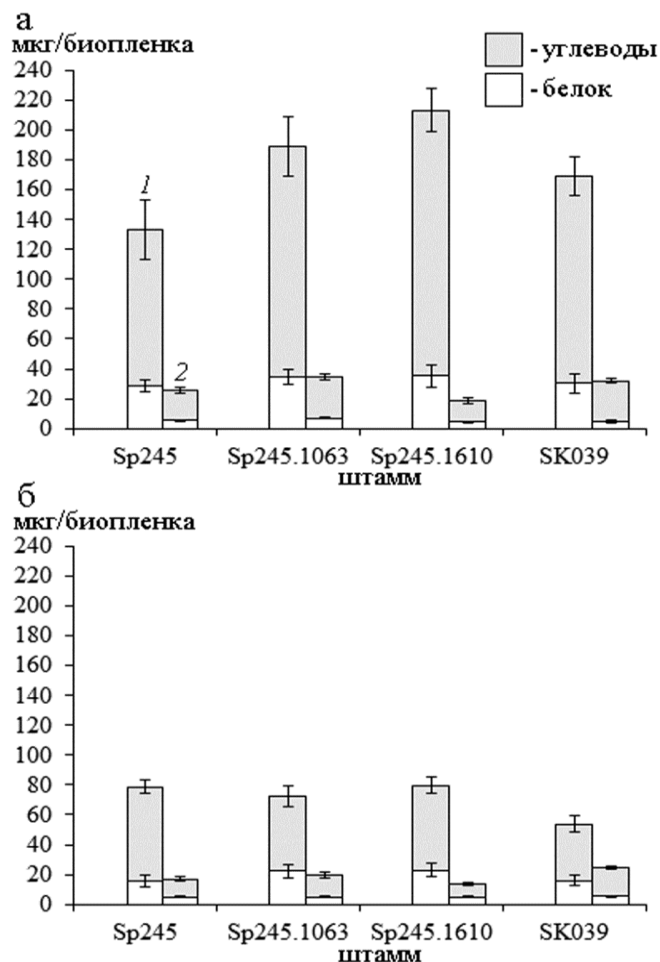


Рисунок 15 – Содержание углеводов и белка в матриксе зрелых биопленок азоспирилл, сформированных на стекле под LB (а) и MSM (б). Обозначения: 1 – ФБ-«экстракты» (легко смываемые компоненты, переходящие в супернатант при центрифугировании биомассы после ее промывания ФБ); 2 – ЭДТА-«экстракты» (более прочно связанные составляющие); серые столбцы – углеводы; белые столбцы – белок. Доверительные интервалы определяли на уровне значимости 95%.

Анализировали и сравнивали содержание углеводовсодержащих и белковых составляющих в компонентах матрикса переходящих в надосадок при центрифугировании после промывания биомассы пленок ФБ (легко смываемые компоненты или ФБ-«экстракты»), а также в более прочно связанных компонентах, которые удалось экстрагировать ЭДТА (ЭДТА-«экстракты»). Анализ количества углеводов и белков показал, что это соотношение менялось в зависимости от состава среды культивирования. В экстрактах матрикса пленок, сформированных под LB, данный показатель был 4.3 ± 0.6 (среднее значение для

всех исследованных штаммов и способов экстракции), а в случае биопленок, образованных под MSM, снижался до 2.8 ± 0.7 . Вполне вероятно, снижение величины показателя, характеризующего отношение углеводов и белков в матриксе, опосредует повышение устойчивости к периодатному окислению биопленок азоспирилл, сформированных под жидкой средой MSM. Компоненты матрикса белковой и углеводной природы являются, в том числе, основой каркаса биопленок. Оказалось, что после инкубации с ферментом проназой количество биомассы пленок родительского штамма и его мутантов Sp245.1063 и SK039, сформированных на стекле под средой LB, убывала на 30%, а в случае Sp245.1610 – на 46% (рисунок 14д). В том случае если поверхностью, на которой формировались пленки, был полистирол, уменьшение составило 65, 33, 28 и 69%, соответственно (рисунок 14е). Уровень разрушающего действия проназы на пленки, образованные под жидкой средой MSM на гидрофильной или гидрофобной поверхности, не менялся (рисунок 14д, е). В случае Sp245^T, Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 под действием этого фермента происходило понижение биомассы пленок приблизительно на 20-30%. Необходимо отметить, что количество биомассы также уменьшалось после обработки биопленок азоспирилл трипсином (см. подраздел 3.3.3).

3.4.2 Характеристика роли липополисахаридов в стабилизации биопленок азоспирилл

Легко смываемые (ФБ-«экстракты») и более прочно связанные (ЭДТА-«экстракты») составляющие матрикса биопленок Sp245^T, Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 в иммунохимических реакциях (двойная иммунодиффузия и иммуноферментный анализ) взаимодействовали с антителами, специфичными к мембранным ЛПС родительского штамма [49]. Повторяющееся звено О-полисахарида липополисахарида Sp245^T является пента-D-рамнаном [166]. Окисление ЛПС периодатом натрия приводит к модификации ОПС, так как периодат натрия окисляет полисахариды с образованием диальдегидполисахаридов. После обработки 5 мкг/мл выделенных препаратов

липополисахаридов Sp245^T, Sp245.1610 и SK039 периодатом натрия уровень взаимодействия антител (Ат) с препаратами липополисахаридов уменьшается (таблица 6, столбец 3).

Таблица 6 – Обнаружение иммуноферментным анализом ЛПС-антигенов (3) в препаратах ЛПС (1) и биопленках (2 и 4), образованных на гидрофобной поверхности за 6 суток культивирования в жидкой LB, после периодатного окисления (3 и 4).

Штамм <i>A. baldaniorum</i>	(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)		(4)
			препарат ЛПС, мкг/мл*		биопленки
			50	5	
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

Примечание: * – концентрация растворенного препарата внесенного в лунки планшета для ИФА. Доверительные интервалы определяли на уровне значимости 95%.

Вполне очевидно, что окисление периодатом натрия сказывается на антигенных характеристиках липополисахаридов. В случае, когда количество субстрата (ЛПС) увеличивали на порядок (50 мкг/мл), антигенные свойства липополисахаридов изменялись меньше (таблица 6, столбец 3). В сформированных биопленках при окислении периодатом гликополимеров, в том числе ОПС, происходит их модификация, снижающая уровень взаимодействия антител с ЛПС у Sp245^T и Sp245.1610 на 30%, а у Sp245.1063 и SK039 на 20% (таблица 6, столбец 4). Вполне вероятно, что устойчивость части липополисахаридного антигена к окислению, связана со значительным содержанием гликополимеров в матриксе (рисунок 15). Также данный эффект может быть обусловлен высоким содержанием ЛПС антигена в биомассе, в

особенности в случае пленок Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039, которые «тоньше» биопленок Sp245^T (таблица 3). Например, отношение показателя, характеризующего содержание липополисахаридных антигенов в биопленках, образованных под жидкой средой LB (таблица 6, столбец 2), к показателю, характеризующему величину их биомассы (рисунок 14б), у Sp245^T, Sp245.1063, Sp245.1610 или SK039 составило 0.5, 0.9, 0.8 или 1.0, соответственно. Доступность липополисахаридов для окисления периодатом также может зависеть от «толщины» пленок (таблица 6; рисунок 14). По всей вероятности, в «толстых» биопленках родительского штамма или в пленках с высоким содержанием ЛПС и других углеводсодержащих биополимеров после окисления периодатом остается значительная часть ЛПС, сохраняющего антигенные свойства. Тем не менее, даже в этом случае результатами инкубации с окислителем является снижение количества биомассы пленок, наиболее заметное на поверхности полистирола (рисунок 14в).

3.4.3 Анализ участия структур и биополимеров, связывающих красители калькофлуор и/или конго красный, в стабилизации биопленок азоспирилл

Анионные красители конго красный и калькофлуор (флуоресцирующий краситель) связываются с биомассой нативных биопленок всех исследованных в диссертационной работе штаммов азоспирилл. На рисунке 16 представлены результаты микроскопии окрашенных биопленок Sp245^T, Sp245.1610 и SK039.

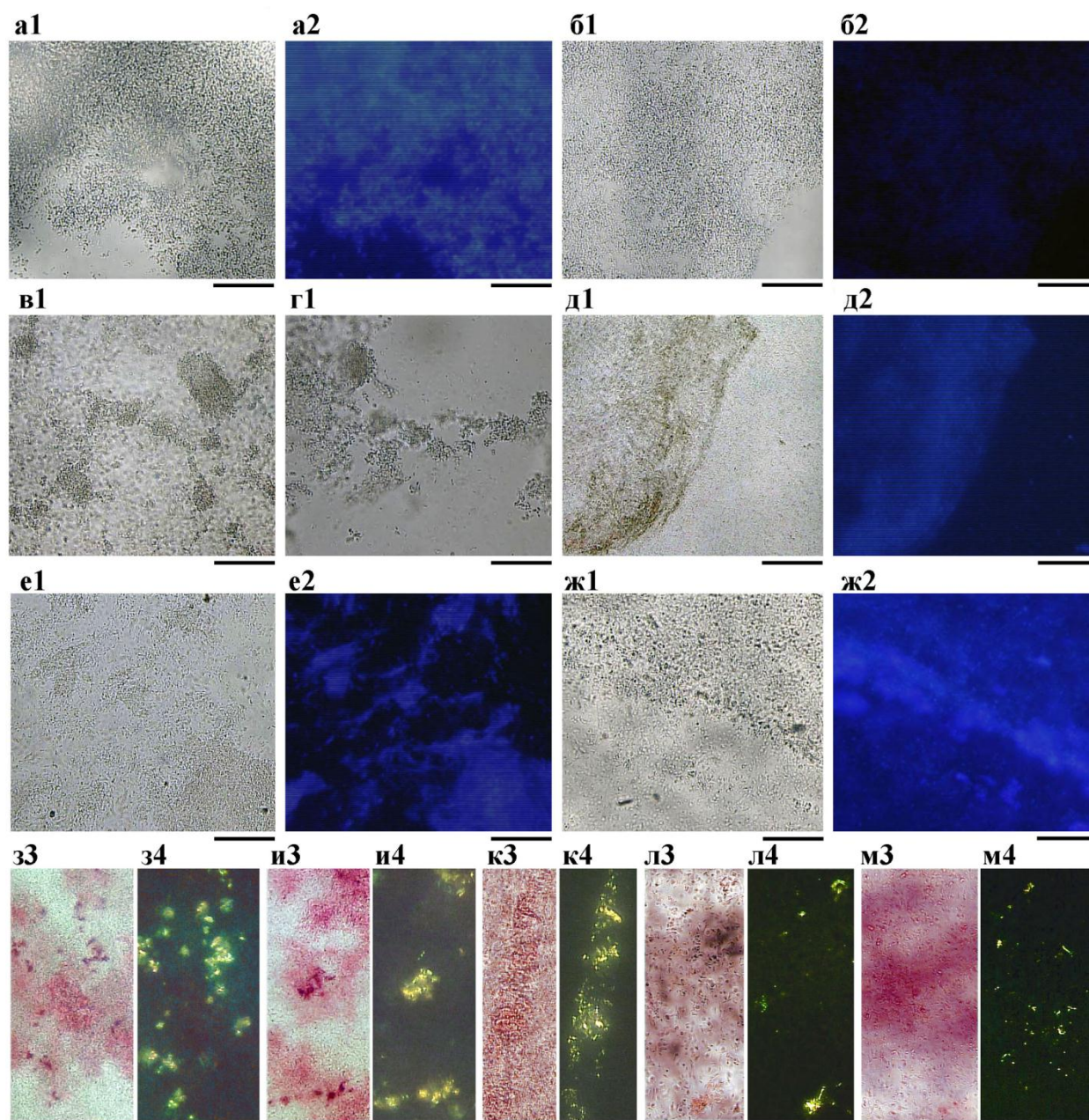


Рисунок 16 – Результаты световой микроскопии зрелых биопленок штамма *A. baldaniorum* Sp245^T (а-д, з, и) и его мутантов Sp245.1610 (е, л) и SK039 (ж, м), которые были выращены на поверхности стекла под жидкой средой LB (а-ж, и-м) или MSM (з). Биопленки после инкубации с периодатом натрия (б, в) или проназой (г, д). Окрашивание калькофлуором (а, б, д-ж) или конго красным (з-м). Видимый свет (1, 3), УФ (2) или поляризованная световая микроскопия при скрещенных поляризаторах (4). Масштаб 50 мкм.

Окрашивание данными красителями позволяет обнаружить β -глюканы, входящие в сложный комплекс микробных полисахаридов, в том числе и азоспирилл [398, 359].

В случае пленок Sp245^T, Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039, смытых с поверхности стекла фосфатным буфером, максимум флуоресценции калькофлуора, связавшегося с биомассой, смещен в область более длинных волн, если сравнивать с аналогичным показателем раствора этого красителя в аналогичном буфере. Для всех штаммов сдвиг был примерно одинаковым и составил 8.0 ± 1.0 нм. Наблюдаемое нами смещение максимума интенсивности флуоресценции свойственно растворам комплексов калькофлуора с полимерами полисахаридной природы [398, 320].

После того, как биопленки обработали окислителем гликополимеров периодатом натрия в них происходит нарушение единства клеток и снижается относительное количество биомассы (рисунок 14в, г). Необходимо отметить, что окрашенные калькофлуором пленки менее интенсивно флуоресцируют, по сравнению с необработанными образцами (например, рисунок 16б).

Вполне очевидно, что модифицированные после окисления периодатом составляющие биомассы связывают меньше калькофлуора. Флуоресценция окрашенных красителем пленок, обработанных проназой, сохраняется (рисунок 16в). Получается, что разрушение белковых структур не влияет на связывание калькофлуора с биопленками.

Результаты спектроскопии суспензий биопленок из среды с калькофлуором или конго красным, смытых с гидрофильной поверхности, показывают похожие изменения спектра поглощения каждого красителя, аккумулированного биопленками Sp245^T, Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039. Например, на рисунке 17б представлены спектры красителей, связавшихся с биомассой пленок штамма Sp245^T. Калькофлуор и конго красный образовывали комплекс с биомассой биопленок родительского штамма и поглощали с максимумами при (362.0 ± 3.0) или (515.0 ± 2.0) нм, соответственно. Эти величины для их растворов в фосфатном буфере составляли 349.0 или 495.0 нм (характерные максимумы поглощения красителей при pH 7.0 [398, 320]). Таким образом, смещение спектров флуоресценции калькофлуора и максимумов поглощения этого красителя (≥ 10 нм) или конго красного (≥ 20 нм) указывает на

возможное образование комплекса красителей с β -глюканами [398]. В биопленках после промывания биомассы и удаления легкосмываемых компонентов матрикса красители остаются в ее составе (рисунок 17б). В легкосмываемых компонентах матрикса калькофлуор и конго тоже присутствуют.

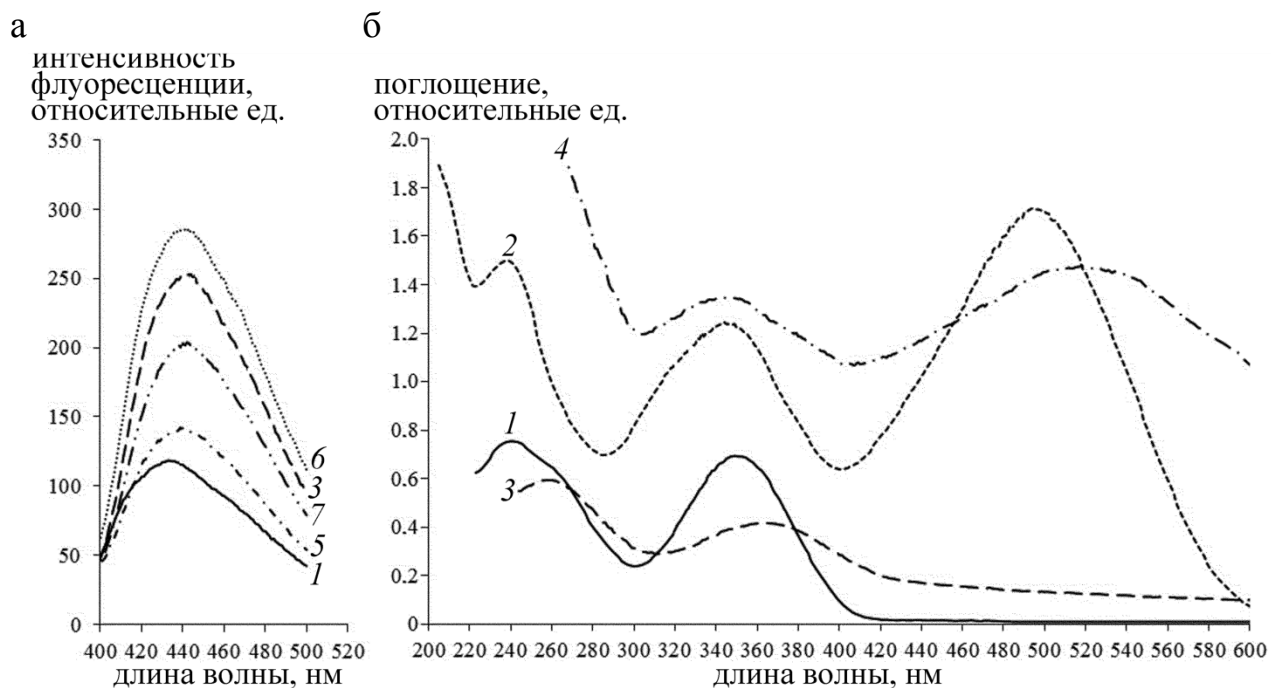


Рисунок 17 – Спектры флуоресценции (а) и поглощения (б) в фосфатном буфере (рН 7.0) растворов красителей калькофлуора (1, 3, 5-7) и конго красного (2, 4) или их комплексов в суспензиях биомассы биопленок *A. baldaniorum* Sp245^T (3, 4), Sp245.1063 (5), Sp245.1610 (6) и SK039 (7).

Необходимо отметить, что помимо глюканов, конго красный взаимодействует с белковыми структурами – амилоидами [176]. Амилоидные структуры в биопленках грамотрицательных бактерий обеспечивают прикрепление микроорганизмов к различным субстратам, в том числе, к поверхности корней растений [216, 176, 63]. Подобные структуры, наряду с полисахаридами, могут оказывать влияние на изменение спектра поглощения конго красного, накопленного в биопленках азоспирилл. При окрашивании биопленок краситель прокрашивает всю биомассу. Препараты окрашенных

пленок изучали методами поляризованной световой микроскопии. При скрещенных поляризаторах в них обнаруживаются яркие пятна желтого/зеленого двулучепреломления (рисунок 16г-з), характерные для комплекса красителя с амилоидными структурами [301]. Не вся окрашенная конго красным биомасса биопленок азоспирилл демонстрирует такой эффект. Расположение желтого/зеленого двулучепреломления соответствует окрашенным бактериальным агрегатам (рисунок 16г-з). С помощью микроскопии неокрашенных биопленок или в растворе красителя подобное двулучепреломление не обнаруживается.

3.4.4 Исследование микроструктуры биопленок азоспирилл

С помощью просвечивающей электронной микроскопии мы изучали более устойчивые к воздействию сил гидродинамического сдвига (раздел 3.2), по сравнению с пленками мутантов, биопленки родительского штамма. Такая устойчивость значительно упрощает процесс подготовки препаратов. За счет напыления тонкого слоя золота на высушенные препараты биопленок увеличивалась контрастность матрикса, в который погружены клетки (рисунок 18а). Для анализа распределения в матриксе внеклеточных гликанов в качестве зонда использовали конъюгат коллоидного золота с АЗП (АЗП-К315), специфичный к *N*-ацетил-*D*-глюкозамину [260, 218]. АЗП не взаимодействует с клетками азоспирилл, отмытыми от ЭПС и капсулы [359], поэтому именно данный лектин был выбран в качестве эффективного зонда для выявления внеклеточных полисахаридов азоспирилл.

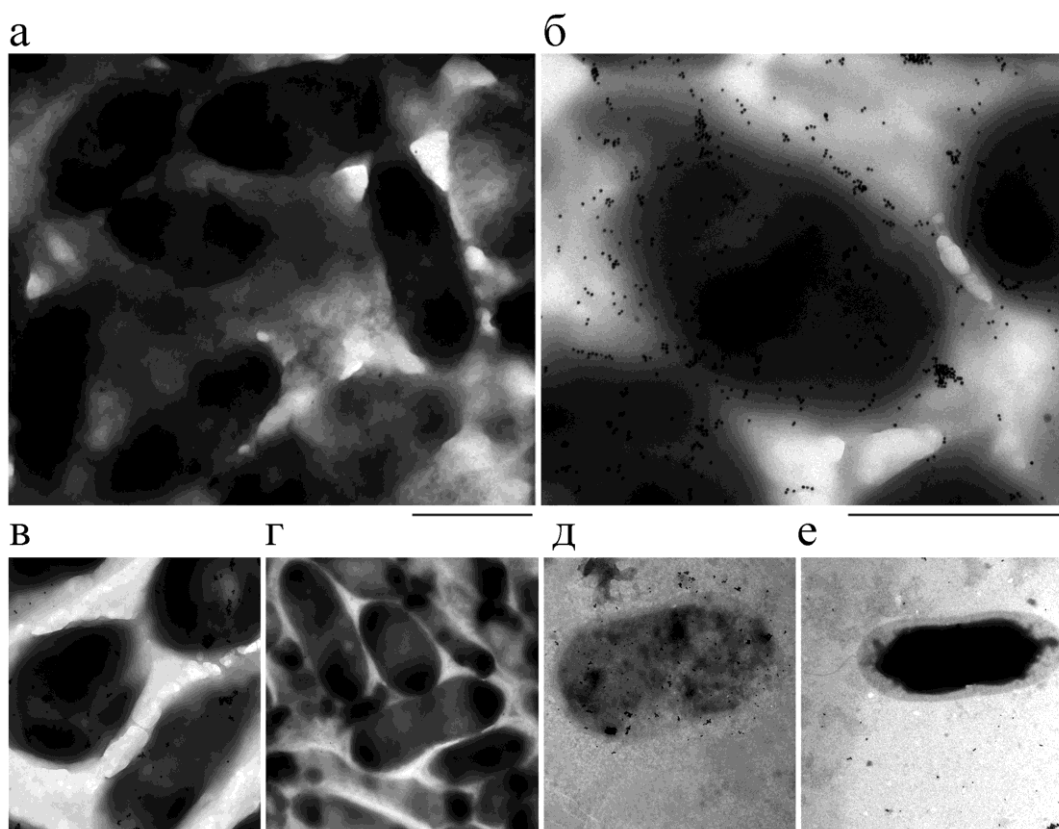


Рисунок 18 – Просвечивающая электронная микроскопия фрагментов биопленок *A. baldaniorum* Sp245^T (а-г) и клеток из планктонных 18-ч культур (д, е) после инкубации с АЗП-К315 (б, в, д), АЗП-К315 + хитотриоза (г, е) или напыления золота (а). Бактерии и биопленки культивировали в жидкой LB. АЗП-К315 – конъюгат коллоидного золота (размер частиц 15 нм) с АЗП. Масштабная линейка соответствует 1 мкм.

Электронная микроскопия биопленок, помеченных АЗП-К315, показала, что зонд распределяется по всей поверхности препарата и образует неоформленные скопления и/или короткие полосы (рисунок 18). Частицы АЗП-К315 также взаимодействуют с соединяющими клетки «мостиками» матрикса (рисунок 18б). Следует подчеркнуть, что АЗП-К315 метит не все подобные структуры (рисунок 18б, в). Так, в контрольных образцах с заблокированным хитотриозой активным центром АЗП частицы К315 не связываются с биопленками, как и с поверхностью планктонных клеток (рисунок 18г, е). Результаты электронной микроскопии продемонстрировали присутствие в составе матрикса зрелых биопленок компонентов, имеющих в своем составе углеводный гаптен, обладающий средством к АЗП. Средство к данному

лектину проявляют содержащие глюкозамин ЛПС-белковый (ЛПБК) и полисахарид-липидный (ПСЛК) комплексы капсулы, а также ЭПС азоспирилл из жидких планктонных культур [359]. Перечисленные комплексы капсульных гликополимеров клеток *Sp245^T* и ЛПС их внешней мембраны содержат идентичные антигенные детерминанты [49]. После сравнения матрикса зрелых биопленок и мембранных ЛПС этого штамма мы идентифицировали общий антиген, причем, в случае мутантов *Sp245.1063*, *Sp245.1610* и *SK039* получены аналогичные данные.

Таким образом, данные электронной микроскопии и иммунохимические исследования согласуются и указывают на присутствие в составе матрикса зрелых биопленок компонентов сложных комплексов гликополимеров капсулы.

Наличие углеводного гаптена, обладающего специфическим сродством к АЗП, в составе матрикса может свидетельствовать о том, что лектин-углеводные взаимодействия являются неотъемлемой частью механизмов, обеспечивающих фиксацию зрелых бактериальных пленок на поверхности корня пшеницы. В процессе колонизации азоспириллами корневой системы растений это может играть немаловажную роль [28].

Особенности взаимодействия анионных красителей калькофлуора и конго красного с биомассой биопленок указывают на наличие в ее составе ПССК–глюканов. Красители после удаления ФБ легкосмываемых компонентов остаются в составе биомассы, что может говорить как о внеклеточной локализации глюканов в составе матрикса биопленок, так и об их локализации внутри клеток. У азоспирилл глюканы, выполняющие функцию осморегуляции, могут располагаться внутри клеток [93]. В составе экстраклеточных полисахаридов азоспирилл глюканы появляются после 2-3 суток культивирования [149]. В этом временном промежутке завершается процесс адгезии азоспирилл, формирующих биопленку на колонизируемой поверхности (раздел 3.1). В зрелой биопленке глюканы/ПССК, помимо комплексов с ЛПС и белковыми структурами в составе, фиксируют ее и выполняют каркасную функцию – обеспечивают адгезию бактерий друг к другу. В матриксе

био пленок всех исследованных штаммов углеводовсодержащие компоненты преобладают над белковыми составляющими. Гликополимеры опосредуют прикрепление био пленок преимущественно к поверхностям с гидрофильными свойствами, что наиболее очевидно в случае имеющих дефекты в жгутиковании мутантов по генам *flhB1*, *fabG1* и предполагаемому гену *mmsB1*. Био пленки этих производных, образованные на стекле, после инкубации с окислителем гликополимеров теряют на 20-35% больше биомассы, чем родительский штамм Sp245^T.

Получены первичные косвенные данные о наличии в биомассе био пленок азоспирилл структур амилоидной природы. Амилоиды обнаружены у многих микроорганизмов и участвуют в разнообразных процессах, в частности, необходимы для образования био пленок [63].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В качестве основного объекта данного исследования выбран штамм *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T – модельный штамм для исследований ассоциативных растительно-микробных взаимодействий [102, 97, 28, 227]. При образовании растительно-микробной ассоциации не происходит формирование каких-либо специализированных структур, подобных клубенькам бобово-ризобиального симбиоза. Доказательствами, подтверждающими факт возникновения ассоциативного симбиоза, являются: сродство бактериальных лектинов к клеткам растений [56], увеличение продукции полисахарида [298], активность прикрепления бактерий на корнях [24], способность микробных культур к агрегации и флокуляции [57] и так далее. Микроорганизмы, закрепившиеся на поверхности растения, образуют клеточные агрегаты и биопленки [132]. Формирование биопленок также может являться важным признаком образования и функционирования микробной ассоциации с растениями [81].

Азоспириллы являются подвижными бактериями. Полярный жгутик, синтезируемый клетками в жидких и на плотных средах, необходим азоспириллам для движения, а также для закрепления на поверхности корней растений [373, 196, 141]. При культивировании на твердых и полужидких питательных средах азоспириллы, помимо полярного жгутика, имеют многочисленные дополнительные латеральные жгутики. В данной работе в качестве объекта изучения помимо *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T использованы его производные с нарушениями в образовании и функционировании жгутиков. Сравнительный анализ образования пленок штаммом *A. baldaniorum* Sp245^T и его мутантами позволил получить первичную информацию о характерных для этих бактерий и универсальных механизмах, обеспечивающих формирование сложной архитектуры биопленочных сообществ.

На начальном этапе была исследована динамика образования биопленок культурами штамма *A. baldaniorum* Sp245^T и его инсерционного *flhB1* мутанта (Sp245.1063), утратившего способность к синтезу полярного и латеральных жгутиков, в стационарных условиях инкубирования на границе раздела фаз жидкость – твердая гидрофильная поверхность. На примере дикого и мутантного штаммов (Sp245^T и Sp245.1063) нами проанализирован процесс формирования бактериальной биопленки и продемонстрированы все его этапы: адсорбция, адгезия, прирост и стабилизация биомассы. Вероятно, на начальных стадиях образования биопленки – прикрепление и адгезия бактерий на поверхности стекла – способность клеток синтезировать жгутики (клетки мутанта Sp245.1063) не играет существенной роли. Данное наблюдение подтверждено результатами, полученными при использовании двух других мутантов с нарушением продукции и функционирования двигательных органелл (Sp245.1610 и SK039). С помощью методов микроскопии показано, что на стадии адгезии бактерии всех использованных в работе штаммов образовали тонкие пленки, состоящие из разрозненных клеточных агрегатов. После 2 суток инкубирования штамма *A. baldaniorum* Sp245^T Sp245.1063 и Sp245.1610 и после 3-х суток культивирования SK039 микроколонии сливались в биопленку с более ровной поверхностью, и начиналась стадия прироста биомассы биопленки (в случае мутанта SK039 продолжительность стадии прикрепления и адгезии бактерий к твердой поверхности увеличивается). Таким образом, прикрепление бактерий к поверхности происходило вне зависимости от их способности синтезировать флагеллы, но отсутствие полярного жгутика у соответствующего мутанта может оказать влияние на продолжительность адгезии бактериальных клеток к модельной поверхности. Нужно отметить, что, начиная со 2-х суток инкубирования, все анализируемые штаммы нередко формировали биопленку также и на поверхности бульонной среды, которая со временем оседала под слой жидкости.

Важным наблюдением за динамикой образования биопленок культурами штамма *A. baldaniorum* Sp245^T и его инсерционного *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. Известно, что плотность популяции, обмен информацией между отдельными клетками очень важны для образования биопленок [237, 285]. В случае азоспирилл, как минимум прирост биомассы в период формирования биопленок зависит от этого параметра. Дальнейшее развитие биопленочных сообществ этих бактерий во многом обуславливают поверхностные структуры бактериальных клеток. В биопленках мутанта Sp245.1063, образованных на разделе фаз жидкость – твердая гидрофильная поверхность, количество биомассы стабилизировалось к 4-5 суткам инкубации, а в случае родительского штамма это происходило позже – после 6 дней инкубации. Начиная с 5-х суток инкубации, толщина пленок Sp245.1063 под жидкой средой оказывалась существенно ниже показателей штамма Sp245^T. Такие отличия от показателей родительского штамма появляются и в случае Sp245.1610 и SK039 к 5-м суткам инкубации и зависят от состава среды инкубации и степени гидрофобности колонизируемого субстрата.

Интересно, что некоторые штаммы азоспирилл способны реагировать на внешние факторы межклеточной коммуникации, что может влиять на их адаптационный потенциал при формировании межвидовых популяций. Например, на формирование биопленки, синтез ЭПС и подвижность клеток штамма *A. brasilense* Ab-V5 влияют внешние лактоны N-ацил-гомосерина [180, 159].

Наружный слой зрелых биопленок *A. baldaniorum* Sp245^T состоит из кластеров бактерий (в среднем из (5 ± 1) клеток), плотно прилегающих друг к другу вдоль своей длинной оси. Обратная картина наблюдалась в случае мутанта Sp245.1063 – биопленки образовывали бактерии с разреженным расположением клеток. Общим признаком для зрелых биопленок всех анализируемых в работе штаммов является присутствие везикул разного размера, чаще детектируемых в образцах с раздела жидкость/воздух, чем с

твёрдой поверхности. Такие везикулы образуются из компонентов наружной мембраны грамотрицательных бактерий и содержат фосфолипиды, ЛПС, ферменты и нуклеиновые кислоты [174].

В препаратах фиксированных нативных биопленок *Sp245^T* при атомно-силовой микроскопии обнаружены клетки с полярным жгутиком, интегрированные в биопленку. У неподвижного мутанта *Sp245.1063* биопленки состояли из бактерий без жгутиков. У клеток *Sp245^T* так же, как в случае его мутанта, отсутствовали латеральные жгутики. Очевидно, наличие активного полярного жгутика в поверхностном слое жидкости позволяет клеткам дикого типа формировать биопленку без дополнительных энергетических затрат на синтез латеральных флагелл. Благодаря подвижности бактерии поддерживают архитектуру пленок и могут освобождаться из зрелых биопленок [321, 344, 193]. Переход к существованию в составе биопленок у многих микроорганизмов сопровождается подавлением активности жгутиков и их синтеза [321, 344, 384, 193]. Оказалось, что клетки штамма *Sp245^T*, использующие полярный жгутик для движения и адгезии, продолжают синтезировать эту флагеллу, оказавшись интегрированными в состав зрелой пленки. Возможно, данная способность позволяет азоспириллам, в том числе, сохранять целостность биопленки в случае такого воздействия, как гидродинамический сдвиг на границе раздела между жидкой и плотной средой.

Нами произведен сравнительный анализ биопленок, образованных штаммом *Sp245^T*, мутантом *Sp245.1063* (количество биомассы биопленок уступает аналогичному показателю родительского штамма) и их производными, различающимися по продукции жгутиков, на границах раздела между минимальной или богатой жидкой питательной средой и гидрофильной или гидрофобной твёрдой поверхностью в статических или динамических условиях. В случае родительского штамма покачивание/перемешивание среды существенным образом не оказывает влияние на образование его биопленок. Во всех экспериментальных условиях количество биомассы в зрелых биопленках было частично (в MSM) или полностью (в LB) восстановлено у компонента

Sp245.1063 (pRK415–150177), который получил в составе вектора pRK415 последовательность предполагаемого белка FlhB1 жгутиковой системы секреции III типа. Хотя Laf не был найден в биопленках азоспирилл, Fla присутствовал на клетках из биопленок комплементарного мутанта Sp245.1063 (pRK415–150177) и др. изучаемых штаммов, которые имели нормальное жгутирование на жидких и твердых питательных средах соответственно. Зрелые биопленки этих штаммов содержали больше биомассы и были значительно более устойчивы, как и родительский штамм, к встряхиванию по сравнению с биопленками мутантных бактерий без жгутиков. Полученные данные доказали, что присутствие полярного жгутика (возможно, парализованного) на клетках из биопленок *A. baldaniorum* 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. Полученные данные представляют фундаментальный интерес, поскольку они расширяют существующие представления о роли жгутикования (в основном это органелла, обеспечивающая подвижность) в прикрепленной жизни бактерий.

Клетки с латеральными жгутиками не встречались в биопленках *A. baldaniorum* Sp245^T на границе раздела жидкость – твердая поверхность. Аналогичные данные о незначительной роли Laf для развития биопленки *V. parahaemolyticus* на абиотических поверхностях были получены Enos-Berlage *et al.* [164]. Однако, как и у некоторых видов *Aeromonas* [185, 286], *Vibrio parahaemolyticus* Laf необходим для формирования биопленки на тканях животных [314]. Таким образом, вполне возможно, что у *A. baldaniorum* Sp245^T Laf также может играть роль в создании биопленки в еще не описанных, пока неизвестных условиях.

В данной работе показано, что инактивация предполагаемых генов липидного метаболизма *fabG1* и *mmsB1* у бактерий *A. baldaniorum* Sp245^T помимо описанных ранее дефектов в жгутиковании и подвижности клеток [40], 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 (Sp245.1610 и SK039). Аналогичные множественные изменения фенотипа в результате иной модификации липида А были описаны у альфапротеобактерий из порядка *Rhizobiales* [381, 382]. Стоит отметить, что жирные кислоты могут выполнять функцию сигналов межклеточной коммуникации; они входят в состав биосурфактантов, способствующих перемещению ряда бактерий по колонизируемым поверхностям. Обнаружена взаимосвязь между профилем жирных кислот клеток некоторых бактерий и их способностью к роению [240]. Подвижность необходима бактериям не только при инициации формирования или дисперсии биопленок, но также для создания архитектуры пленочных сообществ [193].

С целью получить больше данных о биологической роли *mmsB1*, были проанализированы фенотипические последствия комплементации мутанта SK039 CDS *mmsB1* штамма Sp245^T, клонированного в векторе экспрессии pRK415. Показано, что введение плазмиды pRK415 с CDS *mmsB1* штамма Sp245^T оказало значительное положительное влияние на накопление биомассы в биопленках комплементарным мутантом как на гидрофильной, так и на гидрофобной поверхностях. Это свидетельствует о том, что снижение накопления биомассы мутантом SK039 в биопленке вызвано именно инактивацией *mmsB1*. 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). Пока неясно, почему процесс накопления биомассы биопленки в комплементарном штамме SK039 (pRK415-*mmsB1*), выращенном на MSM, восстановлен частично. Возможно, причиной этому послужило отсутствие родного промотора и предполагаемых регуляторных последовательностей выше *mmsB1* в конструкции pRK415-*mmsB1*.

Прикрепление некоторого количества бактерий в биопленках обуславливает взаимодействия, чувствительные к изменению таких условий, как рН и/или, вероятно, ионная сила. Биомасса биопленок азоспирилл может уменьшаться из-за изменения данных физико-химических параметров среды, окружающей пленки. Часть клеток биопленки при таких условиях переходит в жидкую фазу. Диссоциация подвижных клеток родительского штамма и неподвижных пленок мутантов происходит одинаково: бактерии или свободно существуют, или находятся в составе агрегатов. Диссоциация биопленок является финальным этапом их формирования и развития. Распад биопленок возможен и в ответ на изменения окружающей среды [18]. Таким образом, азоспириллы могут быстро покинуть пленку в момент ее диссоциации благодаря наличию определенного числа особей, непрочно зафиксированных в биопленках.

Микроорганизмы, находящиеся в бактериальных биопленках, заключены в матрикс [174]. Внеклеточный матрикс выполняет много разных функций. Он является каркасом биопленки, выполняет функцию защитного слоя, служит резервуаром ростовых факторов и ферментов. Матрикс сильно гидратирован, медленно высыхает. Основой матрикса биопленок является смесь ЭПС, белков, нуклеиновых кислот и других биополимеров. Наличие в биопленках белковых компонентов амилоидной природы, связывающих краситель конго красный, обеспечивает их устойчивость к изменениям факторов окружающей среды, таких как гидрофобность, концентрация соли, рН, температура, давление, влияние денатурирующих агентов и протеиназ [176, 63]. Жгутики, пили и другие органеллы бактерий тоже интегрированы в матрикс биопленок. Разнообразие компонентов матрикса можно сопоставить с числом бактериальных видов, формирующих пленки [174, 132]. Изучение этих элементов поможет лучше понять механизмы формирования и дисперсии биопленок, а также подобрать подходы, необходимые для управления данными процессами в экологических, медицинских и биотехнологических целях-[63].

В данной работе исследованы структура и функции биополимеров матрикса биопленок *A. baldaniorum* 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 преобладают над белковыми и 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. Поверхность корня является более гетерогенной, по сравнению с использованными в данной работе модельными поверхностями стекла или полистирола, и представлена, в частности, стенкой растительных клеток и муцигелем, сформированным полисахаридами и белками, секретлируемыми растением [76]. Агглютинин корней пшеницы аналогичен лектину зародышей [359]. Присутствие в составе матрикса биопленок азоспирилл гаптена АЗП указывает на то, что специфические лектин – углеводные взаимодействия могут быть неотъемлемой частью механизмов, опосредующих фиксацию зрелых бактериальных пленок на поверхности корня пшеницы.

Впервые получены косвенные данные о наличии в биомассе биопленок азоспирилл структур амилоидной природы. Так, в биопленках, окрашенных конго красным, благодаря поляризованной световой микроскопии обнаруживаются яркие пятна желтого/зеленого двойного лучепреломления. Взаимодействие белковых структур с конго красным, которое, в некоторой

степени, способствует изменению спектра поглощения красителя, наряду с двойным лучепреломлением его комплекса с ними, являются основными критериями первичной идентификации амилоидных фибрилл как *in vivo*, так и *in vitro* [301]. Пили, курли (curli, от англ. «curl» – завиток), тафи (tafi, от англ. «thin aggregative fimbriae» – тонкие агрегирующие нити), гидрофобины класса I, адгезины и токсины микроорганизмов обладают свойствами амилоидов [216, 176, 63].

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 [63].

ВЫВОДЫ

1. Адсорбция и адгезия клеток, прирост и стабилизация биомассы являются основными этапами образования биопленок бактериями *Azospirillum baldaniorum* Sp245^T на интерфазе 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 лишеного 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 агглютинину 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЗП	— агглютинин зародыша пшеницы;
АСМ	— атомно-силовая микроскопия;
Ат	— антитело;
ВПС	— внеклеточный полисахарид;
ГЖХ	— газо-жидкостная хроматография;
ЖК	— жирная кислота;
ИФА	— иммуноферментный анализ;
КПС	— капсульный полисахарид (или К-антиген);
ЛПБК	— липополисахарид-белковый комплекс капсулы;
ЛПС	— липополисахарид;
МАБ	— метил-акцептирующий белок;
МЭЖК	— метиловые эфиры жирных кислот;
ОПС	— О-специфический полисахарид (или О-антиген);
ПСЛК	— полисахарид-липидный комплекс;
ПССК	— поверхностные полисахариды, связывающие калькофлуор;
т.п.н.	— тысяча пар нуклеотидов;
ФБ	— фосфатный буфер;
ФСБ	— фосфатно-солевой буфер;
эДНК	— экстрацеллюлярная ДНК;
ЭДТА	— этилендиаминтетрауксусная кислота;
ЭПС	— экзополисахарид;
Ads	— адсорбция (adsorption);
Anc	— заякоривание (anchor);
Cal	— калькофлуор;
CDS	— кодирующий участок / последовательность гена (from coding sequence);
Che	— хемотаксис (chemotactic);

Fla	— полярный жгутик (polar flagellum);
Km	— канамицин;
Laf	— латеральный жгутик (lateral flagella);
LB	— питательная среда Luria–Bertani;
MSM	— малатно-солевая питательная среда (malate salt medium);
Mot	— подвижность (motility);
PGPB или PGPR	— ризобактерии, стимулирующие рост растений (plant growth-promoting bacteria или plant growth-promoting rhizobacteria);
QS	— ощущение кворума (quorum sensing);
Swa	— роение; (swarming motility)
Twin-20	— полисорбат 20;
Tc	— тетрациклин.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Алметов, Н.С. Применение биопрепарата азоризин – надежный способ повышения продуктивности и качества урожая ячменя / Н.С. Алметов, В.Р.Габдуллин, А.А. Алферов // *Агрехим. вестник*. – 2016. – №2. – С. 44–47.
2. Антонюк, Л.П. Растительные лектины как факторы коммуникации в симбиозах // *Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями* / Под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. – С. 118–159.
3. Басилашвили, Л.А. Распространение азоспирилл в некоторых почвах Грузии / Л.А.Басилашвили, Н.Н. Нуцубидзе // *Сообщ. АН Грузин. ССР*. – 1984. – Т. 114, № 3. – С. 617–620.
4. Белимов, А.А. Взаимодействия ассоциативных растений с бактериями. Роль биотических и абиотических факторов: монография / Saarbrücken: Palmarium Acad. Publ., 2012. – 225 с.
5. Беляков, А.Е. Гликозилированный флагеллин полярного жгутика бактерий рода *Azospirillum*: выделение и свойства: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.01.04 / Беляков Алексей Евгениевич. – Саратов, 2011. – 20 с.
6. Березовская, Е.С. Биопленки при бактериальном вагинозе / Е.С. Березовская, И.О.Макаров, М.А. Гомберг, Е.И. Боровкова, Е.А. Чулкова, Л.А. Аракелян // *Акуш., гинекол., репрод.* – 2013. – Т. 7, № 2. – С. 34–36.
7. Берестецкий, О.А. Азотфиксирующая активность в ризосфере и на корнях небобовых растений / О.А. Берестецкий, Л.Ф. Васюк // *Изв. АН СССР, серия биол.* № 1. – 1983. – С. 44–50.
8. Бойко, А.С. Структурные особенности липополисахаридов азоспирилл в связи с их участием в коммуникации микроорганизмов в ризосфере: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.04 / Бойко Алевтина Сергеевна. – Саратов, 2009. – 24 с.

9. Бурыгин, Г.Л. Сравнительное исследование О- и Н-антигенов почвенных бактерий рода *Azospirillum*: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.07 / Бурыгин Геннадий Леонидович. – Саратов, 2003. – 22 с.
10. Бурыгин, Г.Л. Выявление чехла на поверхности полярного жгутика *Azospirillum brasilense* / Г.Л. Бурыгин, А.А. Широков, А.В. Шелудько, Е.И. Кацы, С.Ю. Щеголев, Л.Ю. Матора // Микробиол. – 2007. – Т. 76, № 6. – С. 822–829.
11. Бухарин, О.В. Межбактериальные взаимодействия / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвяцов, Л.М. Хуснутдинова // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. – 2003. – № 4. – С. 3–8.
12. Бухарин, О.В. Симбиоз и его роль в инфекции: монография / О.В. Бухарин, Е.С. Лобакова, Н.Б. Перунова, Б.Я. Усвяцов, С.В. Черкасов; под ред. О.В. Бухарина. – Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – 301 с.
13. Волошин, С.А. Межклеточные взаимодействия в бактериальных популяциях / С.А. Волошин, А.С. Капрельянц // Биохим. – 2004. – Т. 69, № 11. – С. 1555–1564.
14. Волошин, С.А. Роль межклеточных контактов для инициации роста и образования временно некультивируемого состояния культурой *Rhodococcus rhodochrous* при развитии на бедных средах / С.А. Волошин, М.О. Шлеева, А.В. Сыроешкин // Микробиол. – 2005. – Т. 74. – С. 489–497.
15. Глаголев, А.Н. Таксис у бактерий // Успехи микробиол. – 1983. – Т. 18. – С. 163–192.
16. Головачева, Р.С. Жгутиковый аппарат археобактерий рода *Sulfurococcus* / Р.С. Головачева, Н.В. Жилина // Микробиол. – 1988. – Т. 57. – С. 516–518.
17. Голошва, Е.В. Биопленкообразование неферментирующих бактерий / Е.В. Голошва, А.В. Алешукина, Т.И. Твердохлебова // Эпидемиол. и инфекц. болезни. Акт. вопр. – 2015. – № 6. – С. 62–65.

18. Голуб, А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 23–29.
19. Гостев, В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журн. инфектол. – 2010. – Т. 2, № 2. – С. 4–15.
20. Громов, Б.В. Строение бактерий: учебное пособие / Под ред. Б.В. Громова. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1985. – 189 с.
21. Далин, М.В. Адгезины микроорганизмов / М.В. Далин, Н.Г. Фиш // Итоги науки и техники. М.: ВИНТИ, сер.: Микробиол. / Под ред. В.И. Огаркова. – 1985. – Т. 16. – 107 с.
22. Дебабов, В.Г. Жизнь бактерий за стенами лабораторий // Молекул. биол. – 1999. – Т. 33, № 6. – С. 1074–1084.
23. Дыкман, Л.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев // Успехи хим. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 199–213.
24. Егоренкова, И.В. Роль полисахаридсодержащих компонентов капсулы *Azospirillum brasilense* в адсорбции бактерий на корнях проростков пшеницы / И.В. Егоренкова, С.А. Коннова, Ю.П. Федоненко, Л.А. Дыкман, В.В. Игнатов // Микробиол. – 2001. – Т. 70, № 1. – С. 45–50.
25. Зайцева, Ю.В. Молекулярно-генетические особенности Quorum Sensing систем грамотрицательных бактерий (на модели *Serratia*) и изучение их роли в регуляции клеточных процессов: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.02.07 / Зайцева Юлия Владимировна. – Москва, 2012. – 24 с.
26. Звягинцев, Д.Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. – М.: Изд-во МГУ, 1973. – 176 с.
27. Иванчина, Н.В. Влияние ростстимулирующих бактерий (PGPB) на продуктивность и устойчивость растений / Н.В. Иванчина, С.Р. Гарипова // Агрехим. – 2012. – № 7. – С. 87–95.

28. Игнатов В.В. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями: монография / Под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. – 262 с.

29. Ильина, Т.С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Генетика. – Т. 40, № 11. – 2004. – С. 1445–1456.

30. Кабанов, Д.С. Структурный анализ липополисахаридов грамотрицательных бактерий / Д.С. Кабанов, И.Р. Прохоренко // Биохим. – 2010. – Т. 75, № 4. – С. 469–491.

31. Калининская, Т.А. Применение ацетиленового метода для количественного учета разных групп азотфиксаторов методом предельных разведений / Т.А. Калининская, Т.В. Редькина, Ю.М. Белов // Микробиол. – 1981. – Т. 50, № 5. – С. 924–928.

32. Карпунина, Л.В. Роль агглютинирующих белков ризобий и азотфиксирующих бацилл при взаимодействии с растениями // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. – С. 98–117.

33. Кацы, Е.И. Генетико-биохимические и экологические аспекты подвижности и хемотаксиса у фитопатогенных, симбиотических и ассоциированных с растениями бактерий // Успехи соврем. биол. – 1996. – Т. 116. – С. 579–593.

34. Кацы, Е.И. Свойства и функции плазмид, ассоциированных с растениями бактерий рода *Azospirillum* // Успехи соврем. биол. – 2002. – Т. 122. – С. 353–364.

35. Кацы, Е.И. Молекулярно-генетические процессы, влияющие на ассоциативное взаимодействие почвенных бактерий с растениями: монография / Под ред. В.В. Игнатова. – Саратов: Изд-во Сарат. Ун-та, 2003. – 167 с.

36. Кацы, Е.И. Молекулярно-генетический анализ ассоциативного взаимодействия бактерий и растений // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. – С. 17–45.

37. Кацы, Е.И. Молекулярная генетика ассоциативного взаимодействия бактерий и растений: состояние и перспективы исследований: монография / Под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2007. – 86 с.

38. Кацы, Е.И. Влияние плазмидного состава на реакции хемотаксиса у ассоциированных со злаками бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 / Е.И. Кацы, И.В. Борисов, А.Б. Машкина, В.И. Панасенко // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 1994. – № 2. – С. 29–32.

39. Клименко, Н.А. Удаление биопленки с активных углей при эксплуатации промышленных адсорбционных фильтров / Н.А. Клименко, Г.М. Здоровенко, И.А. Шевчук, Л.Р. Решетняк, И.Ю. Рой, Л.К. Патюк // Химия и технология воды. – 2013. – Т. 35, № 1. – С. 76–87.

40. Ковтунов, Е.А. Инсерция транспозона в хромосомную копию гена *flhB* сопровождается дефектами в образовании полярного и латеральных жгутиков у бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 / Е.А. Ковтунов, Л.П. Петрова, А.В. Шелудько, Е.И. Кацы // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 8. – С. 1013–1016.

41. Коннова, С.А. Экзополисахариды бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 и Sp107: дис... д-ра биол. наук. – М.: Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 2002. – 367 с.

42. Коннова, С.А. Полисахаридсодержащие комплексы, выделяемые *Azospirillum brasilense*, и их возможная роль во взаимодействии бактерий с корнями пшеницы / С.А. Коннова, И.М.Скворцов, О.Е. Макаров, Р.Н. Прохорова, Т.А. Рогова, В.В. Игнатов // Микробиол. – 1995. – Т. 64. – С. 762–768.

43. Коннова, С.А. Структура и функции гликополимеров поверхности азоспирилл / С.А. Коннова, Ю.П. Федоненко, В.В. Игнатов // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. – С. 46–69.
44. Лабутова, Н.М. Методы изучения почвообитающих микроорганизмов: учебное пособие / Н.М. Лабутова. – Изд.: СПбГУ, 2009. – 489 с.
45. Лапа, В.В. Эффективность бактериальных удобрений Азобактерин и Калиплант при возделывании зерновых культур на эродированных дерново-подзолистых суглинистых почвах / В.В. Лапа, Н.А. Михайловская, С.А. Касьянчик, Н.Н. Цыбулько, Т.Б. Барашенко // Агрехим. – 2020. – С. 28–36.
46. Мальцева, Н.Н. Азотфиксирующая бактерия *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) в почве, ризосфере и ризоплане сельскохозяйственных растений / Н.Н. Мальцева, В.В. Волкогон // Микробиол. – 1984. – Т. 46, № 1. – С. 6–8.
47. Мальцева, Н.Н. Активность азотфиксации и азотфиксирующие микроорганизмы ризосферы озимой ржи // Микробиол. журн. – 1992. – Т. 54. – С. 10–16.
48. Матора, Л.Ю. Иммунохимический анализ О-специфических полисахаридов почвенных азотфиксирующих бактерий *Azospirillum brasilense* / Л.Ю. Матора, Б.И. Шварцбург, С.Ю. Щеголев // Микробиол. – 1998. – Т. 67, № 6. – С. 815–820.
49. Матора, Л.Ю. Антигенная идентичность липополисахаридов, капсулы и экзополисахаридов *Azospirillum brasilense* / Л.Ю. Матора, С.Ю. Щеголев // Микробиол. – 2002. – Т. 71, № 2. – С. 211–214.
50. Матора, Л.Ю. Иммунохимическая идентификация азоспирилл и исследование их антигенных структур / Л.Ю. Матора, В.А. Богатырев, Л.А. Дыкман, С.Ю. Щеголев // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. – С. 209–237.

51. Маянский, А.Н. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса / А.Н. Маянский, И.В. Чеботарь, Е.И. Руднева, В.П. Чистякова // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 2012. – № 1. – С. 3–8.
52. Михайловская, Н.А. Влияние бактериального удобрения Азобактерин на урожайность многолетних трав, качество и аккумуляцию радионуклидов ^{137}Cs и ^{90}Sr / Н.А. Михайловская, Т.Б. Барашенко, С.В. Дюсова, П.Т. Пикун, Г.В. Жила // Почвовед. агрохим. – 2014. – № 1 (52). – С. 333–347.
53. Михайловская, Н.А. Азоспириллы и их влияние на злаковые культуры (обзор литературы) // Почвовед. агрохим. – 2015. – № 2 (55). С. 160–180.
54. Михайловская, Н.А. Влияние моно- и бинарных инокулянтов на урожайность и фитопатологическое состояние посевов зерновых культур на дерново-подзолистых легкосуглинистых эродированных почвах / Н.А. Михайловская, Д.В. Войтка, Н.Н. Цыбулько, А.М. Устинова, Т.Б. Барашенко, С.В. Дюсова // Почвовед. и агрохим. – 2020. – С. 220–232.
55. Нетрусов, А.И. Экология микроорганизмов: учебник для студентов вузов / А.И. Нетрусов, Е.А. Бонч-Осмоловская, В.М. Горленко, М.В. Иванов, Г.И. Каравайко, П.А. Кожевин, Н.Н. Колотилова, И.Б. Котова, В.Н. Максимов, А.Н. Ножевникова, А.М. Семенов, Т.П. Турова, Т.Г. Юдина; под общ. ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2004. – 272 с.
56. Никитина, В.Е. Изучение роли лектинов клеточной поверхности азоспирилл во взаимодействии с корнями пшеницы / В.Е. Никитина, С.А. Аленькина, Е.Г. Пономарева, Н.Н. Савенкова // Микробиол. – 1996. – Т. 65, № 2. – С. 165–170.
57. Никитина, В.Е. Участие бактериальных лектинов клеточной поверхности в агрегации азоспирилл / В.Е. Никитина, Е.Г. Пономарева, С.А. Аленькина, С.А. Коннова // Микробиол. – 2001. – Т. 70, № 4. – С. 471–476.
58. Никитина, В.Е. Лектины клеточной поверхности азоспирилл и их роль в ассоциативных взаимодействиях с растениями / В.Е. Никитина, Е.Г.

Пономарева, С.А. Аленькина // Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / Под ред. В.В. Игнатова. – М.: Наука, 2005. – С. 70–97.

59. Николаев, Ю.А. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиол. – 2007. – Т. 76. – С. 149–163.

60. Новик, Г.И. Архитектоника популяций бифидобактерий: субмикроскопический аспект когезии клеток *Bifidobacterium adolescentis* и *Bifidobacterium bifidum* / Г.И. Новик, В.В. Высоцкий // Микробиол. – 1995. – Т. 64, № 2. – С. 222–227.

61. Олескин, А.В. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов / А.В. Олескин, И.В. Ботвинко, Е.А. Цавкелова // Микробиол. – 2000. – Т. 69. – С. 309–327.

62. Плакунов, В.К. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках / В.К. Плакунов, Е.А. Стрелкова, М.В. Журина // Микробиол. – 2010. – Т. 79, № 4. – С. 447–458.

63. Плакунов, В.К. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты / В.К. Плакунов, С.В. Мартьянов, Н.А. Тетенева, М.В. Журина // Микробиол. – 2017. – Т. 86, № 4. – С. 402–420.

64. Сафронова, И.Ю. Межклеточный матрикс *Bacillus subtilis* 271: полимерный состав и функции / И.Ю. Сафронова, И.В. Ботвинко // Микробиол. – 1998. – Т. 67, № 1. – С. 55–60.

65. Северина, Л.О. Бактериальные S-слои // Микробиол. – 1995. – Т. 64, № 6. – С. 725–733.

66. Скулачев, В.П. Энергетика биологических мембран. – М.: Наука, 1989. – 564 с.

67. Смирнова, Т.А. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова, Л.В. Диденко, Р.Р. Азизбекян, Ю.М. Романова // Микробиол. – 2010. – Т. 79, № 4. – С. 435–446.
68. Стрелкова, Е.А. Действие стрессовых факторов на бактериальные биопленки с дефектом структуры внеклеточного полимерного матрикса: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Москва, 2013. – 26 с.
69. Тихонович, И.А. Симбиогенетика микробно-растительных взаимодействий / И.А. Тихонович, Н.А. Проворов // Экол. генет. – 2003. – Т. 1, № 1. – С. 36–46.
70. Умаров, М.М. Ассоциативная азотфиксация. – М.: МГУ, 1986. – 132 с.
71. Федоненко, Ю.П. Участие липополисахаридов азоспирилл во взаимодействии с поверхностью корней пшеницы / Ю.П. Федоненко, И.В. Егоренкова, С.А. Коннова, В.В. Игнатов // Микробиол. – 2001. – Т. 70, № 3. – С. 384–390.
72. Федоненко, Ю.П. Сравнительная характеристика липополисахаридов и О-специфических полисахаридов *Azospirillum brasilense* Sp245 и его омегон-Км мутантов КМ018 и КМ252 / Ю.П. Федоненко, Э.Л. Здоровенко, С.А. Коннова, В.В. Игнатов, Г.В. Шляхтин // Микробиол. – 2004. – Т. 73, № 2 – С. 180–187.
73. Федорова, Л.С. Выделение азоспирилл из культурных и дикорастущих злаков Саратовской области / Л.С. Федорова, Л.И. Позднякова, С.В. Каневская // Микробиол. – 1985. – Т. 54, № 4. – С. 684–685.
74. Филипьева, Ю.А. О вкладе агрегации клеток и экстраклеточной ДНК в формирование и стабилизацию биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* / Ю.А. Филипьева, Е.М. Телешева, С.С. Евстигнеева, А.В. Шелудько, Е.Г. Пономарева, Л.П. Петрова, Е.И. Кацы // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. – 2018. – Т. 18, №4. – С. 399-406.

75. Хмель, И.А. Quorum–sensing регуляция экспрессии генов: фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий // Микробиол. – 2006. – Т. 75, № 4. – С. 457–464.

76. Шелудько, А.В. Получение и характеристика мутантов модельного штамма ассоциативных бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 по продукции и функционированию полярного и латеральных жгутиков: дис... канд. биол. наук: 03.00.07 / Шелудько Андрей Вячеславович. – Саратов: РосНИПЧИ «Микроб», 2000. – 115 с.

77. Шелудько, А.В. Образование на клетке *Azospirillum brasilense* полярного пучка пилей и поведение бактерий в полужидком агаре / А.В. Шелудько, Е.И. Кацы // Микробиол. – 2001. – Т. 70, № 5. – С. 662–667.

78. Шелудько, А.В. Влияние конго красного на подвижность бактерий *Azospirillum brasilense* / А.В. Шелудько, И.В. Борисов, В.А. Крестиненко, В.И. Панасенко, Е.И. Кацы // Микробиол. – 2006. – Т. 75, № 1. – С. 62–69.

79. Шелудько, А.В. Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* / А.В. Шелудько, О.В. Кулибякина, А.А. Широков, Л.П. Петрова, Л.Ю. Матора, Е.И. Кацы // Микробиол. – 2008. – Т. 77, № 3. – С. 358–363.

80. Шелудько, А.В. Гемагглютинирующая активность и подвижность бактерий *Azospirillum brasilense* в присутствии разных источников азота / А.В. Шелудько, Е.Г. Пономарева, О.Э. Варшаломидзе, Е.П. Ветчинкина, Е.И. Кацы, В.Е. Никитина // Микробиол. – 2009. – Т. 78, № 6. – С. 749–756.

81. Шелудько, А.В. Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью / А.В. Шелудько, А.А. Широков, М.К. Соколова, О.И. Соколов, Л.П. Петрова, Л.Ю. Матора, Е.И. Кацы // Микробиол. – 2010. – Т. 79, № 5. – С. 696–704.

82. Шелудько, А.В. Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта

бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков / А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьевичева, Е.М. Шумилова, Б.Н. Хлебцов, А.М. Буров, Л.П. Петрова, Е.И. Кацы // Микробиол. – 2015. – Т. 84, № 2. – С. 175–183.

83. Шелудько, А.В. Характеристика углеводсодержащих компонентов биопленок *Azospirillum brasilense* Sp245 / А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьевичева, Е.М. Телешева, А.М. Буров, С.С. Евстигнеева, Г.Л. Бурыгин, Л.П. Петрова // Микробиол. – 2018. – Т. 87, № 5. – С. 483–494.

84. Шелудько, А.В. Анализ ультраструктуры клеток в составе биопленок бактерий *Azospirillum brasilense* / А.В. Шелудько, Д.И. Мокеев, С.С. Евстигнеева, Ю.А. Филипьевичева, А.М. Буров, Л.П. Петрова, Е.Г. Пономарева, Е.И. Кацы // Микробиол. – 2020. – Т. 89, № 1. – С. 59–73.

85. Шумилова, Е.М. Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* 245 по предполагаемым генам липидного метаболизма *mmsB1* и *fabG1* / Е.М. Шумилова, А.В. Шелудько, Ю.А. Филипьевичева, С.С. Евстигнеева, Е.Г. Пономарева, Л.П. Петрова, Е.И. Кацы // Микробиол. – 2016. – Т. 85, №2. – С. 162–170.

86. Шпаков, А.О. Сигнальные молекулы бактерий непептидной природы QS-типа // Микробиол. – 2009. – Т. 78, № 2. – С. 163–175.

87. Adler, J. Chemotaxis in bacteria // Science. – 1966. – Vol. 153. – P. 708–716.

88. Aizawa, S.-I. Purification and characterization of the flagellar hook-basal body complex of *Salmonella typhimurium* / S.-I. Aizawa, C.E. Dean, C.J. Jones, R.M. Macnab, S. Yamaguchi // J. Bacteriol. – 1985. – Vol. 161. – P. 836–849.

89. Albareda, M. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots / M. Albareda, M. Dardanelli, C. Sousa, M. Megías, F. Temprano, D. Rodríguez-Navarro // FEMS Microbiol. Lett. – 2006. – Vol. 259. – P. 67–73.

90. Alexander, C. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity / C. Alexander, E.T. Rietschel // *J. Endotoxin Res.* – 2001. – Vol. 7. – P. 167–202.
91. Alexandre, G. Energy taxis is the dominant behavior in *Azospirillum brasilense* / G. Alexandre, S.E. Greer, I.B. Zhulin // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – P. 6042–6048.
92. Alm, R.A. Identification of a gene, *pilV*, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* whose product possesses a prepilin-like leader sequence / R.A. Alm, J.S. Mattick // *Mol. Microbiol.* – 1995. – Vol. 16. – P. 485–496.
93. Altabe, S.G. New osmoregulated beta(1-3),beta(1-6) glucosyltransferase(s) in *Azospirillum brasilense* / S.G. Altabe, N.I. de Iannino, D. de Mendoza, R.A. Ugalde // *J. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176. – P. 4890–4898.
94. Ames, P. Transmembrane signalling by bacterial chemoreceptors: *E. coli* transducers with locked signal output / P. Ames, J.S. Parkinson // *Cell.* – 1988. – Vol. 55. – P. 817–826.
95. Anandham, R. *Azospirillum ramasamyi* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from fermented bovine products / R. Anandham, J. Heo, R. Krishnamoorthy, M. SenthilKumar, N.O. Gopal, S.J. Kim, S.W. Kwon // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 69, № 5. – P. 1369–1375.
96. Armitage, J.P. Behavioral responses in bacteria // *Ann. Rev. Physiol.* – 1992. – Vol. 54. – P. 683–714.
97. Assmus, B. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy / B. Assmus, P. Hutzler, G. Kirchhof, R. Amann, J.R. Lawrence, A. Hartmann // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1995. – Vol. 61. – P. 1013–1019.
98. Bahat-Samet, E. Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense* / E. Bahat-Samet, S. Castro-Sowinski, Y. Okon // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2004. – Vol. 237. – P. 195–203.

99. Bais, H.P. Enantiomeric dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (i)-catechin: a rhizosecreted racemic mixture from *Centaurea maculosa* (spotted knapweed) / H.P. Bais, T.S. Walker, F.R. Stermitz, R.A. Hufbauer, J.M. Vivanco // *Plant. Physiol.* – 2002. – Vol. 128. – P. 1173–1179.
100. Baldani, J. Recent advances in BNF with non-legume plants / J. Baldani, L. Caruso, V.L.D. Baldani, S.R. Goi, J. Döbereiner // *Soil Biol. Biochem.* – 1997. – Vol. 29. – P. 911–922.
101. Baldani, J.I. Genus II. *Azospirillum*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / J.I. Baldani, N.R. Krieg, V.L.D. Baldani, A. Hartmann, J. Döbereiner / Eds. D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.T. Stanly. – Springer-Verlag, New York, 2005. – Vol. 2. – P. 7–26.
102. Baldani, V.L.D. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat / V.L.D. Baldani, J.I. Baldani, J. Döbereiner // *Can. J. Microbiol.* – 1983. – Vol. 29. – P. 924–929.
103. Bansal, T. Differential effects of epinephrine, norepinephrine, and indole on *Escherichia coli* O157:H7 chemotaxis, colonization, and gene expression / T. Bansal, D. Englert, J. Lee, M. Hedge, T.K. Wood, A. Jayaraman // *Infect. Immun.* – 2007. – Vol. 75. – P. 4597–4607.
104. Barak, R. Detection of chemotaxis in *Azospirillum brasilense* / R. Barak, I. Nur, Y. Okon // *J. Appl. Bacteriol.* – 1983. – Vol. 54. – P. 399–403.
105. Barbieri, P. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production / P. Barbieri, T. Zanelli, E. Galli, G. Zanetti // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1986. – Vol. 36. – P. 87–90.
106. Barraud, N. Involvement of Nitric Oxide in Biofilm Dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* / N. Barraud, D.J. Hassett, S.-H. Hwang, S.A. Rice, S. Kjelleberg, J.S. Webb // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188, № 21. – P. 7344–7353.
107. Bashan, Y. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil // *J. Gen. Microbiol.* – 1986a. – Vol. 132. – P. 3407–3414.

108. Bashan, Y. Evidence for a weak active external adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots / Y. Bashan, H. Levanony, E. Klein // J. Gen. Microbiol. – 1986b. – V. 132. – P. 3069–3072.
109. Bashan, Y. The fate of field-inoculated *Azospirillum brasilense* Cd in wheat rhizosphere during the growing season / Y. Bashan, H. Levanony, O. Ziv-Vecht // Can. J. Microbiol. – 1987. – V. 33. – P. 1074–1079.
110. Bashan, Y. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat / Y. Bashan, H. Levanony // Can. J. Microbiol. – 1989a. – V. 35. – P. 936–944.
111. Bashan, Y. Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by *Azospirillum brasilense* Cd / Y. Bashan, H. Levanony, M. Girma // Can. J. Microbiol. – 1989b. – Vol. 39. – P. 691–697.
112. Bashan, Y. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996) / Y. Bashan, G. Holguin // Can. J. Microbiol. – 1997. – Vol. 43. – P. 103–121.
113. Bashan, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture // Biotech. Adv. – 1998. – Vol. 16. – P. 729–770.
114. Bashan, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review // Biol. Fertil. Soil. – 1999. – Vol. 29. – P. 246–256.
115. Bashan, Y. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003) / Bashan Y., Holguin G., L.E. de-Bashan // Can. J. Microbiol. – 2004. – Vol. 50. – P. 521–577.
116. Bashan, Y. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth – a critical assessment / Y. Bashan, L.E. de-Bashan // Adv. Agron. – 2010. – Vol.108. – P. 77–136.
117. Batabyal, B. *Azospirillum*: diversity, distribution, and biotechnology applications // Intern. Jour. of Pharm. Life Scien. – 2021. – Vol. 12, № 1. – P. 17–25.
118. Becker, D. Expression of the NH_4^+ -transporter gene LEAMT 1;2 is induced in tomato upon association with N_2 -fixing bacteria / D. Becker, R. Stanke, I. Fendrik,

W.B. Frommer, J. Vanderleyden, W.M. Kaiser, R. Hedrich // *Planta*. – 2002. – Vol. 215, № 3. – P. – 424–429.

119. Beijerinck, M.V. Uber ein *Spirillum*, welches frein Stickstoff binden kann // *Centralbl. Bakt. II.* – 1925. – Vol. 29. – P. 326.

120. Belas, M.R. Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio* / M.R. Belas, R.R. Colwell // *J. Bacteriol.* – 1982. – Vol. 156. – P. 1568–1580.

121. Ben-Jacob, E. Social behavior of bacteria: from physics to complex organization // *Eur. Phys. J. B.* – 2008. – Vol. 65. – P. 315–322.

122. Berg, H.C. Chemotaxis in *Escherichia coli* analyzed by three-dimensional tracking / H.C. Berg, D.A. Brown // *Nature*. – 1972. – Vol. 239. – P. 500–504.

123. Berg, H.C. The rotary motor of bacterial flagella // *Ann. Rev. Biochem.* – 2003. – Vol. 72. – P. 19–54.

124. Berg, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 84. – P. 11–18.

125. Bergman, K. Physiology of behavioral mutants of *Rhizobium meliloti*: evidence for a dual chemotaxis pathway / K. Bergman, M. Gulash-Hoffee, R.E. Hovestadt, R.C. La Rosiliere, P.G. Ronco, L. Sul // *J. Bacteriol.* – 1988. – Vol. 170. – P. 3249–3254.

126. Bergman, K. Mutations in the two flagellin genes of *Rhizobium meliloti* / K. Bergman, E. Nalty, L. Su // *J. Bacteriol.* – 1991. – Vol. 173. – P. 3716–3723.

127. Bianciotto, V. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures / V. Bianciotto, S. Andreotti, R. Balestrini, P. Bonfante, S. Perotto // *Eur. J. Histochem.* – 2001. – Vol. 45. – P. 39–49.

128. Bibikov, S. A signal transducer for aerotaxis in *Escherichia coli* / S. Bibikov, R. Biran, K. Rudd, J. Parkinson // *J. Bacteriol.* – 1997. – Vol. 179. – P. 4075–4079.

129. Bible, A. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium

Azospirillum brasilense / A. Bible, B. Stephens, D. Ortega, Z. Xie, G. Alexandre // J. Bacteriol. – 2008. – Vol. 190. – P. 6365–6375.

130. Blango, M.G. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics / M.G. Blango, M.A. Mulvey // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54. – P. 855–1863.

131. Blair, K.M. A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. / K.M. Blair, L. Turner, J.T. Winkelman, H.C. Berg, D.B. Kearns // Science. – 2008. – Vol. 320. – P. 1636–1638.

132. Bogino, P.C. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations / P.C. Bogino, M.M. Oliva, F.G. Sorroche, W. Giordano // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – Vol. 14. – P. 15838–15859.

133. Bothe, H. *Azospirillum* and related organisms: ecological, physiological, biochemical and genetics aspects // Intern. symp. Nitrogen fixation with non-legumes / Eds. N.A. Hegazi, M. Fayez, M. Monib. – Kair: American University in Cairo Press, 1994. – P. 43–52.

134. Brown, D.A. Temporal stimulation of chemotaxis in *Escherichia coli* / D.A. Brown, H.C. Berg // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1974. – Vol. 71. – P. 1388–1392.

135. Cairns, L.S. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms / L.S. Cairns, L. Hobley, N.R. Stanly-Wall // Mol. Microbiol. – 2014. – Vol. 93, № 4. – P. 587–598.

136. Cassan, F.D. The *Azospirillum brasilense* type VI secretion system promotes cell aggregation, biocontrol protection against phytopathogens and attachment to the microalgae *Chlorella sorokiniana* / F.D. Cassan, A. Coniglio, E. Amavizca, G. Maroniche, E. Cascales, Y. Bashan, L.E. de-Bashan // Environ. Microbiol. – 2021. – Vol. 23, № 10. – P. 6257–6274.

137. Chowdhury, E.K. 3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase from *Pseudomonas putida* E23: purification and characterization / E.K. Chowdhury, S. Nagata, H. Misono // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 1996. – Vol. 60, № 12. – P. 2043–2047.

138. Conrad, A. Fatty acid lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs // Lipids. – 2003. – Vol. 38. – P. 1093–1105.

139. Costerton, J.W. Microbial biofilms / J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, H.M. Lappin-Scott // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1995. – Vol. 49. – P. 711–745.
140. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // *Science.* – 1999. – Vol. 284. – P. 1318–1322.
141. Croes, C.L. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots / C.L. Croes, S. Moens, E. Van Bastelaere, J. Vanderleyden, K. Michiels // *J. Gen. Microbiol.* – 1993. – Vol. 139. – P. 960–967.
142. Currier, W.W. Characterization and biological activity of trefoil chemotactin / W.W. Currier, G.A. Strobel // *Plant Sci. Lett.* – 1981. – Vol. 21. – P. 159–165.
143. Dakora, F.D. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments / F.D. Dakora, D.A. Phillips // *Plant Soil.* – 2002. – Vol. 245. – P. 35–47.
144. Danese, P.N. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture / P.N. Danese, L.A. Pratt, R. Kolter // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – P. 3593–3596.
145. Danhorn, T. Biofilm formation by plant-associated bacteria / T. Danhorn, C. Fuqua // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2007. – Vol. 61. – P. 401–422.
146. Davey, M.E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // *Microbiol. Mol. Biol.* – 2000. – Vol. 64. – P. 847–867.
147. Davies, D.G. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm / D.G. Davies, M.R. Parsek, J.P. Pearson, B.H. Iglewski, J.W. Costerton, E.P. Greenberg // *Science.* – 1998. – Vol. 280, № 5361. – P. 295–298.
148. Davies, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2003. – Vol. 2. – P. 114–22.
149. Dekhil, B. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov. and elevation of

Conglomeromonas largomobilis subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. / B. Dekhil, M. Cahill, E. Stackebrandt, L.I. Sly // Syst. Appl. Microbiol. – 1997. – Vol. 20. – P. 72–77.

150. Del Gallo, M. Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* / M. Del Gallo, A. Haegi // Symbiosis. – 1990. – Vol. 9. – P. 155–161.

151. Dimmitt, K. Purification and thermal stability of intact *Bacillus subtilis* flagella / K. Dimmitt, M. Simon // J. Bacteriol. – 1971. – Vol. 105. – P. 369–375.

152. Dixon, R. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. / R. Dixon, D. Kahn // Nat. Rev. Microbiol. – 2004. – Vol. 2. – P. 621–631.

153. Döbereiner, J. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites / J. Döbereiner, J.M. Day // Nitrogen fixation with non-legumes / Eds. W.E. Newton, C.J. Nijman. – Pullman: Washington State Univ. Press, 1976. – Vol. 2. – P. 518–538.

154. Döbereiner, J. Ten years *Azospirillum* // *Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology / Ed. W. Klingmüller. – Berlin: Springer, 1983. – P. 9–23.

155. Döbereiner, J. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants / J. Döbereiner, F.O. Pedrosa. – Berlin: Science Tech Publ., Madison, Springer-Verlag, 1987. – 155 p.

156. Dobretsov, S. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling / S. Dobretsov, M. Teplitski, V. Paul // Biofouling. – 2009. – Vol. 25, № 5. – P. 413–427.

157. Doerr J., Hurek T., Reinhold-Hurek B. Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions // Mol. Microbiol. – 1998. – Vol. 30. – P. 7–17.

158. Dos Santos Ferreira, N. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. / N. Dos Santos Ferreira, F.H. Sant'Anna, V.M. Reis, A. Ambrosini, C.G. Volpiano, M.

Rothballer, S. Schwab, V.A. Baura, E. Balsanelli, F. de Oliveira Pedrosa, L.M.P. Passaglia, E.M. de Souza, A. Hartmann, F. Cassan, J.E. Zilli // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2020. – Vol. 70, № 12. – P. 6203–6212.

159. Dos Santos Lima Fagotti, D. Quorum sensing communication: *Bradyrhizobium-Azospirillum* interaction via N-acyl-homoserine lactones in the promotion of soybean symbiosis / D. Dos Santos Lima Fagotti, J.L. Fernandes Abrantes, P. Cerezini, J. Fukami, M.A. Nogueira, P. del Cerro, R. Valderrama-Fernández, F.J. Ollero, M. Megías, M. Hungria // *J. Basic Microbiol.* – 2019. – Vol. 59, № 1. – P. 38–53.

160. Eckert, B. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C₄-grass *Miscanthus* / B. Eckert, O.B. Weber, G. Kirchhof, A. Halbritter, M. Stoffes, A. Hartmann // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2001. – Vol. 51. – P. 17–26.

161. Ehrlich, G.D. The distributed genome hypothesis as a rubric for understanding evolution *in situ* during chronic bacterial biofilm infectious processes / G.D. Ehrlich, A. Ahmed, J. Earl, N.L. Hiller, J.W. Costerton, P. Stoodley, J.C. Post, P. De Meo, F.Z. Hu // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 59. – P. 269–279.

162. Ejaz, S. Effects of inoculation of root-associative *Azospirillum* and *Agrobacterium* strains on growth, yield and quality of Pea (*Pisum sativum* L.) grown under different nitrogen and phosphorus regimes / S. Ejaz, S. Batool, M.A. Anjum, S. Naz, S. Ali, M.F. Qayyum, T. Naqqash, K.H. Shah // *Scien. Horticul.* – 2020. – Vol. 270.

163. Elmas, M. Modeling aerotaxis band formation in *Azospirillum brasilense* / M. Elmas, V. Alexiades, L. O’Neal, G. Alexandre // *BMC Microbiol.* – 2019. – Vol. 19. – P. 101.

164. Enos-Berlage, J.L. Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus* / J.L. Enos-Berlage, Z.T. Guvener, C.E. Keenan, L.L. McCarter // *Mol. Microbiol.* – 2005. – Vol. 55. – P. 1160–1182.

165. Falk, E.C. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães *et al.* 1984 and emendation of the description of the genus *Azospirillum* / E.C. Falk, J. Döbereiner, J.L. Johnson, N.R. Krieg // *Int. J. Syst. Bacteriol.* – 1985. – Vol. 35. – P. 117–118.
166. Fedonenko, Y.P. Structure of the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide of *Azospirillum brasilense* Sp245 / Y.P. Fedonenko, G.V. Zatonsky, S.A. Konnova, E.L. Zdrovenko, V.V. Ignatov // *Carbohydr. Res.* – 2002. – Vol. 337. – P. 869–872.
167. Fellay, R. Omegon-Km: a transposable element designed for *in vivo* insertional mutagenesis and cloning of genes in gram-negative bacteria / R. Fellay, H.M. Krisch, P. Prentki, J. Frey // *Gene.* – 1989. – Vol. 76. – P. 215–226.
168. Fernandez, L.A. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria / L.A. Fernandez, J. Berenguer // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2000. – Vol. 24. – P. 21–44.
169. Ferrnandes, N. Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor / N. Ferrnandes, E.E. Diaz, R. Amils, J.L. Sanz // *Microb. Ecol.* – 2008. – Vol. 56, № 1. – P. 121–132.
170. Fibach-Paldi, S. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense* / S. Fibach-Paldi, S. Burdman, Y. Okon // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – Vol. 326, № 2. – P. 99–108.
171. Filip'echeva, Y.A. Chromosomal *flhB1* gene of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 is essential for correct assembly of both constitutive polar flagellum and inducible lateral flagella / Y.A. Filip'echeva, A.V. Shelud'ko, A.G. Prilipov, E.M. Telesheva, D.I. Mokeev, A.M. Burov, L.P. Petrova, E.I. Katsy // *Folia Microbiol.* – 2018a. – Vol. 63. – P. 147–153.
172. Filip'echeva, Y.A. Plasmid AZOBR_p1-borne *fabG* gene for putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase is essential for proper assembly and work of the dual flagellar system in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 /

Y.A. Filip'echeva, A.V. Shelud'ko, A.G. Prilipov, G.L. Burygin, E.M. Telesheva, S.S. Yevstigneyeva, M.P. Chernyshova, L.P. Petrova, E.I. Katsy // *Can. J. Microbiol.* – 2018b. – Vol. 64. – P. 107–118.

173. Flemming, H.-C. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* / H.-C. Flemming, A. Leis / Ed. G.W. Bitton. – New York: Wiley Intersc. – 2002. – Vol. 5. – P. 2958–2967.

174. Flemming, H.-C. The biofilm matrix / H.-C. Flemming, J. Wingender // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2010 – Vol. 8, № 9. – P. 623–633.

175. Forest, K.T. Type-4 pilus-structure: outside to inside and top to bottom – a minireview / K.T. Forest, J.A. Tainer // *Gene.* – 1997. – Vol. 192. – P. 165–169.

176. Fowler, D.M. Functional amyloid – from bacteria to humans / D.M. Fowler, A.V. Koulov, W.E. Balch, J.W. Kelly // *Trends Biochem. Scienc.* – 2007. – Vol. 32, № 5. – P. 217–224.

177. Francis, N.R.G. Isolation, characterization and structure of bacterial flagellar motors containing the switch complex / N.R.G. Francis, G.E. Sosinsky, D. Thomas, D.Y. De Rosier // *J. Mol. Biol.* – 1994. – Vol. 235. – P. 1261–1270.

178. Friedman, L. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms / L. Friedman, R. Kolter // *Mol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 51, № 3. – P. 675 – 690.

179. Frølund, B. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin / B. Frølund, R. Palmgren, K. Keiding, P.H. Nielsen // *Water Res.* – 1996. – Vol. 30. – P. 1749–1758.

180. Fukami, J. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 / J. Fukami, J.L. Fernandes Abrantes, P. del Cerro, M.A. Nogueira, F.J. Ollero, M. Megías, M. Hungria // *Arch. Microbiol.* – 2018a. – Vol. 200. – P. 47–56.

181. Fukami, J. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation / J. Fukami, P. Cerezini, M. Hungria // *AMB Expr.* – 2018b. – Vol. 8. – P.

73–85.

182. Fujinami, S. Motility and chemotaxis in alkaliphilic *Bacillus species* / S. Fujinami, N. Terahara, T. Krulwich, M. Ito // *Future Microbiol.* – 2009. – Vol. 4, № 9. – P. 1137–1149.

183. Fuqua, W.C. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators / W.C. Fuqua, S.C. Winans, E.P. Greenberg // *J. Bacteriol.* – 1994. – Vol. 176. – P. 269–275.

184. Ganusova, E. The *Azospirillum brasilense* core chemotaxis proteins CheA1 and CheA4 link chemotaxis signaling with nitrogen metabolism / E. Ganusova, L. Vo, P.E. Abraham, L. O'Neal Yoder, R.L. Hettich, G. Alexandre // *MSystems.* – 2021. – Vol. 6, № 1.

185. Gavín, R. Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation / R. Gavín, A.A. Rabaan, S. Merino, J.M. Tomás, I. Gryllos, J.G. Shaw // *Mol. Microbiol.* – 2002. – Vol. 43. – P. – 383–397.

186. Gaworzewska, E.T. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants / E.T. Gaworzewska, M.J. Carlile // *J. Gen. Microbiol.* – 1982. – Vol. 128. – P. 1179–1188.

187. Gerl, L. Halobacterial flagellins are encoded by a multigene family / L. Gerl, M. Sumper // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 13246–13251.

188. Gjermansen, M. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms / M. Gjermansen, P. Ragas, C. Sternberg, S. Molin, T. Tolker-Nielsen // *Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 7. – P. 894–906.

189. Gómez–Villalba, B. TGGE analysis of the diversity of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria in submerged filter biofilms for the treatment of urban wastewater / B. Gómez–Villalba, C. Calvo, R. Vilchez, J. Gonzalez-Lopez, B. Rodelas // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2006. – Vol. 72. – № 2. – P. 393–400.

190. Gotz, R. *Rhizobium meliloti* swims by unidirectional intermittent rotation of right-handed flagellar helices / R. Gotz, R. Schmitt // *J. Bacteriol.* – 1987. – Vol. 169.

– P. 3146–3150.

191. Guerrero-Molina, F. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense* / F. Guerrero-Molina, B.C. Winik, O. Pedraza // *Appl. Soil Ecol.* – 2012. – Vol. 61. – P. 205–212.

192. Guerry, P. Role of two flagellin genes in *Campylobacter* motility / P. Guerry, R.A. Alm, M.E. Power, S.M. Logan, T.J. Trust // *J. Bacteriol.* – 1991. – Vol. 173. – P. 4757–4764.

193. Guttenplan, S.B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation / S.B. Guttenplan, D.B. Kearns // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2013. – Vol. 37, № 6. – P. 849–871.

194. Haahtela, K. Root-associated N₂-fixation (Acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosoils / K. Haahtela, T. Wartioraara, V. Sundman // *Appl. Env. Microbiol.* – 1981. – Vol. 41. – P. 203–206.

195. Haathela, K. *In vitro* adhesion of N₂-fixing enteric bacteria to roots of grasses and cereals / K. Haathela, T.K. Korhonen // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1985. – Vol. 49, № 5. – P. 1186–1190.

196. Hall, P.G. Swarming of *Azospirillum brasilense* on solid media / P.G. Hall, N.R. Krieg // *Can. J. Microbiol.* – 1983. – Vol. 29. – P. 1592–1594.

197. Hall, P.G. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense* / P.G. Hall, N.R. Krieg // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1984. – Vol. 47. – P. 433–435.

198. Hall-Stoodley, L. Bacterial biofilm: from the natural environment to infection diseases / L. Hall-Stoodley, J. Costerton, P. Stoodley // *Microbiol.* – 2004. – Vol. 2. – P. 95–108.

199. Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // *Cell Microbiol.* – 2009. – Vol. 11. – P. 1034–1043.

200. Halverson, L.J. Signal exchange in plant-microbe interactions / L.J. Halverson, G. Stacey // *Microbiol. Rev.* – 1986. – Vol. 50. – P. 193–225.
201. Harshey, R.M. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2003. – Vol. 57. – P. 249–273.
202. Hartmann, A. Plant-driven selection of microbes / A. Hartmann, M. Schmidt, D. van Tuinen, G. Berg // *Plant Soil.* – 2008. – Vol. 321. – P. 235–257.
203. Hauwaerts, D. A major chemotaxis gene cluster in *Azospirillum brasilense* and relationships between chemotaxis operons in alpha-proteobacteria / D. Hauwaerts, G. Alexandre, S.B. Das, J. Vanderleyden, I.B. Zhulin // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – Vol. 208. – P. 61–67.
204. Hazelbauer, G.L. Bacterial chemoreceptors // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1992. – Vol. 2. – P. 505–510.
205. Henrichsen, J. Bacterial surface translocation: a survey and a classification // *Bacteriol. Rev.* – 1972. – Vol. 36. – P. 478–503.
206. Henrichsen, J. The occurrence of twitching motility among gram-negative bacteria // *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B.* – 1975. – Vol. 83, № 3. – P. 171–178.
207. Herath, H. Developed fungal-bacterial biofilms having nitrogen fixers: universal biofertilizers for legumes and non-legumes / H. Herath, K. Menikdiwela, A. Igalavithana, G. Seneviratne // *Biol. Nitrogen Fix.* – 2015. – Vol. 2. – P. 1041–1046.
208. Hess, J.F. Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis / J.F. Hess, K. Oosawa, N. Kaplan, M.I. Simon // *Cell.* – 1988. – Vol. 53. – P. 79–87.
209. Heumann, W. Conjugation in star-forming *Rhizobium lupini* // *Mol. Gen. Genet.* – 1968. – Vol. 102. – P. 132–144.
210. Holguin, G. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense* / G. Holguin, B.R. Glick // *Microb. Ecol.* – 2001. – Vol. 41, № 3. – P. 281–288.

211. Hördt, A. Analysis of 1,000+ type-strain genomes substantially improves taxonomic classification of *Alphaproteobacteria* / A. Hördt, M.G. López, J.P. Meier-Kolthoff, M. Schleuning, L.-M. Weinhold, B.J. Tindall, S. Gronow, N.C. Kyrpides, T. Woyke, M. Göker // *Front. Microbiol.* – 2020. – Vol. 11, № 468.

212. Horne, S.M. Spontaneous mutations in the *flhD* operon generate motility heterogeneity in *Escherichia coli* biofilm / S.M. Horne, J. Sayler, N. Scarberry, M. Schroeder, T. Lynnes, B.M. Pruss // *BMC Microbiol.* – 2016. – Vol. 16, № 262.

213. Hubbell, D.H. Associative N₂ fixation with *Azospirillum* / D.H. Hubbell, M.H. Gaskins // *Biol. Nitrogen Fix.* – 1984. – P. 201–224.

214. Jain, D.K. Root hair deformation, bacterial attachment and plant growth in wheat-*Azospirillum* association / D.K. Jain, D.G. Patriquin // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1984. – Vol. 48. – P. 1208–1213.

215. Jain, D.K. Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs / D.K. Jain, D.G. Patriquin // *Can. J. Microbiol.* – 1985. – Vol. 31. – P. 206–210.

216. Jeter, C. Characterization of the binding of diarrheagenic strains of *E. coli* to plant surfaces and the role of curli in the interaction of the bacteria with alfalfa sprouts / C. Jeter, A.G. Matthyse // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2005. – Vol. 18. – P. 1235–1242.

217. Jiang, Z.-Y. Isolation of *Rhodospirillum centenum* mutants defective in phototactic colony motility by transposon mutagenesis / Z.-Y. Jiang, B.G. Rushing, Y. Bai, H. Gest, C.E. Bauer // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180. – P. 1248–1255.

218. Kamnev, A.A. Chapter 3: Infrared spectroscopy in studying biofunctionalised gold nanoparticles / Eds. O. Fesenko, L. Yatsenko, M. Brodin // *Nanomaterials imaging techniques, surface studies, applications.* – New York: Springer, 2013. – P. 35–50.

219. Kaneko, T. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte *Azospirillum* sp. B510 / T. Kaneko, K. Minamisava, T. Isawa, H. Nakatsukasa, H.

Mitsui, Y. Kawaharada, Y. Nakamura, A. Watanabe, K. Kawashima, A. Ono, Y. Shimizu, C. Takahashi, C. Minami, T. Fujishiro, M. Kohara, M. Katoh, N. Nakazaki, S. Nakayama, M. Yamada, S. Tabata, S. Sato // DNA Res. – 2010. – Vol. 17. – P. 37–50.

220. Kannenberg, E.L. Lipid A and O-chain modification cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development / E.L. Kannenberg, R.W. Carlson // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – P. 379–391.

221. Kape, R. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids / R. Kape, M. Parniske, D. Werner // Appl. Environ. Microbiol. – 1991. – Vol. 57. – P. 316–319.

222. Kaplan, J.B. Genes involved in the synthesis and degradation of matrix polysaccharide in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* biofilms // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – P. 8213–8220.

223. Kaplan, J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implication, and potential therapeutic uses // J. Dent. Res. – 2010. – Vol. 89. – P. 205–218.

224. Kapulnik, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation / Y. Kapulnik, Y. Okon, Y. Henis // Can. J. Microbiol. – 1985. – Vol. 31. – P. 881–887.

225. Kato, S. Polymorphic transition of the flagellar polyhook from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* / S. Kato, M. Okamoto, S. Asakura // J. Mol. Biol. – 1984. – Vol. 173. – P. 463–468.

226. Katsy, E.I. Plasmid plasticity in the plant-associated bacteria of the genus *Azospirillum* // Bacteria in agrobiolology: plant growth responses / Ed. D.K. Maheshwari. – Berlin: Springer, 2011. – P. 139–157.

227. Katsy, E.I. Plasticity in Plant-Growth-Promoting and phytopathogenic bacteria / Ed. E.I. Katsy. – New York: Springer, 2014. – 208 p.

228. Katzy, E.I. Involvement of a 120-MDa plasmid of *Azospirillum brasilense* Sp245 in production of lipopolysaccharides / E.I. Katzy, L.Yu. Matora, O.B.

Serebrennikova, A.V. Scheludko // *Plasmid*. – 1998. – Vol. 40 – P. 73–83.

229. Keen, N.T. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria / N.T. Keen, S. Tamaki, D. Trollinger // *Gene*. – 1988. – Vol. 70. – P. 191–197.

230. Kefalogianni, I. Modeling growth and biochemical activities of *Azospirillum* spp. / I. Kefalogianni, G. Aggelis // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 58. – P. 352–357.

231. Kendall, M.M. Global effects of the cell-to-cell signaling molecules autoinducer-2, autoinducer-3, and epinephrine in a *luxS* mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli* / M.M. Kendall, D.A. Rasko, V. Sperandio // *Infect. Immun.* – 2007. – Vol. 75. – P. 4875–4884.

232. Kennedy, I.R. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances / I.R. Kennedy, Y. Tchan // *Plant Soil*. – 1992. – Vol. 141. – P. 93–118.

233. Kennedy, I.R. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? / I.R. Kennedy, A.T.M.A. Chouhury, M.L. Kecskes // *Soil Biol. Biochem.* – 2004. – Vol. 36, № 8. – P. 1229–1244.

234. Khammas, K.M. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere / K.M. Khammas, E. Ageron, P.A.D. Grimont, P. Kaiser // *Res. Microbiol.* – 1989. – Vol. 140. – P. 679–693.

235. Killinger, A.H. *Listeria monocytogenes* // *Manual of clinical microbiology* / Eds. E.H. Lennette, E.H. Spaulding, J.P. Truant. – 2nd ed. – D.C. Washington: American Society for Microbiology, 1974. – P. 135–139.

236. Kirby, J. Chemotaxis-like regulatory systems: unique roles in diverse bacteria // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2009. – Vol. 63. – P. 45–59.

237. Kreft, J.-U. Biofilms promote altruism // *Microbiol.* – 2000. – Vol. 150. – P.

2751–2760.

238. Krieg, N.R. Genus *Azospirillum* Tarrand Krieg and Döbereiner 1979 (effective publication: Tarrand, Krieg and Döbereiner 1978) / N.R. Krieg, J. Döbereiner // *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* / Eds. N.R. Krieg, J.G. Holt. – Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. – Vol. 1. – P. 94–104.

239. Krupski, G. Structure of complex flagellar filaments in *Rhizobium meliloti* / G. Krupski, R. Gotz, K. Ober, E. Pleier, R. Schmitt // *J. Bacteriol.* – 1985. – Vol. 162. – P. 361–366.

240. Lai, H.C. The Rss AB two-component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids / H.C. Lai, P.C. Soo, J.R. Wei, W.C. Yi, S.J. Liaw, Y.T. Horng, S.M. Lin, S.W. Ho, S. Swift, P. Williams // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 3407–3414.

241. Laverty, G. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation / G. Laverty, S.P. Gorman, B.F. Gilmore // *Pathogens.* – 2014. – Vol. 3. – P. 596–632.

242. Lavrinenko, K. *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring / K. Lavrinenko, E. Chernousova, E. Gridneva, G. Dubinina, V. Akimov, J. Kuever, A. Lysenko, M. Grabovich // *Int. J. Syst. Microbiol.* – 2010. – Vol. 60. – P. 2832–2837.

243. Lawn, A.M. Comparison of the flagellins from different flagellar morphotypes of *Escherichia coli* // *J. Gen. Microbiol.* – 1977. – Vol. 101. – P. 112–130.

244. Lengeler, J.W. Molecular mechanisms of bacterial chemotaxis towards PTS-carbohydrates / J.W. Lengeler, A.P. Vogler // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1989. – Vol. 63. – P. 81–92.

245. Lerner, A. Glycogen phosphorylase is involved in stress endurance and biofilm formation in *Azospirillum brasilense* Sp7 / A. Lerner, S. Castro-Sowinski, H.

Lerner, Y. Okon, S. Burdman // FEMS Microbiol. Lett. – 2009a. – Vol. 300. – P. 75–82.

246. Lerner, A. The *Azospirillum brasilense* Sp7 *noeJ* and *noeL* genes are involved in extracellular polysaccharide biosynthesis / A. Lerner, S. Castro-Sowinski, A. Valverde, H. Lerner, R. Dror, Y. Okon, S. Burdman // Microbiol. – 2009b. – Vol. 155. – P. 4058–4068.

247. Lerouge, I. O-antigen structural variation and possible roles in animal/plant-microbe interactions / I. Lerouge, J. Vanderleyden // FEMS Microbiol. Rev. – 2001. – Vol. 26. – P. 17–47.

248. Levin, B.R. Non-inherited antibiotic resistance / B.R. Levin, D.E. Rozen // Nat. Rev. Microbiol. – 2006. – Vol. 4. – P. 556 – 562.

249. Lewis, K. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – Vol. 3. – P. 247–254.

250. Lin, S.Y. *Azospirillum picis* sp. nov. isolated from discarded tar / S.Y. Lin, C.C. Young, H. Hupfer, C. Siering, A.B. Arun, W.M. Chen, W.A. Lai, F.T. Shen, P.D. Rekha, A.F. Yassin // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009. – Vol. 59. – P. 761–765.

251. Lin, S.Y. *Azospirillum formosense* sp. nov., a novel diazotrophic bacterium isolated from agricultural soil / S.Y. Lin, F.T. Shen, L.S. Young, Z.L. Zhu, W.M. Chen, C.C. Young // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2012. – Vol. 62. – P. 1185–1190.

252. Lin, S.Y. *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from a fermenter in Taiwan / S.Y. Lin, Y.C. Liu, A. Hameed, Y.H. Hsu, W.A. Lai, F.T. Shen, C.C. Young // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – Vol. 63, № 10. – P. 3762–3768.

253. Lin, S.Y. *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agriculture soil / S.Y. Lin, A. Hameed, Y.C. Liu, Y.H. Hsu, W.A. Lai, F.T. Shen, C.C. Young // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2015. – Vol. 65. – P. 4601–4607.

254. Lin, S.Y. *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated

from cultivated soil / S.Y. Lin, Y.C. Liu, A. Hameed, Y.H. Hsu, H.I. Huang, W.A. Lai, C.C. Young // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2016. – Vol. 66, № 3. – P. 1453–1458.

255. Lindahl, A. A new test based on salting out to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells / A. Lindahl, A. Faris, T. Wadstrom, S. Hjerten // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1981. – Vol. 677. – P. 471–476.

256. Lindberg, T. Nitrogenase activity and nitrogen fixing bacteria in cereals and forage grasses grown in Sweden / T. Lindberg, U. Granhall // *Nitrogen fixation with non-legumes.* – Helsinki, 1984. – P. 83.

257. Lopez de Victoria, G. Chemotactic behavior of *Azospirillum* species to aromatic compounds / G. Lopez de Victoria, C.R. Lovell // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1993. – Vol. 59. – P. 2951–2955.

258. Lopez de Victoria, G. Motility behavior of *Azospirillum* species in response to aromatic compounds / G. Lopez de Victoria, D.R. Fielder, R.K. Zimmer-Faust, C.R. Lovell // *Can. J. Microbiol.* – 1994. – Vol. 40. – P. 705–711.

259. López, D. Biofilms / D. López, H. Vlamakis, R. Kolter // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2, № 7.

260. Lotan, R. The fluorescence of wheat germ agglutinin and of its complexes with saccharides / R. Lotan, N. Sharon // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1973. – Vol. 55, № 4. – P. 1340–1346.

261. Low, D. Fimbriae / D. Low, B. Braaten, M. van der Woude // *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* / Ed. F.C. Neidhart. – 2nd ed. – D.S. Washington: American Society for Microbiology, 1996. – P. 146–157.

262. Lugtenberg, B. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? / B. Lugtenberg, L. Dekkers // *Environ. Microbiol.* – 1999. – Vol. 1. – P. 9–13.

263. Lugtenberg, B.J.J. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas* / B.J.J. Lugtenberg, L. Dekkers, G.V. Bloemberg // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 2001. – Vol. 39. – P. 461–490.

264. Lynch, J.M. Substrate flow in the rhizosphere / J.M. Lynch, J.M. Whipps // *Plant Soil*. – 1990. – Vol. 129. – P. 1–10.
265. Ma, L. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix / L. Ma, M. Conover, H. Lu, M.R. Parsek, K. Bayles, D.J. Wozniak // *PLoS Pathog.* – 2009. – Vol. 5.
266. Macnab, R.M. The gradient sensing mechanism in bacterial chemotaxis / R.M. Macnab, D.E. Koshland // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1972. – Vol. 69, № 9. – P. 2509–2512.
267. Macnab, R.M. Bacterial motility and the bacterial flagellar motor / R.M. Macnab, S.-I. Aizawa // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* – 1984. – Vol. 13. – P. 51–83.
268. Macnab, R.M. Genetics and biogenesis of bacterial flagella // *Ann. Rev. Genet.* – 1992. – Vol. 26. – P. 131–158.
269. Macnab, R.M. Flagella and motility // *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology* / Ed. F.C. Neidhardt. – 2nd ed. – D.S. Washington: American Society for Microbiology, 1996. – P. 123–145.
270. Madi, L. Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd: conditions and factors involved in cell-to cell adhesion / L. Madi, Y. Henis // *Plant Soil*. – 1989. – Vol. 115, № 1. – P. 89–98.
271. Magalhães, F.M. A new arid-tolerant *Azospirillum* species / F.M. Magalhães, J.I. Baldani, S.M. Sonto, J.R. Kuykendall, J. Döbereiner // *Ann. Acad. Brasil Science*. – 1983. – Vol. 55. – P. 417–430.
272. Manson, M.D. Bacterial locomotion and signal transduction / M.D. Manson, J.P. Armitage, J.A. Hoch, R.M. Macnab // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180. – P. 1009–1022.
273. Mariotti, L. *Azospirillum baldaniorum* Sp245 induces physiological responses to alleviate the adverse effects of drought stress in *Purple basil* / L. Mariotti, A. Scartazza, M. Curadi, P. Picciarelli, A. Toffanin // *Plants*. – 2021. – Vol. 10, № 6.

274. Marques, A.P.G.C. Assessment of the plant growth promotion abilities, of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant / A.P.G.C. Marques, C. Pires, H. Moreira, A.O.S.S. Rangel, P.M.L. Castro // *J. Soil Biol. Biochem.* – 2010. – Vol. 42. – P. 1229–1235.
275. Martin-Didonet, C.C.G. Genome structure of the genus *Azospirillum* / C.C.G. Martin-Didonet, L.S. Chubatsu, E.M. Sousa, M. Kleina, F.G.M. Rego, L.U. Rigo, M.G. Yates, F.O. Pedrosa // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – P. 4113–4116.
276. Matora, L. Immunological properties of *Azospirillum* cell surface: the structure of carbohydrate antigens and evaluation of their involvement in bacteria–plant contact interactions / L. Matora, G. Solovova, O. Serebrennikova, N. Selivanov, S. Shchyogolev // *Azospirillum VI and Related Microorganisms* / Eds I. Fendrik, M. del Gallo, M. de Zamaroczy, J. Vanderleyden. – Berlin: Springer, 1995. – Vol. 37. – P. 377–382.
277. Matora, L.Yu. Structural effects of the *Azospirillum* lipopolysaccharides in cell suspensions / L.Yu. Matora, O.B. Serebrennikova, S.Yu. Shchyogolev // *Biomacromol.* – 2001. – Vol. 2, № 2. – P. 402–406.
278. Matsuura, S. Transformation of straight flagella and recovery of motility in a mutant *Escherichia coli* / S. Matsuura, R. Kamiya, S. Asakura // *J. Mol. Biol.* – 1978. – Vol. 118. – P. 431–440.
279. Mattick, J.S. Type IV pili and twitching motility // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2002. – Vol. 56. – P. 289–314.
280. Mayer, H. Analysis of lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria / H. Mayer, R.N. Tharanathan, J. Weckesser // *Meth. Microbiol.* – 1985. – Vol. 18 – P. 157–207.
281. McBride, M.J. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell movement over surfaces // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2001. – Vol. 55. – P. 49–75.
282. McCarter, L.L. OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus* // *J. Bacteriol.* – 1998. – Vol. 180. – P. 3166–3173.

283. Mehnaz, S. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere / S. Mehnaz, B. Weselowski, G. Lazarovits // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007a. – Vol. 57. – P. 620–624.
284. Mehnaz, S. *Azospirillum zea* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays* / S. Mehnaz, B. Weselowski, G. Lazarovits // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2007b. – Vol. 57. – P. 2805–2809.
285. Mehta, P. Information processing and signal integration in bacterial quorum sensing // *Mol. Syst. Biol.* – 2009. – Vol. 5. – P. 325.
286. Merino, S. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system / S. Merino, J.G. Shaw, J.M. Tomas // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2006. – Vol. 263. – P. 127–135.
287. Michiels, K. *Azospirillum* – plant root associations: a review / K. Michiels, J. Vanderleyden, A. Gool // *Biol. Fertil. Soils.* – 1989. – Vol. 8. – P. 356–368.
288. Michiels, K. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots / K. Michiels, C.L. Croes, J. Vanderleyden // *J. Gen. Microbiol.* – 1991. – Vol. 137. – P. 2241–2246.
289. Michiels, K. Genetics and molecular biology of *Azospirillum* / K. Michiels, J. Vanderleyden, C. Elmerich // *Azospirillum* plant associations / Ed. Okon Y. – Boca Raton: CRC Press, 1994. – P. 41–56.
290. Minamino, T. Molecular motors of the bacterial flagella / T. Minamino, K. Imada, K. Namba // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2008. – Vol. 18. – P. 693–701.
291. Moens, S. Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellin of lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7 / S. Moens, K. Michiels, V. Keijers, F. Van Leuven, J. Vanderleyden // *J. Bacteriol.* – 1995. – Vol. 177. – P. 5419–5426.
292. Moens, S. *Azospirillum* genes involved in chemotaxis and adhesion to plant roots / S. Moens, E. Van Bastelaere, A. Vande Broek, J. Vanderleyden // *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture* / Eds. A. Legocki, H. Bothe, A. Pühler. – NATO ASI Series G: Ecological Studies. – Berlin: Springer, 1997. – Vol. 39. – P. 123–127.

293. Molin, S. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. / S. Molin, T. Tolker-Nielsen // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 14. – P. 255–261.
294. Monier, J.M. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces / J.M. Monier, S.E. Lindow // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70. – P. 346–355.
295. Morris, C.E. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria / C.E. Morris, J.M. Monier // *Ann. Rev. Phytopathol.* – 2003. – Vol. 41. – P. 429–453.
296. Nealson, K.H. Bacterial Bioluminescence: Its Control and Ecological Significance / K.H. Nealson, J.W. Hastings // *Microbiol. Rev.* – 1979. – Vol. 43. – P. 496–518.
297. Neu, T.R. An amphiphilic polysaccharide from an adhesive *Rhodococcus* strain / T.R. Neu, K. Poralla // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1988. – Vol. 49. – P. 389–392.
298. Neyra, C.A. Coaggregation of *Azospirillum* with other bacteria: basis for functional diversity / C.A. Neyra, A. Atkinson, O. Olubayi // *Azospirillum VI and related microorganisms: genetics, physiology, ecology* / Eds. I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden, M. de Zamorocz. – Berlin: Springer, 1995. – P. 429–439.
299. Nihorimbere, V. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health / V. Nihorimbere, M. Ongena, M. Smargiassi, P. Thonart // *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* – 2011. – Vol. 15. – P. 327–337.
300. Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria // *Ann. Rev. Biochem.* – 2009. – Vol. 78. – P. 119–146.
301. Nilsson, M.R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro // *Methods.* – 2004. – Vol. 34. – P. 151–160.
302. Okon, Y. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum* / Y. Okon, S.L. Albrecht, R.H. Burris // *J. Bacteriol.* – 1976. – Vol. 128. – P. 592–597.

303. Okon, Y. Developments in basic and applied biological nitrogen fixation / Y. Okon, R.W.F. Hardy // Plant. Physiology / Ed. F.C. Steward. – New York: Academic Press, 1983. – Vol. 8. – P. 5–54.
304. Okon, Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots / Y. Okon, Y. Kapulnik // Plant Soil. – 1986. – Vol. 90. – P. 3–16.
305. Okon, Y. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation / Y. Okon, C.A. Labandera-Gonzalez // Soil Biol. Biochem. – 1994. – Vol. 26. – P. 1591–1601.
306. Okon, Y. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields / Y. Okon, R. Itzigsohn // Biotech. Adv. – 1995a. – Vol. 13. – P. 415–424.
307. Okon, Y. Advances in agronomy and ecology of the *Azospirillum*/plant association / Y. Okon, R. Itzigsohn, S. Burdman, M. Hampel // Nitrogen fixation: fundamentals and applications / Eds. I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov, W.E. Newton. – Netherlands: Kluwer Academic Publ., 1995b. – P. 635–652.
308. O'Neal, L. Specific root exudate compounds sensed by dedicated chemoreceptors shape *Azospirillum brasilense* chemotaxis in the rhizosphere / L. O'Neal, L. Vo, G. Alexandre // Appl. Environ. Microbiol. – 2020. – Vol. 86, № 15.
309. O'Toole, G.A. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis / G.A. O'Toole, R. Kolter // Mol. Microbiol. – 1998. – Vol. 28, № 3. – P. 449–461.
310. Or, D. Extracellular polymeric substances affecting pore-scale hydrologic conditions for bacterial activity in unsaturated soils / D. Or, S. Phutane, A. Dechesne // Vadose Zone J. – 2007. – Vol. 6. – P. 298–305.
311. Pace, N.R. Time for a change // Nature. – 2006. – Vol. 441. – P. 289.
312. Pagnussat, L.A. Interspecific cooperation: enhanced growth, attachment and strain-specific distribution in biofilms through *Azospirillum brasilense*-*Pseudomonas*

protegens co-cultivation / L.A. Pagnussat, F.S. Guillermo Maroniche, Ch.K. Claudio Valverde, C.M. Creus // FEMS Microbiol. Letters. – 2016. – Vol. 363, № 20.

313. Parge, H. Structure of the fibre-forming protein pili at 2.6 Å resolution / H. Parge, K.T. Forest, M.J. Hickey, D.A. Christensen, E.D. Getzoff, J.A. Tainer // Nature. – 1995. – Vol. 378. – P. 32–38.

314. Park K.-S., Arita M., Iida T., Honda T. *vpaH*, a gene encoding a novel histone-like nucleoid structure-like protein that was possibly horizontally acquired, regulates the biogenesis of lateral flagella in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73, № 9. – P. 5754–5761.

315. Parsek, M.R. Biofilms: Emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life / M.R. Parsek, C. Fuqua // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – P. 4427–4440.

316. Patriquin, D.G. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil / D.G. Patriquin, J. Döbereiner // Can. J. Microbiol. – 1978. – Vol. 24, № 6. – P. 734–742.

317. Patriquin, D.G. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses / D.G. Patriquin, J. Döbereiner, D.K. Jain // Can. J. Microbiol. – 1983. – Vol. 29. – P. 900–915.

318. Paytubi, S. Nutrient composition promotes switching between pellicle and bottom biofilm in *Salmonella* / S. Paytubi, C. Cansado, C. Madrid, C. Balsalobre // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – P. 2160.

319. Peng, G. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass / G. Peng, H. Wang, G. Zhang, W. Hou, Y. Liu, E.T. Wang, Z. Tan // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56. – P. 1263–1271.

320. Plasek, J. Solvatochromic Effect in the optical spectra of calcofluor and its relation to fluorescent staining of yeast cell walls / J. Plasek, B. Hoskova // J. Fluoresc. – 2010. – Vol. 20. – P. 343–352.

321. Prigent-Combaret, C. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli* / C. Prigent-Combaret, O. Vidal, C. Dorel, P. Lejeune // J. Bacteriol. – 1999. – Vol. 181, № 19. – P. 5993–6002.

322. Provorov, N.A. Developmental genetics of plant-microbe symbioses / N.A. Provorov, O.Y. Shtark, V.A. Zhukov, A.Y. Borisov, I.A. Tikhonovich. – New York: Nova Science Publ., 2010. – 152 p.

323. Raffi, M.M. *Azospirillum*-biofertilizer for sustainable cereal crop production: current status / M.M. Raffi, P.B.B.N. Charyulu // Rec. Develop. Appl. Microbiol. Biochem.: Chapter 18. – Academic Press, 2021. – Vol. 2. – P. 193–209.

324. Ramírez-Mata, A. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense* / A. Ramírez-Mata, L.I. López-Lara, M.L. Xiqui-Vázquez, S.J. Moreno, A. Romero-Osorio, B.E. Baca // Res. Microbiol. – 2016. – Vol. 167, № 3. – P. 190–201.

325. Ramírez-Mata, A. Versatile use of *Azospirillum brasilense* strains tagged with *egfp* and *mCherry* genes for the visualization of biofilms associated with wheat roots / A. Ramírez-Mata, M.R. Pacheco, S.J. Moreno, M.L. Xiqui-Vázquez, B.E. Baca // Res. Microbiol. – 2018. – Vol. 215. – P. 155–163.

326. Rasid, R.A. Biofilm and multimedia filtration for rainwater treatment // J. Sustain. Develop. – 2009. – Vol. 2, № 1. – P. 196–199.

327. Redkina, T.V. Nitrogen-fixing microorganisms of the genus *Azospirillum* and their relations with higher plants / T.V. Redkina, E.N. Mishustin // Interrelat. between microorg. plants in soil / Eds. V. Vancura, F. Kung. – Praha: Academia, 1989. – P. 263–267.

328. Reinhold, B. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. / B. Reinhold, T. Hurek, I. Fendrik // J. Bacteriol. – 1985. – Vol. 162. – P. 190–195.

329. Reinhold, B. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with root of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) / B. Reinhold, T.

Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemens, J. De Ley // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1987. – Vol. 37. – P. 43–51.

330. Rinaudi, L.V. An integrated view of biofilm formation in rhizobia / L.V. Rinaudi, W. Giordano // FEMS Microbiol. Lett. – 2010. – Vol. 304. – P. 1–11.

331. Robinson, J.B. Role of divalent cations in the subunit associations of complex flagella from *Rhizobium meliloti* / J.B. Robinson, O.H. Tuovinen, W.D. Bauer // J. Bacteriol. – 1992. – Vol. 174. – P. 3896–3902.

332. Rodriguez-Navarro, D.N. Attachment of bacteria to the roots of higher plants / D.N. Rodriguez-Navarro, M.S. Dardanelli, J.E. Ruiz-Sainz // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 272. – P. 127–136.

333. Rondina, A.B.L. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium spp.* and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates / A.B.L. Rondina, A.W. dos Santos Sanzovo, G.S. Guimarães, J.R. Wendling, M. Nogueira, M. Hungria // Biol. Fertil. Soils. – 2020. – Vol. 56, № 4.

334. Roper, M.M. Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw / M.M. Roper, J.K. Ladha // Plant Soil. – 1995. – Vol. 174. – P. 211–224.

335. Rosenberg, E. The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria / Eds. E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, F. Thompson. – 4th ed. – Berlin: Springer, 2014. – P. 439–512.

336. Rudel, T. *Neisseria* PilC protein identified as type-4 pilus tip-located adhesin / T. Rudel, I. Scheurerpflug, T.F. Meyer // Nature. – 1995. – Vol. 373. – P. 357–359.

337. Rudrappa, T. Causes and consequences of plant-associated biofilms / T. Rudrappa, M.L. Biedrzycki, H.P. Bais // FEMS Microbiol. Ecol. – 2008. – Vol. 64. – P. 153 – 166.

338. Rupp, M.E. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutination of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model / M.E. Rupp, J.S. Ulphani, P.D. Fey, D. Mack // *Infect. Immun.* – 1999. – Vol. 67. – P. 2627–2632.

339. Ruppel, S. Effect of ammonium and nitrate on $^{15}\text{N}_2$ -fixation of *Azospirillum* spp., and *Pantoea agglomerans* in association with wheat plants / S. Ruppel, W. Merbach // *Microbiol. Res.* – 1997. – Vol. 152. – P. 377–383.

340. Sadasivan L., Neyra C.A. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145 / L. Sadasivan, C.A. Neyra // *J. Bacteriol.* – 1987. – Vol. 169. – P. 1670–1677.

341. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. – 2nd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. – 1659 p.

342. Sarig, S. Effect of *Azospirillum* inoculation on nitrogen fixation and growth of several winter legumes / S. Sarig, Y. Kapulnik, Y. Okon // *Plant Soil.* – 1986. – Vol. 90. – P. 335–342.

343. Sarig, S. Improvement of the water status and yield of field-grow grain sorgum (*Sorghum bicolor*) by inoculation with *Azospirillum brasilense* / S. Sarig, A. Blum, Y. Okon // *J. Agric. Sci.* – 1988. – Vol. 110. – P. 271–277.

344. Sauer, K. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm / K. Sauer, A.K. Camper, G.D. Ehrlich, J.W. Costerton, D.G. Davies // *J. Bacteriol.* – 2002. – Vol. 184, № 4. – P. 1140–1154.

345. Sauer, K. Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm // *J. Bacteriol.* – 2004. – Vol. 186. – P. – 7312–7326.

346. Scheludko, A.V. Novel classes of *Azospirillum brasilense* mutants with defects in the assembly and functioning of polar and lateral flagella / A.V. Scheludko,

E.I. Katsy, N.A. Ostudin, O.K. Gringaus, V.I. Panasenko // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. – 1998. – № 4 – С. 33–37.

347. Scher, K. Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface / K. Scher, U. Romling, S. Yaron // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 3. – P. – 1163–1168.

348. Schlöter, M. Characterization of cell surface components of *Azospirillum brasilense* Sp7 as antigenic determinants for strain-specific monoclonal antibodies / M. Schlöter, S. Moens, C. Croes, A. Hartmann, K. Michiels // Microbiol. – 1994. – Vol. 140. – P. 823–828.

349. Serra, D.O. Proteome approaches combined with Fourier transform infrared spectroscopy revealed a distinctive biofilm physiology in *Bordetella pertussis* / D.O. Serra, G. Lüsking, F. Weiland, S. Schulz, A. Görg, O.M. Yantorno, M. Ehling-Schulz // Proteomics. – 2008. – Vol. 8, № 23–24. – P. 4995–5010.

350. Shah, K.D. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* / K.D. Shah, A.N. Spoering, K.K. Lewis // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – P. 8172–8180.

351. Sheludko, A.V. The effect of mutations affecting synthesis of lipopolysaccharides and calcofluor-binding polysaccharides on biofilm formation by *Azospirillum brasilense* / A.V. Sheludko, O.V. Kulibyakina, A.A. Shirokov, L.P. Petrova, L.Yu Matora., E.I. Katsy // Microbiol. – 2008. – Vol. 77, № 3. – P. 313–317.

352. Shelud'ko, A.V. Polar flagellum of the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense* Sp245 plays a role in biofilm biomass accumulation and in biofilm maintenance under stationary and dynamic conditions / A.V. Shelud'ko, Y.A. Filip'echeva, E.M. Telesheva, S.S. Yevstigneeva, L.P. Petrova, E.I. Katsy // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2019a. – Vol. 35, № 2. – P. 19.

353. Shelud'ko, A.V. 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 /

A.V. Shelud'ko, Y.A. Filip'echeva, E.M. Telesheva, S.S. Yevstigneeva, L.P. Petrova, E.I. Katsy // *Can. J. Microbiol.* – 2019b. – Vol. 65. – P. 144–154.

354. Shepherd, J.G. Comparison of O-antigen gene clusters of *Escherichia coli* (*Shigella*) Sonnei and *Plesiomonas shigelloides* O17: Sonnei gained its current plasmid-borne O-antigen genes from *P. shigelloides* in a recent event / J.G. Shepherd, L. Wang, P.R. Reeves // *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68. – P. 6056–6061.

355. Shirokov, A. Flagellin of polar flagellum from *Azospirillum brasilense* Sp245: isolation, structure, and biological activity / A. Shirokov, A. Budanova, G. Burygin, N. Evseeva, L. Matora, S. Shchyogolev // *Intern. J. Biolog. Macromol.* – 2020. – Vol. 147. – P. 1221–1227.

356. Silverman, M. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility / M. Silverman, M. Simon // *Nature.* – 1974. – Vol. 249. – P. 73–79.

357. Silverman, M. Bacterial flagella / M. Silverman, M. Simon // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1977. – Vol. 31. – P. 397–419.

358. Skerker, J.M. Direct observation of extension and retraction of type IV pili / J.M. Skerker, H.C. Berg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 6901–6904.

359. Skvortsov, I.M. Extracellular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots / I.M. Skvortsov, V.V. Ignatov // *FEMS Microbiol. Lett.* – 1998. – Vol. 165. – P. 223–229.

360. Soto, G.E. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly / G.E. Soto, S.J. Hultgren // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181. – P. 1059–1071.

361. Sowa, Y. Bacterial flagellar motor / Y. Sowa, R. Berry // *Quart. Rev. Biophys.* – 2008. – Vol. 41. – P. 103–132.

362. Spaepen, S. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling / S. Spaepen, J. Vanderleyden, R. Remans // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2007. – Vol. 31. – P. 425–448.
363. Spaepen, S. Plant growth promoting actions of rhizobacteria / S. Spaepen, J. Vanderleyden, Y. Okon // *Adv. Bot. Res.* – 2009. – Vol. 51. – P. 283–320.
364. Spaepen, S. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots, as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense* / S. Spaepen, S. Bossuyt, K. Engelen, K. Marchal, J. Vanderleyden // *New Phytol.* – 2014. – Vol. 201, № 3. – P. 850-861.
365. Sperandio, P. New Insights into the Lpt machinery for lipopolysaccharide transport to the cell surface: LptA-LptC interaction and LptA stability as sensors of a properly assembled transenvelope complex / P. Sperandio, R. Villa, A. Martorana, M. Šamálíková, R. Grandori, G. Dehò, A. Polissi // *J. Bacteriol.* – 2011. – Vol. 193, № 5.
366. Spormann, A.M. Gliding motility in bacteria: insights from studies of *Myxococcus xanthus* // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1999. – Vol. 63. – P. 621–641.
367. Stanley, N.R. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation / N.R. Stanley, B.A. Lazazzera // *Mol. Microbiol.* – 2004. – Vol. 52. – P. 917–924.
368. Steenhoudt, O. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects / O. Steenhoudt, J. Vanderleyden // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2000. – Vol. 24. – P. 487–506.
369. Stephens, B. Role of CheB and CheR in the complex chemotactic and aerotactic pathway of *Azospirillum brasilense* / B. Stephens, S. Loar, G. Alexandre // *J. Bacteriol.* – 2006. – Vol. 188. – P. 4759–4768.
370. Strom, M. Structure, function and biogenesis of type IV pili / M. Strom, S. Lory // *Ann. Rev. Microbiol.* – 1993. – Vol. 47. – P. 565–596.

371. Tal, S. Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd. / S. Tal, Y. Okon // Can. J. Microbiol. – 1985. – Vol. 31. – P. 608–613.
372. Tal, S. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* during balanced growth and starvation / S. Tal, P. Smirnof, Y. Okon // J. Gen. Microbiol. – 1990. – Vol. 136. – P. 1191–1196.
373. Tarrand, J.J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum braslense* sp. nov. / J.J. Tarrand, N.R. Krieg, J. Döbereiner // Can. J. Microbiol. – 1978. – Vol. 24. – P. 967–980.
374. Terashima, H. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor / H. Terashima, S. Kojima, M. Homma // Int. Rev. Cell Mol. Biol. – 2008. – Vol. 270. – P. 39–85.
375. Tetz, V.V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies // Med. Microbiol. Lett. – 1996. – Vol. 5. – P. 426–436.
376. Tikhonova, E.N. *Azospirillum palustre* sp. nov., a methylotrophic nitrogen-fixing species isolated from raised bog / E.N. Tikhonova, D.S. Grouzdev, I.K. Kravchenko // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2019. – Vol. 69, № 9. – P. 2787–2793.
377. Tomich, M. The tad locus: Postcards from the widespread colonization island / M. Tomich, P.J. Planet, D.H. Figurski // Nat. Rev. Microbiol. – 2007. – Vol. 5. – P. 363–375.
378. Tyagi, S. *Azospirillum himalayense* sp. nov., a nifH bacterium isolated from Himalayan valley soil, India / S. Tyagi, D.K. Singh // Ann. Microbiol. – 2014. – Vol. 64, P. 259–266.
379. Tyler, M.E. Isolation of *Azospirillum* from diverse geographic regions / M.E. Tyler, J.R. Milam, R.L. Smith // Can. J. Microbiol. – 1979. – Vol. 25, № 6. – P. 639–697.

380. Vacheron, J. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning / J. Vacheron, G. Desbrosses, M.-L. Bouffaud, B. Touraine, Y. Moënne-Loccoz, D. Muller, L. Legendre, F. Wisniewsky-Dye, C. Prigent-Combaret // *Front. Plant. Sci.* – 2013. – Vol. 4. – P. 356.

381. Vanderlinde, E.M. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, deficient in 27-hydroxyoctacosanoate-modified lipopolysaccharide, is impaired in desiccation tolerance, biofilm formation and motility / E.M. Vanderlinde, A. Muszyński, J.J. Harrison, S.F. Koval, D.L. Foreman, H. Ceri, E.L. Kannenberg, R.W. Carlson, C.K. Yost // *Microbiol.* – 2009. – Vol. 155, № 9. – P. 3055–3069.

382. Vanderlinde, E.M. Genetic analysis reveals links between lipid A structure and expression of the outer membrane protein gene, *ropB*, in *Rhizobium leguminosarum* / E.M. Vanderlinde, C.K. Yost // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – Vol. 335, № 2. – P. 130–139.

383. Van Doorn, J. Partial characterization of fimbriae of *Xanthomonas campestris* pv. *hyacinthi* / J. Van Doorn, P.M. Boonekamp, B. Oudega // *Mol. Plant-Microbe Interact.* – 1994. – Vol. 7. – P. 334–344.

384. Verstraeten, N. Living on a surface: swarming and biofilm formation / N. Verstraeten, K. Braeken, B. Debkumari, M. Fauvart, J. Fransaer, J. Vermant, J. Michiels // *Trends Microbiol.* – 2008. – Vol. 16. – P. 496–506.

385. Viruega-Góngora, V.I. Spatio-temporal formation of biofilms and extracellular matrix analysis in *Azospirillum brasilense* / V.I. Viruega-Góngora, I.S. Acatitla-Jácome, S.R. Reyes-Carmona, B.E. Baca, A. Ramírez-Mata // *FEMS Microbiol. Letters.* – 2020. – Vol. 367, № 4.

386. Vladimirov, N. Chemotaxis: how bacteria use memory / N. Vladimirov, V. Sourjik // *Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 390. – P. 1097–2104.

387. Vlassak, K. Association of free-living nitrogen fixing bacteria with plant roots in temperate region / K. Vlassak, L. Reynders // *Micribiol. Ecol. B.* – 1978. – P. 307–309.

388. Vlassak, K. Agronomic aspects of biological dinitrogen fixation by *Azospirillum* spp in temperate zone / K. Vlassak, L. Reynders // Associative N₂-fixat. – 1981. – Vol. 1. – P. 93–101.
389. Walker, T.S. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation / T.S. Walker, H.P. Bais, E. Déziel, H.P. Schweizer, L.G. Rahme, R. Fall, J.M. Vivanco // Plant. Physiol. – 2004. – Vol. 134. – P. 320–331.
390. Wall, D. Type IV pili and cell motility / D. Wall, D. Kaiser // Mol. Microbiol. – 1999. – Vol. 32. – P. 1–10.
391. Wang, D. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions / D. Wang, A. Xu, C. Elmerich, L.Z. Ma // ISME J. – 2017. – Vol. 11. – P. 1602–1613.
392. Watanabe, M. Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1998. – Vol. 50. – P. 682–691.
393. Webb, J.S. Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development / J.S. Webb, S. T. Lyndal, J. Sally // J. Bacteriol. – 2003. – Vol. 185, № 15. – P. 4585–4592.
394. Weissborn, A. Characterization of the *Caulobacter crescentus* flagellar filament. Peptide analysis and filament organization / A. Weissborn, H.M. Steinman, L. Shapiro // J. Biol. Chem. – 1982. – Vol. 257. – P. 2066–2074.
395. Will, D. Contact stimulation of Tgl1 and type IV pili in *Myxococcus xanthus* / D. Will, S.S. Wu, D. Kaiser // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 180. – P. 759–761.
396. Wisniewski-Dyé, F. *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments / F. Wisniewski-Dyé, K. Borziak, G. Khalsa-Moyers, G. Alexandre, L.O. Sukharnikov, K. Wuichet, G.B. Hurst, W.H. McDonald, J.S. Robertson, V. Barbe, A. Calteau, Z. Rouy, S. Mangenot, C. Prigent-Combaret, P. Normand, M. Boyer, P. Siguier, Y. Dessaux, C. Elmerich, G.

Condemine, G. Krishnen, I. Kennedy, A.H. Paterson, V. González, P. Mavingui, I.B. Zhulin // PLoS Genet. – 2011. – Vol. 7, № 12.

397. Wisniewski-Dyé, F. Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation / F. Wisniewski-Dyé, L. Lozano, E. Acosta-Cruz, S. Borland, B. Drogue, C. Prigent-Combaret, Z. Rouy, V. Barbe, A. Mendoza Herrera, V. González, P. Mavingui // Genes. – 2012. – Vol. 3, № 4. – P. 576–602.

398. Wood, P.J. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides // Carbohydr. Res. – 1980. – Vol. 85. – P. 271–287.

399. Wood, C.C. Membrane potential, proton and sodium motive forces in *Azospirillum brasilense* Sp7–S / C.C. Wood, R.J. Ritchie, I.R. Kennedy // FEMS Microbiol. Lett. – 1998. – Vol. 164. – P. 295–301.

400. Wu, D. *Azospirillum oleiclasticum* sp. nov, a nitrogen-fixing and heavy oil degrading bacterium isolated from an oil production mixture of Yumen Oilfield / D. Wu, X.-J. Zhang, H.-C. Liu, Y.-G. Zhou, X.-L. Wu, Y. Nie, Y.-Q. Kang, M. Cai // System. Appl. Microbiol. – 2021. – Vol. 44, № 1.

401. Wuertz, S. A new method for extraction of extracellular polymeric substances from biofilms and activated sludge suitable for direct quantification of sorbed metals // Water Sci. Technol. – 2001. – Vol. 43. – P. 25–34.

402. Xavier, J.B. A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa* / J.B. Xavier, W. Kim, K.R. Foster // Mol. Microbiol. – 2011. – Vol. 79. – P. 166–179.

403. Xie, C.H. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa* / C.H. Xie, A. Yokota // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2005. – Vol. 55. – P. 1435–1438.

404. Yagoda-Shagam, J. Fluorescein isothiocyanate-labeled lectin analysis of the surface of the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* by flow cytometry /

J. Yagoda-Shagam, L.L. Barton, W.P. Reed, R. Chiovetti // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1988. – Vol. 54. – P. 1831–1837.

405. Yang, Y. *Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater / Y. Yang, R.R. Zhang, J. Feng, C. Wang, J. Chen // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2019. – Vol. 69, № 12. – P. 3676–3681.

406. Yildiz, F.H. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different / F.H. Yildiz, K.L. Visick // *Trends Microbiol.* – 2009. – Vol. 17. – P. 109–118.

407. Young, C.C. *Azospirillum rugosum* sp. nov. isolated from oil-contaminated soil / C.C. Young, H. Hupfer, C. Siering, M.J. Ho, A.B. Arun, W.A. Lai, P.D. Rekha, F.T. Shen, M.H. Hung, W.M. Chen, A.F. Yassin // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2008. – Vol. 58. – P. 959–963.

408. Yoshida, T. Nitrogen fixing activity in upland and flooded rice fields / T. Yoshida, R.R. Ancajas // *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* – 1973. – Vol. 37. – P. 42–46.

409. Zhang, W. Nutrient depletion in *Bacillus subtilis* biofilms triggers matrix production / W. Zhang, A. Seminara, M. Suaris, M.P. Brenner, D.A. Weitz, T.E. Angelini // *New J. Phys.* – 2014. – Vol. 16.

410. Zhao, Z.I. *Azospirillum thermophilum* sp. nov., isolated from a hot spring / Z.I. Zhao, H. Ming, C.L. Ding, W.L. Ji, L.J. Cheng, M. Niu, Y. Zhang, L.Y. Zhang, X.L. Meng, G.X. Nie // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2020. – Vol. 70, № 1. – P. 550–554.

411. Zhou, S. *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell / S. Zhou, L. Han, Y. Wang, G. Yang, L. Zhuang, P. Hu // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2013. – Vol. 63 – P. 2618–2624.

412. Zhou, Y. *Azospirillum palatum* sp. nov. isolated from forest soil in Zhejiang province, China / Y. Zhou, W. Wei, X. Wang, L. Xu, R. Lai // *J. Gen. Appl. Microbiol.* – 2009. – Vol. 55. – P. 1–7.

413. Zhulin, I.B. Motility, chemokinesis, and methylation-independent chemotaxis in *Azospirillum braslense* / I.B. Zhulin, J.P. Armitage // J. Bacteriol. – 1993. – Vol. 175. – P. 952–958.
414. Zimmer, W. An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum* / W. Zimmer, K. Roeben, H. Bothe // Planta. – 1988. – Vol. 176. – P. 333–342.
415. Zimmer, W. The phytohormonal interactions between *Azospirillum* and wheat / W. Zimmer, H. Bothe // Nitrogen fixation with non-legumes / Eds. F.A. Skinner, R.M. Boddey, I. Fendrik. – Kluwer Academic Publ., 1989. – P. 137–145.
416. Zogaj, X. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix / X. Zogaj, M. Nimtz, M. Rohde, W., U. Bokranz Römling // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol. 39. – P. 1452–1463.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

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., Филипьева 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-oxoacyl-[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. Филипьчева 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. (ВАК).

8. **Телешева Е.М.**, Синякин Д.Н., Шелудько А.В., Филипьчева 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. (ВАК).

9. **Шумилова Е.М.**, Шелудько А.В., Филипьчева 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., Филипьчева Ю.А., **Шумилова 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=1.156. 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., Филипьевичева 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.