

УДК 579.222+57.033+57.044

doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.363-374

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК БАЦИЛЛАМИ

Г.Р. Ахметова, Н.Л. Рудакова, Т.Л. Динь, М.Р. Шарипова

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Исследовано влияние ферментов протеолитического спектра на образование биопленок бациллами. Сравнение динамики формирования биопленок протеазодефицитными штаммами со штаммом дикого типа *B. subtilis* 168 показало повышение уровня образования биопленок. В условиях использования рекомбинантных штаммов с секретцией индивидуальных протеиназ (субтилизиноподобной протеиназы, глутамилэндопептидазы и метцинкиновой протеиназы *B. pumilus*) наблюдалось снижение уровня образования биопленок на 40% в случае субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы, в то время как присутствие металлоэндопептидазы приводило к повышению уровня биопленок на 10% относительно штамма дикого типа. Установлено, что протеазодефицитный штамм *B. subtilis* BRB14 с делецией 10 внеклеточных протеиназ более устойчив к этанольному и осмотическому стрессам.

Ключевые слова: *B. subtilis*, протеазодефицитные штаммы, биопленки, внеклеточные протеиназы *B. pumilus*, этанольный стресс, осмотический стресс

Введение

Биопленки – это форма существования аэробных спорообразующих бактерий в окружающей среде, позволяющая приобретать устойчивость к антимикробным агентами стрессовым факторам, а также способствующая выживанию бацилл в неблагоприятных условиях [1–3].

Биопленки образуются бациллами на различных естественных и искусственных поверхностях [4]. Их формирование вызывает загрязнение трубопроводов и скважин, производственных биореакторов, систем отопления зданий, вентиляций и др. [5]. Аналогичным образом в клинических условиях формируются биопленки грамотрицательных бактерий на медицинских имплантированных устройствах, являясь причиной до 80% всех бактериальных инфекций в жизненно-важных системах организма человека [6]. Показана роль биопленок в развитии таких заболеваний, как пародонтит, инфекции мочеполовых путей и среднего уха, муковисцидоз [7].

Благодаря свойствам биопленок микроорганизмы могут выступать в качестве потенциальных источников энергии в виде микробных топливных элементов [8], а также для эффективной очистки сточных вод, грунтов или атмосферы [9].

Наконец, биопленки почвенных сапрофитных микроорганизмов *B. subtilis* колонизируют корни растений. Исследования показали, что способность бацилл

образовывать биопленку на корнях растений коррелирует с защитой растений от патогенов [10–13]. Установлено, что штаммы *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides* и *B. sphaericus* вызывали значительное снижение заболеваемости сельскохозяйственных культур [14].

Многие авторы изучали влияние различных антимикробных соединений на формирование биопленок микроорганизмами [15–17]. Установлено ингибирование скорости образования биопленок в присутствии агентов или, наоборот, ее увеличение, изменение механической стабильности биопленки, поддержание ее структуры или разрушение под действием различных соединений.

В качестве модельного организма для изучения формирования биопленок широко используются штаммы *Bacillus subtilis*. Бактерии *B. subtilis* способны образовывать устойчивые структуры на поверхности жидких и агаризованных сред, а также на абиотических поверхностях (пластик, силикон), формируя биопленки в несколько этапов [18].

Мы сравнивали динамику образования биопленок штаммами бацилл с измененной экспрессией внеклеточных протеиназ (беспротеазные штаммы и штаммы с повышенной секрецией протеаз) с динамикой штамма дикого типа *B. subtilis* 168. Кроме того, мы исследовали влияние этанола и хлористого натрия на способность штаммов *B. subtilis* образовывать биопленки на жидкой среде.

Целью настоящей работы является оценка влияния секретируемых протеиназ бацилл и стрессовых факторов (NaCl и этанол) на процесс формирования биопленок.

1. Материалы и методы

1.1. Используемые в экспериментальной работе штаммы. Штаммы, которые были использованы в работе, представлены в табл. 1.

Для оценки влияния стрессовых факторов на образование биопленок штаммами *B. subtilis* использовали 96%-ный этанол в конечных концентрациях в среде культивирования 5% и 7.5%, а также 1 М NaCl. Выбранные нами концентрации стрессовых факторов не вызывали значительного снижения роста или гибели планктонной культуры (при культивировании на жидкой среде с качанием) [19].

1.2. Культивирование клеток. Штаммы бактерий культивировали при pH 7.4 и температуре 37 °C в синтетической E-среде [20]. В качестве инокулята для получения биопленок использовали 16-часовую ночную культуру, выращенную до стационарной фазы. Культивирование проводили в термостате в горизонтальном положении при 37 °C. После чего к культуре клеток добавляли растворы соединений и выращивали в 96-луночных круглодонных планшетах 12, 24, 36 и 48 ч.

1.3. Окрашивание биопленок. Формирование биопленки идентифицировали методом инкубации с кристаллическим фиолетовым (CV) [21] с модификациями [22]. Резким встряхиванием удаляли жидкое содержимое лунок и добавляли 125 мкл 0.1%-ного раствора генциан фиолетового. Инкубировали биопленки с красителем в течение 15–20 мин при комнатной температуре. Для удаления красителя планшеты промывали дистиллированной водой и оставляли

Табл. 1

Штаммы, использованные в работе

Штамм	Описание мутации	Источник
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Природный изолят	Профессор Й. Штюльке (J. Stülke), Геттингенский университет, Германия
Протеазодефицитные штаммы		
<i>Bacillus subtilis</i> BG20-36	$\Delta nprE-522$; $\Delta apr-684$ (без a/б)	Профессор Ю. Феррари (E. Ferrari), компания Genencor Int. Inc., США
<i>Bacillus subtilis</i> BRB08	$\Delta trpC2$; $\Delta nprB$; $\Delta aprE$; Δepr ; Δbpr ; $\Delta nprE$; Δmpr ; Δvpr ; $\Delta wprA$ (без a/б)	Компания Cobra Biologics, Великобритания
<i>Bacillus subtilis</i> BRB14	$\Delta trpC2$; $\Delta nprB$; $\Delta aprE$; Δepr ; Δbpr ; $\Delta nprE$; Δmpr ; Δvpr ; $\Delta wprA$; $\Delta htrA$; $\Delta htrB$ (без a/б)	
Штаммы с повышенной продукцией протеиназ		
<i>Bacillus subtilis</i> BG2036 (pGP382+mprBp)	Плазмида pGP382 с геном металлоэндопептидазы <i>B. pumilus</i> (MprBp) (Erm)	Коллекция штаммов лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов ИФМиБ Казанского федерального университета
<i>Bacillus subtilis</i> BG2036 (pGP382+aprBp)	Плазмида pGP382 с геном субтилизиноподобной протеиназы <i>B. pumilus</i> (AprBp) (Erm)	
<i>Bacillus subtilis</i> BG2036 (pGP382+gseBp)	Плазмида pGP382 с геном глутамилэндопептидазы <i>B. pumilus</i> (GseBp) (Erm)	

для просушивания на фильтровальной бумаге. В качестве растворителя использовали 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Раствор с ДМСО отбирали в объеме 125 мкл, помещали в чистые плоскодонные планшеты и измеряли оптическую плотность при длине волны 570 нм (на графиках OD₅₇₀) на спектрофотометре BioRad xMark Microplate (США).

1.4. Статистический анализ результатов. Математическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism, GraphPad Software (LA Jolla, CA, США) с использованием двухстороннего дисперсионного анализа Two-way ANOVA и критерия Тьюки для множественного парного сравнения количественных показателей разных групп. На графиках в виде погрешностей отложены 95%-ные доверительные интервалы для средних. Статистический анализ полученных результатов проводили, руководствуясь рекомендациями [23].

2. Результаты и их обсуждение

Биопленки *B. subtilis* – основной тип кооперативного существования бактерий в природных условиях. Жизнедеятельность бактерий, объединенных биопленкой, определяется физическими и химическими факторами, а также они регулируются и дифференцируются на субпопуляции в том числе под действием ферментов. Однако в настоящее время крайне мало сведений о действии ферментов на цикл развития биопленки. Такие знания полезны для разработки общей

стратегии управления синтезом биопленок спорообразующих бактерий *B. subtilis*, которые в настоящее время рассматривают как эффективное средство биоконтроля.

Мы исследовали влияние протеолитической активности на образование биопленки *B. subtilis*. Для этого использовали протеазодефицитные штаммы *B. subtilis* и рекомбинантные штаммы *B. subtilis*, способные к секреции гетерологичных экзопротеиназ с разными свойствами и принадлежащие к разным классам.

2.1. Пленкообразование протеазодефицитными штаммами *B. subtilis*.

В геноме *B. subtilis* идентифицированы 62 гена протеаз, из которых 14 являются секретируемыми [24]. Мы использовали протеазодефицитные штаммы: *B. subtilis* BG2036, в геноме которого инактивированы две внеклеточные протеиназы, штамм *B. subtilis* BRB8, в геноме которого инактивированы 8 внеклеточных протеиназ, а также штамм *B. subtilis* BRB14, в геноме которого инактивированы 10 внеклеточных протеиназ. Изучали динамику образования биопленки протеазодефицитными штаммами при pH 7.4 и температуре культивирования 37 °C (рис. 1). Все протеазодефицитные штаммы формировали биопленку по аналогии с бактериями дикого типа в тех же условиях и с сохранением максимума к 48-му часу роста культуры. Кроме того, как следует из полученных данных, протеазодефицитные штаммы формируют биопленку на том же уровне, что и дикий тип, и даже выше.

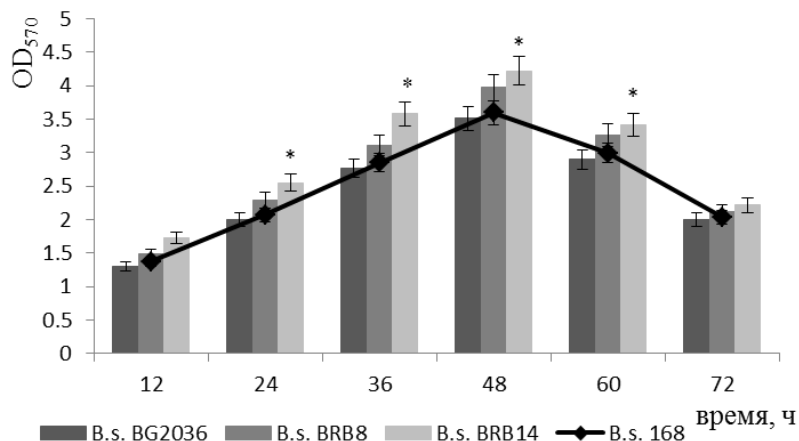


Рис. 1. Динамика образования биопленки протеазодефицитными штаммами *B. subtilis* на жидкой среде *E* при pH 7.4 и температуре 37 °C. * $p < 0.05$

2.2. Формирование биопленок штаммами *B. subtilis* с повышенной продукцией протеиназ.

Использовали протеазодефицитный штамм *B. subtilis* BG2036, в который трансформировали плазмиды, обеспечивающие экспрессию индивидуальных генов протеиназ: неспецифической субтилизиноподобной протеиназы (*B. subtilis* BG2036 (pGP382+aprVp), специфичной глутамилэндопептидазы *B. subtilis* BG2036 (pGP382+gseVp) и метцинкиновой металлопротеиназы *B. subtilis* BG2036 (pGP382+mpgVp). Все плазмиды несут гены, изолированные из ДНК бактерий *B. pumilus* 7P/3-19 под сильным конститутивным промотором.

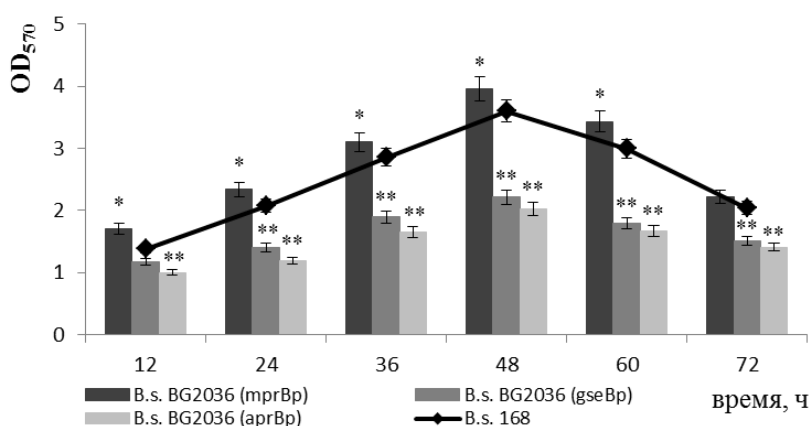


Рис. 2. Динамика формирования биопленок рекомбинантными штаммами *B. subtilis* с повышенной секрецией индивидуальных протеиназ: *B. subtilis* BG2036 (aprVp) – субтилизиноподобная протеиназа *B. pumilus*, *B. subtilis* BG2036 (gseVp) – глутамилэндопептидаза *B. pumilus* и *B. subtilis* BG2036 (mprVp) – металлоэндопептидаза *B. pumilus* на жидкой среде *E* при pH 7.4 и температуре 37 °C. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Изучали динамику формирования биопленок рекомбинантными штаммами с секрецией индивидуальных протеиназ (рис. 2).

Установлено, что при секреции субтилизиноподобной протеиназы (aprVp) и глутамилэндопептидазы (gseVp) существенно снижалось образование биопленок – на 40% к 48-му ч роста ($p < 0.001$). Оба фермента обладают выраженной протеолитической активностью и могут участвовать в протеолизе белкового компонента матрикса биопленки, чем и объясняется снижение уровня образования биопленки. Неожиданным для нас было наблюдение, что штамм *B. subtilis* BG2036 (pGP382+mprVp) с секрецией металлопротеиназы демонстрировал увеличение уровня биопленок на 10% ($p < 0.05$) по сравнению с диким типом. Металлоэндопептидаза *B. pumilus* является минорным компонентом спектра внеклеточных протеиназ бацилл, по ключевым характеристикам относится к семейству адамализинов/репролизинов клана метцинкинов [25]. Отсутствуют данные о функциональной роли этого фермента в клетках бацилл, поэтому в настоящее время мы не можем объяснить ее стимулирующее действие в отношении биопленок.

2.3. Влияние этанола на образование биопленки. Внесение этанола концентрации 5% в среду культивирования штамма *B. subtilis* 168 вызывает снижение уровня образования биопленок на 25% к 48-му часу роста ($p < 0.001$), а при концентрации 7.5% – 25%-ное снижение наблюдается уже на 12-й час роста культуры ($p < 0.05$) (рис. 3, а).

Для штамма *B. subtilis* BRB14 с делецией 10 различных внеклеточных протеиназ снижение образования биопленок при обеих концентрациях этанола не превысило 30% к 48-му часу роста ($p < 0.001$) (рис. 3, б).

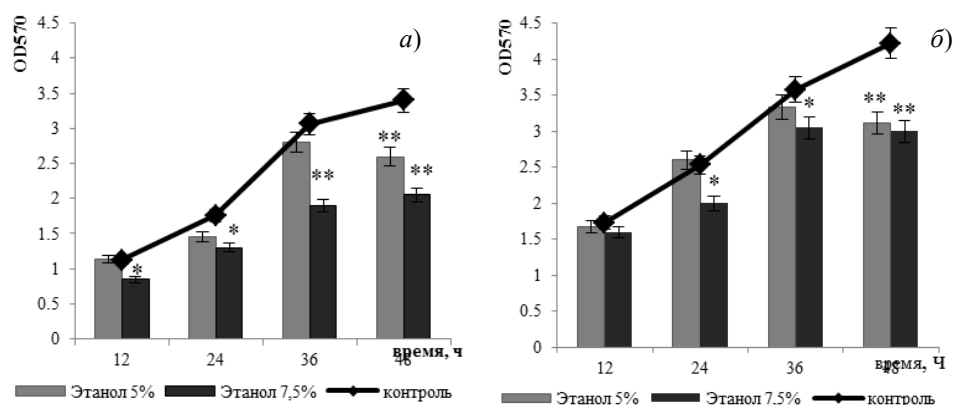


Рис. 3. Влияние этанола на уровень образования биопленок штаммами *B. subtilis*: а – *B. subtilis* 168, б – *B. subtilis* BRB14. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

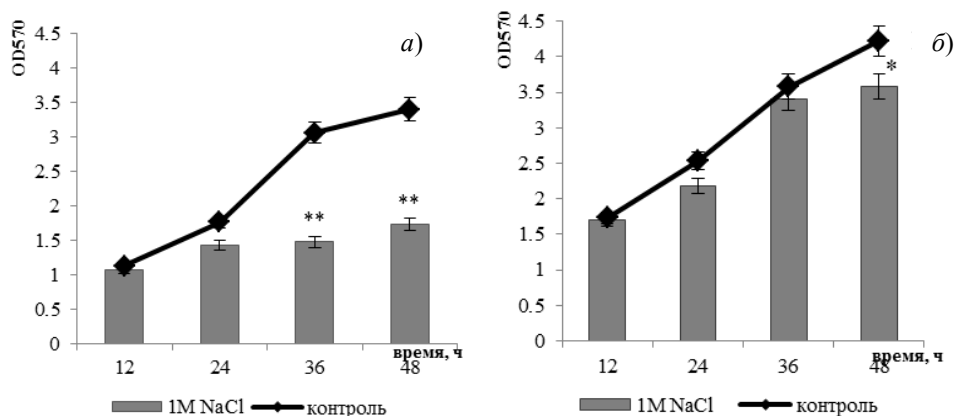


Рис. 4. Влияние NaCl на уровень образования биопленок штаммами *B. subtilis*: а – *B. subtilis* 168, б – *B. subtilis* BRB14. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Механизм действия спиртов состоит в том, что они денатурируют белки, содержащиеся в биопленке и мембране клеток, вызывая ингибирование образования биопленки. Это действие неспецифическое. Полученные данные показывают, что вызванная этиловым спиртом денатурация белка, по-видимому, снижает способность прикрепления клеток для образования биопленок, указывая на важную роль белков в этом процессе. В условиях этанольного стресса биопленка протеазодефицитного штамма *B. subtilis* BRB14 оказалась более устойчивой к действию этого агента при обеих концентрациях этилового спирта.

2.4. Влияние NaCl на образование биопленки. Внесение в среду культивирования NaCl в концентрации 1 М приводит к снижению образования биопленок природным штамм *Bacillus* более чем на 50% уже к 36-му часу роста ($p < 0.001$) (рис. 4, а). Наибольшую устойчивость к присутствию хлористого натрия демонстрирует рекомбинантный штамм *B. subtilis* BRB14, снижение образования биопленок у которого не превышали 15% к 48-му часу роста ($p < 0.05$) (рис. 4, б).

Заключение

Итак, нами установлено, что уровень формирования биопленки выше у протеазодефицитных штаммов *B. subtilis* в среднем на 10%, рекомбинантные штаммы, экспрессирующие гены сериновых протеиназ, субтилизиноподобной протеиназы и глутамилэндопептидазы, образуют биопленки с пониженным уровнем в среднем на 30%, штамм с экспрессией метцинкиновой адамализиноподобной металлопротеиназы отличается повышенным уровнем образования биопленки, что, возможно, связано с функциональной ролью этого фермента *in vivo*.

Штамм дикого типа и протеазодефицитный штамм *B. subtilis* отвечают на этанольный стресс одинаково – уровень образования биопленок снижается у обоих штаммов. При этом протеазодефицитный штамм с делецией 10 внеклеточных протеиназ сохраняет большую устойчивость к этанолу. К осмотическому стрессу дикий штамм проявляет большую чувствительность, чем протеазодефицитный. Тем не менее мы показали, что в присутствии 1 М NaCl в биопленке сохраняется структурированное сообщество устойчивых бактерий, которые помогают выжить популяции в условиях солевого стресса. Имеются данные, что гистидинкиназа *B. subtilis* может функционировать как осмосенсор за счет внеклеточного домена SACHЕ, что, по-видимому, важно для продолжения колонизации *B. subtilis* в стрессовых условиях [26]. Таким образом, биопленка *B. subtilis* устойчива к этанольному и солевому стрессу.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Литература

1. Baslé A., Hewitt L., Koh A., Lamb H.K., Thompson P., Burgess J.G., Hall M.J., Hawkins A.R., Murray H., Lewis R.J. Crystal structure of NucB, a biofilm-degrading endonuclease // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 46, No 1. – P. 473–484. – doi: 10.1093/nar/gkx1170.
2. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2002. – V. 15, No 2. – P. 167–193. – doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
3. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1995. – V. 49. – P. 711–745. – doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
4. Vlamakis H., Chai Y., Beaugregard P., Losick R., Kolter R. Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. – V. 11, No 3. – P. 157–168. – doi: 10.1038/nrmicro2960.
5. Epstein A.K., Pokroy B., Seminara A., Aizenberg J. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration // *Appl. Phys. Sci.* – 2011. – V. 108, No 3. – P. 995–1000. – doi: 10.1073/pnas.1011033108.
6. Römling U., Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies // *J. Intern. Med.* – 2012. – V. 272, No 6. – P. 541–561. – doi: 10.1111/joim.12004.

7. Biel M.A. Photodynamic therapy of bacterial and fungal biofilm infections // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – V. 635. – P. 175–194. – doi: 10.1007/978-1-60761-697-9_13.
8. Cairns L.S., Hobbey L., Stanley-Wall N.R. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms // *Mol. Microbiol.* – 2014. – V. 93, No 4. – P. 587–598. – doi: 10.1111/mmi.12697.
9. Davey M.L., O'Toole G.A. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2000. – V. 64, No 4. – P. 847–867. – doi: 10.1128/mubr.64.4.847-867.2000.
10. Chen Y., Cao S., Chai Y., Clardy J., Kolter R., Guo J.H., Losick R. *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants // *Mol. Microbiol.* – 2012. – V. 85, No 3. – P. 418–430. – doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08109.x.
11. Chen Y., Yan F., Chai Y., Liu H., Kolter R., Losick R., Guo K.H. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation // *Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 15, No 3. – P. 848–864. – doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x.
12. Garcia-Gutierrez L., Zeriuoh H., Romero D., Cubero J., de Vicente A., Perez-Garcia A. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses // *Microb. Biotechnol.* – 2013. – V. 6, No 3. – P. 264–274. – doi: 10.1111/1751-7915.12028.
13. Zeriuoh H., de Vicente A., Perez-Garcia A., Romero D. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity // *Environ. Microbiol.* – 2013. – V. 16, No 7. – P. 2196–2211. – doi: 10.1111/1462-2920.12271.
14. Choudhary D.K., Johri B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR) // *Microbiol. Res.* – 2009. – V. 164, No 5. – P. 493–513. – doi: 10.1016/j.micres.2008.08.007.
15. McDonnell G., Russell A.D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1999. – V. 12, No 1. – P. 147–179.
16. Dorman H.J., Deans S.G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils // *J. Appl. Microbiol.* – 2000. – V. 88, No 2. – P. 308–316. – doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.
17. Ishida H., Ishida Y., Kurosaka Y., Otani T., Sato K., Kobayashi H. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1998. – V. 42, No 7. – P. 1641–1645. – doi: 10.1128/AAC.42.7.1641.
18. Aguilar C., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2007. – V. 10, No 6. – P. 638–643. – doi: 10.1016/j.mib.2007.09.006.
19. Чернова Л.С., Шарафутдинов И.С., Каюмов А.Р. Гиперпродукция белка HtrA повышает выживаемость клеток *Bacillus subtilis* в условиях стресса и стимулирует формирование биопленки // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2017. – Т. 159, кн. 2. – С. 262–271.
20. Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R., Kanaya S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate // *Microbiology.* – 2006. – V. 152, Pt. 9. – P. 2801–2807. – doi: 10.1099/mic.0.29060-0.
21. O'Toole G.A., Pratt L.A., Watnick P.I., Newman D.K., Weaver V.B., Kolter R. Genetic approaches to study of biofilms // *Methods Enzymol.* – 1999. – V. 310. – P. 97–109. – doi: 10.1016/S0076-6879(99)10008-9.

22. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilms // Curr. Protoc. Microbiol. – 2006. – No 1 – P. 1B.1.1–1B.1.17. – doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.
23. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 180 с.
24. Rey M.W., Ramaiya P., Nelson B.A., Brody-Karpin B.A., Zaretsky E.J., Tang M., de Leon A.L., Xiang H., Gusti V., Clausen I.G., Olsen P.B., Rasmussen M.D., Andersen M.D., Jørgensen P.L., Larsen T.S., Sorokin A., Bolotin A., Lapidus A., Gelleron N., Ehrlich S.D., Berka R.M. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species // Genome Biol. – 2004. – V. 5, No 10. – Art. R77, P. 1–12. – doi: 10.1186/gb-2004-5-10-r77.
25. Балабан Н.П., Рудакова Н.Л., Сабирова А.Р., Валеева Л.Р., Шарипова М.Р. Первая адамализиноподобная микробная металлоэндопептидаза // Биоорганич. химия. – 2012. – Т. 38, № 4. – С. 439–448.
26. Shemesh M., Chai Y. A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling // J. Bacteriol. – 2013. – V. 195, No 12. – P. 2747–2754. – doi: 10.1128/JB.00028-13.

Поступила в редакцию
15.04.19

Ахметова Гульназ Римовна, студент Института фундаментальной медицины и биологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: gulnaz55@inbox.ru

Рудакова Наталья Леонидовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ «Микробные биотехнологии»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: natalialrudakova@mail.ru

Динь Тхи Лан, аспирант кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: nhanhlanrung01102000@gmail.com

Шарипова Маргарита Рашидовна, доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: marsharipova@gmail.com

doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.363-374

The Role of Various Factors in the Process of Biofilm Formation by BacilliG.R. Akhmetova^{*}, N.L. Rudakova^{**}, T.L. Din^{***}, M.R. Sharipova^{****}

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ^{*}gulnaz55@inbox.ru, ^{**}natalialrudakova@mail.ru,^{***}nhanhlanrung01102000@gmail.com, ^{****}marsharipova@gmail.com

Received April 15, 2019

Abstract

The strategy of existence of microorganisms in the structure of biofilms determines their adaptation to specific environmental conditions. Bacteria of the genus *Bacillus* are actively used as models for studying the processes of regulation and formation of biofilms. This work aims to assess the effect of proteases secreted by bacilli on the formation of biofilms, as well as on the resistance of recombinant strains to environmental stress factors. We compared the dynamics of biofilm formation by the wild strain *B. subtilis* 168 and the following strains with altered expression of extracellular proteases: non-protease strains (*B. subtilis* BG2036, *B. subtilis* BRB8, and *B. subtilis* BRB14) and strains with increased protease secretion (*B. subtilis* (aprBp), *B. subtilis* (gseBp), and *B. subtilis* (mprBp)). We also investigated the effect of ethanol and sodium chloride on the ability of the *B. subtilis* strains to form biofilms in a liquid medium.

The bacterial strains were cultured at pH 7.4 and temperature 37 °C in a synthetic *E*-medium in U-shaped 96-well plates. Biofilm formation was identified by incubation with crystal violet (CV).

We found that the level of biofilm formation is higher (by an average of 10%) in the protease-deficient strains of *B. subtilis*. The recombinant strains expressing genes of serine proteases form biofilms with a reduced level (by an average of 40%). A strain with the expression of metalloendopeptidase is characterized by an increased level of biofilm formation (up to 10%), which is possibly due to the functional in vivo role of this new enzyme. The wild and protease-deficient strains of *B. subtilis* respond similarly to ethanol stress: biofilm formation is reduced in both of them. The wild strain exhibits a greater sensitivity to osmotic stress than the protease-deficient one.

Keywords: *B. subtilis*, protease-deficient strains, biofilms, extracellular proteases of *B. pumilus*, ethanol stress, osmotic stress

Acknowledgments. The work is performed according to the Russian Government Program of Competitive Growth of Kazan Federal University.

Figure Captions

Fig. 1. The dynamics of biofilm formation by protease-deficient strains of *B. subtilis* in a liquid *E*-medium at pH 7.4 and temperature 37 °C. * $p < 0.05$.

Fig. 2. The dynamics of biofilm formation by recombinant strains of *B. subtilis* with increased secretion of certain proteases: *B. subtilis* BG2036 (aprBp) – subtilisin-like protease of *B. pumilus*, *B. subtilis* BG2036 (gseBp) – glutamylendopeptidase of *B. pumilus*, and *B. subtilis* BG2036 (mprBp) – metalloendopeptidase of *B. pumilus* in a liquid *E*-medium at pH 7.4 and temperature 37 °C. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Fig. 3. The effect of ethanol on the ability of *B. subtilis* strains to form biofilms: *a* – *B. subtilis* 168, *b* – *B. subtilis* BRB14. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Fig. 4. The effect of NaCl on the ability of *B. subtilis* strains to form biofilms: *a* – *B. subtilis* 168, *b* – *B. subtilis* BRB14. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

References

1. Baslé A., Hewitt L., Koh A., Lamb H.K., Thompson P., Burgess J.G., Hall M.J., Hawkins A.R., Murray H., Lewis R.J. Crystal structure of NucB, a biofilm-degrading endonuclease. *Nucleic Acids Res.*, 2017, vol. 46, no. 1, pp. 473–484. doi: 10.1093/nar/gkx1170.
2. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, vol. 15, no. 2, pp. 167–193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.
3. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, vol. 49, pp. 711–745. doi: 10.1146/annurev.mi.49.100195.003431.
4. Vlamakis H., Chai Y., Beauregard P., Losick R., Kolter R. Sticking together: Building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2013, vol. 11, no. 3, pp. 157–168. doi: 10.1038/nrmicro2960.
5. Epstein A.K., Pokroy B., Seminara A., Aizenberg J. Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Appl. Phys. Sci.*, 2011, vol. 108, no. 3, pp. 995–1000. doi: 10.1073/pnas.1011033108.
6. Römmling U., Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J. Intern. Med.*, 2012, vol. 272, no. 6, pp. 541–561. doi: 10.1111/joim.12004.
7. Biel M.A. Photodynamic therapy of bacterial and fungal biofilm infections. *Methods Mol. Biol.*, 2010, vol. 635, pp. 175–194. doi: 10.1007/978-1-60761-697-9_13.
8. Cairns L.S., Hogley L., Stanley-Wall N.R. Biofilm formation by *Bacillus subtilis*: New insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Mol. Microbiol.*, 2014, vol. 93, no. 4, pp. 587–598. doi: 10.1111/mmi.12697.
9. Davey M.L., O'Toole G.A. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64, no. 4, pp. 847–867. doi: 10.1128/mubr.64.4.847-867.2000.
10. Chen Y., Cao S., Chai Y., Clardy J., Kolter R., Guo J.H., Losick R. *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plants. *Mol. Microbiol.*, 2012, vol. 85, no. 3, pp. 418–430. doi: 10.1111/j.1365-2958.2012.08109.x.
11. Chen Y., Yan F., Chai Y., Liu H., Kolter R., Losick R., Guo K.H. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environ. Microbiol.*, 2013, vol. 15, no. 3, pp. 848–864. doi: 10.1111/j.1462-2920.2012.02860.x.
12. Garcia-Gutierrez L., Zeriouh H., Romero D., Cubero J., de Vicente A., Perez-Garcia A. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microb. Biotechnol.*, 2013, vol. 6, no. 3, pp. 264–274. doi: 10.1111/1751-7915.12028.
13. Zeriouh H., de Vicente A., Perez-Garcia A., Romero D. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environ. Microbiol.*, 2013, vol. 16, no. 7, pp. 2196–2211. doi: 10.1111/1462-2920.12271.
14. Choudhary D.K., Johri B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiol. Res.*, 2009, vol. 164, no. 5, pp. 493–513. doi: 10.1016/j.micres.2008.08.007.
15. McDonnell G., Russell A.D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, vol. 12, no. 1, pp. 147–179.
16. Dorman H.J., Deans S.G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 2000, vol. 88, no. 2, pp. 308–316. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.
17. Ishida H., Ishida Y., Kurosaka Y., Otani T., Sato K., Kobayashi H. In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, vol. 42, no. 7, pp. 1641–1645. doi: 10.1128/AAC.42.7.1641.
18. Aguilar C., Vlamakis H., Losick R., Kolter R. Thinking about *Bacillus subtilis* as a multicellular organism. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2007, vol. 10, no. 6, pp. 638–643. doi: 10.1016/j.mib.2007.09.006.
19. Chernova L.S., Sharafutdinov I.S., Kayumov A.R. HtrA protein hyperproduction increases the viability of *Bacillus subtilis* cells under the stress conditions and stimulates biofilm formation. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2017, vol. 159, no. 2, pp. 262–271. (In Russian)

20. Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R., Kanaya S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. *Microbiology*, 2006, vol. 152, pt. 9, pp. 2801–2807. doi: 10.1099/mic.0.29060-0.
21. O'Toole G.A., Pratt L.A., Watnick P.I., Newman D.K., Weaver V.B., Kolter R. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.*, 1999, vol. 310, pp. 97–109. doi: 10.1016/S0076-6879(99)10008-9.
22. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilms. *Curr. Protoc. Microbiol.*, 2006, no. 1, pp. 1B.1.1–1B.1.17. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.
23. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. *Statisticheskie metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh* [Statistical Methods in Microbiological Studies]. Leningrad, Medgiz, 1962. 180 p. (In Russian)
24. Rey M.W., Ramaiya P., Nelson B.A., Brody-Karpin B.A., Zaretsky E.J., Tang M., de Leon A.L., Xiang H., Gusti V., Clausen I.G., Olsen P.B., Rasmussen M.D., Andersen M.D., Jørgensen P.L., Larsen T.S., Sorokin A., Bolotin A., Lapidus A., Galleron N., Ehrlich S.D., Berka R.M. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biol.*, 2004, vol. 5, no. 10, art. R77, pp. 1–12. doi: 10.1186/gb-2004-5-10-r77.
25. Balaban N.P., Rudakova N.L., Sabirova A.R., Valeeva L.R., Sharipova M.R. The novel ADAMs-like microbial metalloendopeptidase. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2012, vol. 38, no. 4, pp. 383–391. doi: 10.1134/S1068162012040036.
26. Shemesh M., Chai Y. A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling. *J. Bacteriol.*, 2013, vol. 195, no. 12, pp. 2747–2754. doi: 10.1128/JB.00028-13.

Для цитирования: Ахметова Г.Р., Рудакова Н.Л., Динь Т.Л., Шарипова М.Р. Влияние различных факторов на формирование биопленок бациллами // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2019. – Т. 161, кн. 3. – С. 363–374. – doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.363-374.

For citation: Akhmetova G.R., Rudakova N.L., Din T.L., Sharipova M.R. The role of various factors in the process of biofilm formation by bacilli. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2019, vol. 161, no. 3, pp. 363–374. doi: 10.26907/2542-064X.2019.3.363-374. (In Russian)