



## БИОЛОГИЯ

УДК 579.262

### О ВКЛАДЕ АГРЕГАЦИИ КЛЕТОК И ЭКСТРАКЛЕТОЧНОЙ ДНК В ФОРМИРОВАНИЕ И СТАБИЛИЗАЦИЮ БИОПЛЕНОК БАКТЕРИЙ *AZOSPIRILLUM BRASILENSE*

Ю. А. Филиппчева, Е. М. Телешева, С. С. Евстигнеева,  
А. В. Шелудько, Е. Г. Пономарева, Л. П. Петрова, Е. И. Кацы

Филиппчева Юлия Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, ljuche@yandex.ru

Телешева Елизавета Михайловна, аспирант, младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, sentebrinka@mail.ru

Евстигнеева Стелла Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, stels20295@yandex.ru

Шелудько Андрей Вячеславович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, shel71@yandex.ru

Пonomарева Елена Геннадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, ponomareva\_e@ibppm.ru

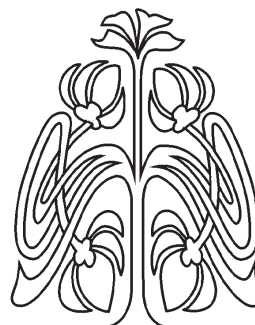
Петрова Лилия Петровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, petrova\_lp@mail.ru

Кацы Елена Ильинична, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, ei\_katsy@mail.ru

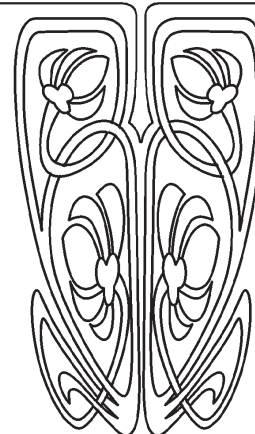
Имеется мало данных о функциях основных компонентов матрикса и роли разнообразных структур клеточной поверхности в образовании и стабилизации биопленок азоспирилл. Известно, что по сравнению со штаммом *A. brasilense* Sp245 его дефектные по сборке жгутиков мутанты по генам *flhB*, *fabG1* или *mmsB1* хуже формируют биопленки. В данной работе сравнивали агрегацию бактерий и формирование ими биопленок, действие ДНКазы на биопленки. Результаты исследований показали, что агрегация клеток в планктонной культуре обуславливает начальные этапы формирования биопленок, но не способствует приросту биомассы зрелых пленок, что наиболее очевидно в случае мутантов. Экстраклеточная ДНК является частью многокомпонентной системы, обеспечивающей сродство биопленок к поверхностям с разными физико-химическими свойствами и их структурную целостность.

**Ключевые слова:** *Azospirillum brasilense*, агрегация бактерий, матрикс биопленок, экстраклеточная ДНК.

DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406>



НАУЧНЫЙ  
ОТДЕЛ





## Введение

Альфапротеобактерии *Azospirillum brasilense* обитают в разнообразных природных средах, в частности в фитосфере, и могут вступать в ассоциативное взаимодействие с широким кругом растений [1]. Определенное значение для успешного функционирования растительно-микробной ассоциации может иметь способность азоспирилл формировать биопленки – сообщества бактерий, внедренных в толстый слизистый слой матрикса [2]. Информация о микроструктуре биопленок азоспирилл, в частности о морфологии клеток, интегрированных в биопленку, и основных компонентах матрикса (внеклеточные полисахариды, белки и ДНК) фрагментарна, но необходима для понимания механизмов формирования и дисперсии биопленок, подбора способов управления данными процессами. Так, дефекты в образовании полярного жгутика (Fla), липополисахаридов (ЛПС) и полисахаридов, связывающих калькофлуор, оказывают заметное влияние на эффективность формирования биопленок соответствующих мутантов штамма *A. brasilense* Sp245 [3–5]. Сохранение Fla на клетках *A. brasilense* Sp245, интегрированных в зрелую биопленку, способствует поддержанию ее целостности и повышает ее устойчивость в условиях гидродинамического сдвига [4]. Отличные от жгутиков белковые компоненты поверхности азоспирилл, чувствительные к действию проназы и трипсина, необходимы для прочного соединения бактерий в биопленках и вносят вклад в прикрепление биопленок к субстрату [6].

Биопленки многих микроорганизмов также содержат в составе матрикса экстраклеточную ДНК (эДНК) [7]. Считается, что эДНК – это компонент матрикса, освобождающийся в связи с лизисом клеток, однако для некоторых бактерий показано участие эДНК в процессе агрегации клеток [8]. Например, это справедливо для бактерий рода *Rhodovulum*, способных к самоосаждению [9]. Внеклеточные ДНК являются компонентами матрикса биопленок *A. brasilense* [10]. Участие этих компонентов в организации архитектуры пленок азоспирилл остается неясным. В планктонной культуре флокуляция бактерий, опосредованная компонентами клеточной поверхности, характерна для азоспирилл [5, 11, 12], однако взаимосвязь процессов агрегации клеток и формирования биопленок у этих микробов не исследована.

Поскольку формирование и устойчивость микроструктуры биомассы биопленок азоспирилл обусловлены в том числе и компонентами их клеточной поверхности, мутанты, лишённые

жгутиков, являются удобной моделью для изучения функциональной роли компонентов матрикса бактериальных биопленок. В данном аспекте интересны мутант Sp245 по гену *flhB1* (кодирует компонент экспортной жгутиковой поры) и мутанты Sp245 по предполагаемым генам 3-гидроксиизобутиратдегидрогеназы (*mmsB1*) и 3-оксоацил-[ацил-переносающий белок]-редуктазы (*fabG1*). Эти мутанты имеют дефекты в образовании латеральных жгутиков (Laf) и/или Fla и соответственно в роении и активном плавании [13, 14]. Инактивация предполагаемых генов *fabG1* или *mmsB1* также повлияла на такие характеристики бактерий, как относительное содержание ряда жирных кислот в препаратах ЛПС и гидрофобность планктонных клеток [5].

Целью данной работы явилось исследование значения агрегации клеток и эДНК для стабилизации биопленок азоспирилл.

## Материалы и методы

**Бактериальные штаммы.** В работе использовали штамм *A. brasilense* Sp245, выделенный из корней пшеницы [15], и его инсерционные  $Km^R$  Fla<sup>-</sup> Laf<sup>-</sup> Sp245.1063 (*flhB1::Omegon-Km*) [13], leaky Fla<sup>-</sup> Laf<sup>-</sup> Sp245.1610 (*fabG1::Omegon-Km*) и leaky Fla<sup>-</sup> SK039 (*mmsB1::Omegon-Km*) мутанты [14].

**Среды для культивирования бактерий.** Культивирование бактерий проводили на минимальной малатно-солевой среде (MSM) [16] или богатой среде LB [17] при 28°C. При выращивании устойчивых к канамицину мутантов в среды вносили канамицин (Km) до 50 мкг/мл.

**Оценка биомассы биопленок.** Жидкие 18-часовые бактериальные культуры разбавляли средой LB или MSM до  $A_{590}$ , равной 0.05–0.10, вносили в стеклянные пробирки (по 2 мл) и инкубировали при 28°C стационарно. Перед окрашиванием биопленок удаляли планктонные бактерии. Биопленки окрашивали 1%-ным водным раствором красителя кристаллического фиолетового при комнатной температуре 10 мин и дважды промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в этаноле и измеряли  $A_{590}$  [4]. Пленки, сформированные на покровных стеклах, использовали для микроскопии.

**Исследование агрегации бактериальных клеток.** По 5 мл бактериальных культур, выращенных в условиях интенсивной аэрации, или жидких культур планктонных бактерий, окружавших биопленки, отстаивали в течение 30 мин [11, 12]. Осторожно декантировали жидкость, а из осевших агрегатов готовили взвесь в 5 мл 50 мМ фосфатного буфера (ФБ; pH 7.0) и оставляли для



отстаивания на 2 ч. Измеряли  $A_{590}$  надосадочной жидкости, затем осевшие агрегаты клеток 2 мин диспергировали в жидкости с помощью магнитной мешалки. Процент агрегационной дисперсии определяли по формуле

$$A = ((A_{590})_2 - (A_{590})_1) / (A_{590})_1 \times 100 \%,$$

где  $(A_{590})_1$  – показатель  $A_{590}$  культуральной жидкости (взвеси) после отстаивания агрегатов до их диспергирования, а  $(A_{590})_2$  – показатель  $A_{590}$  взвеси после диспергирования агрегатов.

**Обработка био пленок ДНКазой.** ДНКазу (Fluka, Швейцария) растворяли в 10 мМ Tris-HCl буфере (рН 8.0), содержащем 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, до концентрации 1 мг/мл. В контрольных вариантах использовали ФБ (рН 7.0). По 2 мл раствора фермента, разведенного в 50 мМ ФБ (рН 7.0) в соотношении 1:9, добавляли к био пленкам, предварительно удалив планктонную культуру, и инкубировали 2 ч при 37°C. После инкубации био пленки однократно отмывали дистиллированной водой и окрашивали, как описано выше. Результаты выражали в процентах относительно соответствующих контрольных проб.

**Оценка содержания нуклеиновых кислот в матриксе био пленок.** Выделение компонентов матрикса и определение содержания в них нуклеиновых кислот проводили согласно рекомендациям, приведенным в работе [18]. Биомассу 6-суточных био пленок, сформированных на поверхности стекла, после удаления планктонных бактерий промывали 50 мМ ФБ (рН 7.0) и смывали пипетированием этим буфером. Анализировали легко смываемые компоненты, перешедшие в надосадочную жидкость при центрифугировании биомассы после ее промывания ФБ (рН 7.0) (ФБ-«экстракты»). Процедуру повторяли трижды, собирая надосадочную жидкость. Содержание в экстрактах белка, углеводсодержащих компонентов и нуклеиновых кислот определяли соответственно рекомендациям, описанным в работе [18].

**Световая микроскопия био пленок.** Фазово-контрастную микроскопию проводили в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» при ИБФРМ РАН (Саратов) на аппарате Leica LMD 7000 (Leica, Германия).

**Статистическая обработка результатов.** Оценку биомассы био пленок выполняли 30–50 раз в каждом варианте опыта. В остальных случаях проводили не менее трех независимых экспериментов с количественными измерениями как минимум в трех повторностях. Результаты статистически обрабатывали с использованием пакета Micro-

soft Office Excel 2007. Доверительные интервалы определяли для 95%-ного уровня значимости.

## Результаты и их обсуждение

**Исследование динамики формирования био пленок.** Было осуществлено сравнение динамики накопления биомассы в пленках, формируемых штаммом *A. brasilense* Sp245 и его дефектными по жгутикованию мутантами Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 на границе раздела фаз «жидкость – твердая гидрофильная поверхность (стекло)». В первые сутки инкубации бактерий в жидкой среде LB на поверхности стеклянных пробирок формировались тонкие пленки, при микроскопии которых просматривались разрозненные клеточные агрегаты (микроколонии). На 2–3-и сутки инкубации в жидкой среде LB биомасса штаммов Sp245, Sp245.1063 и Sp245.1610, закрепившихся на поверхности пробирок, стабилизируется – без существенных межштаммовых различий (рис. 1).

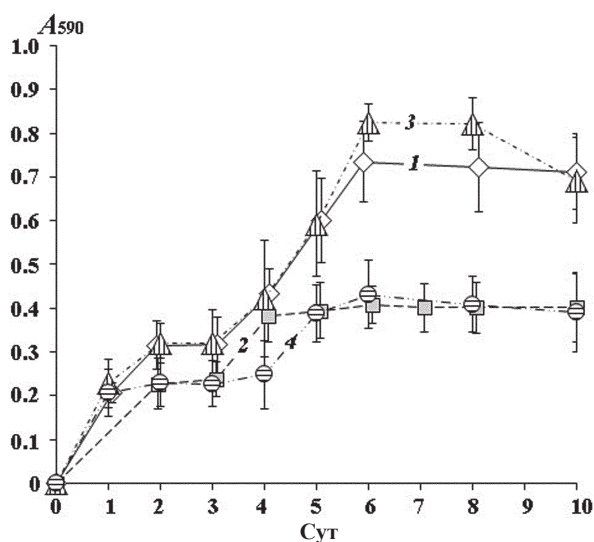


Рис. 1. Динамика накопления биомассы в био пленках, сформированных бактериями *A. brasilense* Sp245 (1), Sp245.1063 (2), Sp245.1610 (3) и SK039 (4) на поверхности стекла под жидкой средой LB в стационарных условиях.  $A_{590}$  – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания био пленок

Вероятно, в данном временном промежутке завершается процесс адгезии бактерий на поверхности стекла. Лишь в случае бактерий штамма SK039 увеличивается продолжительность их адгезии на гидрофильной поверхности до 4 суток, что можно объяснить более высокой гидрофобностью клеток этого мутанта по сравнению с родительским штаммом Sp245 [5]. После завершения этого этапа бактериальные микроколонии сливаются в пленку с более ровной поверхностью, и начинается прирост биомассы. В случае штаммов Sp245.1063 и SK039





количество биомассы в биопленке стабилизируется к 4–5-м суткам инкубации и остается неизменным на всем протяжении культивирования (см. рис. 1). Толщина биопленок, сформированных родительским штаммом Sp245 или мутантом Sp245.1610, становится постоянной позже – после 6 дней инкубации (см. рис. 1). Таким образом, к 6-м суткам культивирования все исследованные штаммы формируют зрелую биопленку (см. рис. 1). На стекле под LB биомасса зрелых биопленок Sp245.1610

не отличается от показателей штамма Sp245, остальные мутанты образуют более тонкие пленки (см. рис. 1). Под MSM по сравнению с Sp245 все мутанты формируют биопленки с меньшим количеством биомассы (рис. 2, а). Результаты определения относительного количества биомассы в зрелых биопленках азоспирилл с помощью окрашивания и результаты прямых микроскопических измерений толщины биопленок согласуются между собой [4].

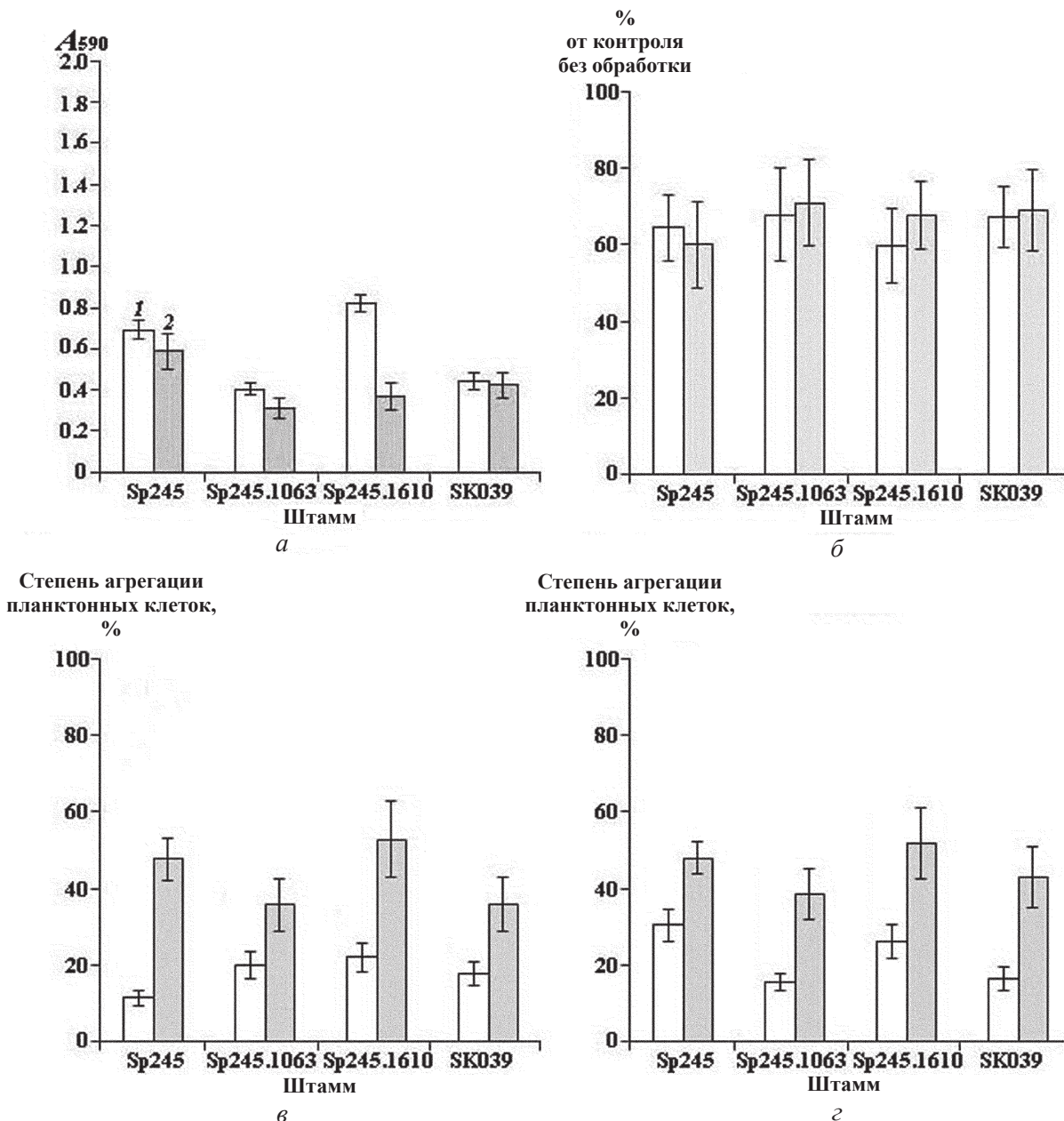


Рис. 2. Влияние ДНКазы (б) на биомассу биопленок *A. brasilense* (а), сформированных на стекле под жидкой средой LB (1) или MSM (2), и степень агрегации планктонных клеток (в, г) после 2 (в) и 6 (г) суток культивирования; а –  $A_{590}$  – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок *A. brasilense*; б – процентное отношение  $A_{590}$  красителя, десорбированного с окрашенных пленок после их инкубации в растворе ДНКазы (100 мкг/мл) к аналогичному показателю без обработки



Таким образом, начальные этапы формирования биопленки – прикрепление и адгезия бактерий на поверхности стекла, вероятно, протекают независимо от способности клеток синтезировать жгутики. Лишь в случае мутанта SK039 увеличивается продолжительность адгезии клеток на стекле до 4 суток. Тем не менее полноценный Fla необходим азоспириллам для активной адгезии [19]. Как уже отмечалось, на ранних этапах биопленки мутантов и родительского штамма образованы разрозненными клеточными агрегатами (микроколониями). Возможно, активная агрегация бактерий уже в планктонной культуре способствует их прикреплению к твердой поверхности, особенно в случае мутантов без полноценного Fla.

#### *Влияние продолжительности и условий культивирования на способность бактерий к агрегации*

Все штаммы имеют примерно одинаковую скорость роста на жидких средах LB или MSM. В статичных условиях в начале стационарной фазы роста на 2-е сутки культивирования (этап прикрепления бактерий к твердой поверхности (см. рис. 1)) в LB степень агрегации клеток в планктонных культурах Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 выше, чем у Sp245, при этом относительное количество биомассы в биопленках всех штаммов примерно одинаково (см. рис. 1, 2, в). Вероятно, активная агрегация бактерий уже в планктонной культуре способствует их прикреплению к твердой поверхности, особенно в случае мутантов без полноценного Fla, необходимого азоспириллам для активной адгезии [19].

При культивировании в LB на 6-е сутки в случае мутантов агрегация планктонных клеток не изменяется, а у Sp245 возрастает в 2 раза до уровня Sp245.1610 (см. рис. 2, з). На стекле относительное количество биомассы в биопленках этих штаммов в данный период культивирования также примерно одинаково (см. рис. 1, 2, а).

При культивировании в MSM стационарно клетки всех исследованных штаммов агрегировали примерно одинаково независимо от времени инкубации, а процент агрегации превышал данный показатель в LB (см. рис. 2, в, з). Тем не менее в MSM, как и в LB, сохраняются различия в толщине зрелых пленок Sp245 и Sp245.1063 или SK039 (см. рис. 2, а). Очевидно, что агрегация клеток в 6-суточной планктонной культуре этих трех штаммов существенным образом не влияет на количество биомассы зрелых биопленок. В случае Sp245.1610 под MSM толщина зрелых биопленок уступает показателю этого мутанта под LB (см. рис. 2, а). Одной из причин зависи-

мости толщины биопленок Sp245.1610 от состава среды культивирования могут являться различия в степени гидрофобности клеток этого мутанта, выросших в LB или MSM [5].

В условиях перемешивания (условия, позволяющие повысить содержание кислорода в среде культивирования) агрегация клеток неподвижных мутантов по сравнению с Sp245 выражена в меньшей степени. Так, к 18 ч культивирования на среде MSM для штаммов Sp245, Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 показатель агрегации клеток составляет соответственно  $(36.8 \pm 7.9)$ ,  $(21.8 \pm 5.7)$ ,  $(5.8 \pm 0.6)$  и  $(8.2 \pm 1.4)\%$ . Агрегация 2-суточных культур в условиях перемешивания не изменяется. Например, к 48 ч культивирования на среде MSM у штаммов Sp245 и Sp245.1063 показатель агрегации клеток составляет соответственно  $(35.9 \pm 6.2)$  и  $(26.2 \pm 4.9)\%$ . Стоит отметить, что к 48 ч на LB в условиях перемешивания агрегация клеток штамма Sp245 достигает максимальной величины  $((69.2 \pm 1.9)\%)$ , а у мутанта Sp245.1063 – минимальной  $((4.7 \pm 1.6)\%)$  ниже.

Вполне вероятно, что подвижность и жгутики способствуют агрегации азоспирилл в зависимости от состава среды и содержания кислорода в среде культивирования (от степени насыщения среды кислородом). Так, даже в статичных условиях при фазово-контрастной микроскопии 18-часовых жидких культур Sp245 видно, что подвижные клетки этого штамма, сосредоточившиеся в результате аэротаксиса недалеко от границы раздела жидкость/воздух, образуют небольшие агрегаты (рис. 3). Клетки мутантов, лишенные полярной флагеллы, не обладают способностью к подобной быстрой агрегации.

Таким образом, способность бактерий к агрегации в планктонной культуре обуславливает начальные этапы формирования биопленок, но не способствует приросту биомассы зрелых пленок, что наиболее очевидно в случае мутантов с инактивированными генами *flhB*, *fabG1* или *mmsB1*. Результаты исследования позволили выявить у азоспирилл, различающихся по способности синтезировать жгутики, зависимость степени агрегации клеток в планктонной культуре и формирования ими биопленок от состава среды, продолжительности и условий культивирования, которые, в свою очередь, могут влиять на свойства компонентов клеточной поверхности микроорганизмов белковой и полисахаридной природы [5, 11, 12, 20]. Важным интегральным компонентом для процесса агрегации клеток некоторых микроорганизмов является эДНК. Например, обработка клеток бактерий рода *Rhodovulum* нуклеазами приводит к прекращению процесса их

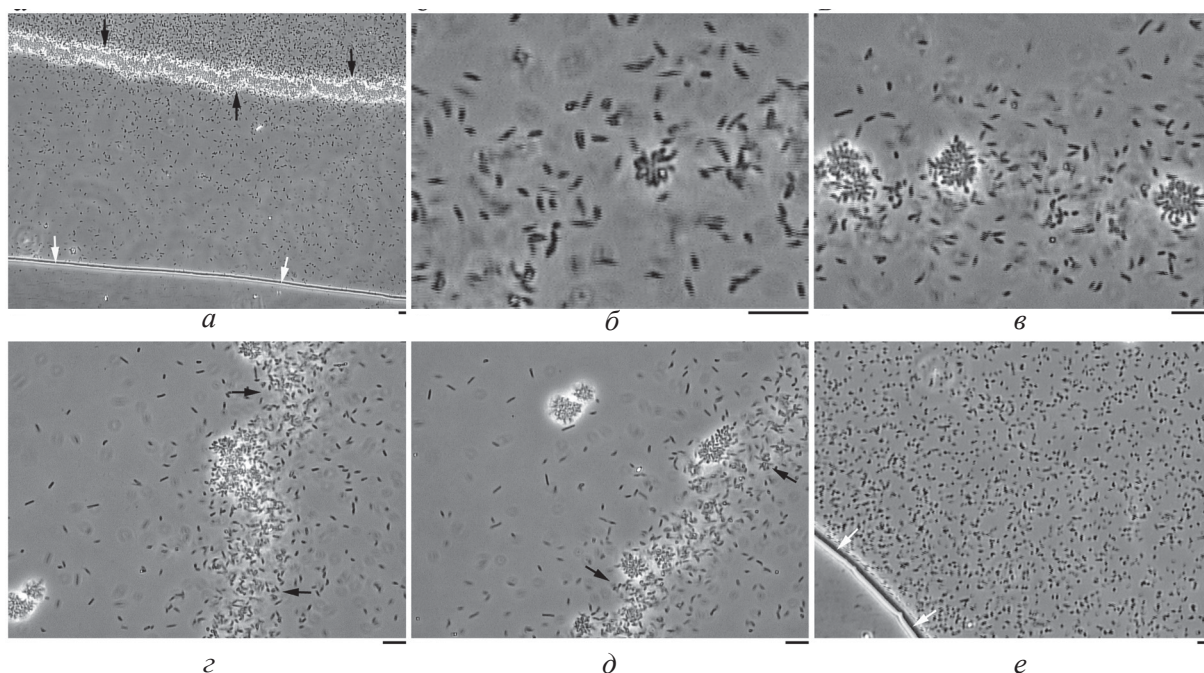


Рис. 3. Фазово-контрастная микроскопия 18-часовых жидких культур *A. brasilense* Sp245 (а–д) и Sp245.1063 (е), выращенных в LB, спустя 1 (б), 5 (в), 10 (г, д) и 15 мин (а, е) после приготовления препарата для микроскопии. Черными стрелками обозначена область максимального сосредоточения подвижных клеток недалеко от отмеченной белыми стрелками границы раздела жидкость/воздух. Масштабная линейка соответствует 10 мкм

самоосаждения [9]. Внеклеточные ДНК являются компонентами матрикса пленок *A. brasilense* [10], однако функция этих компонентов в биопленках азоспирилл остается неясной.

#### Исследование устойчивости биомассы биопленок к действию ДНКазы

Оценка содержания белковых, углеводсодержащих составляющих и нуклеиновых кислот в матриксе, полученном из смывы с поверхности стекла биомассы биопленок штамма Sp245, показала, что в ФБ-«экстрактах» перечисленные компоненты распределяются в следующем соотношении: 1.0/3.6/0.5 (матрикс из биопленок, сформированных под LB) или 1.0/4.1/0.1 (матрикс из биопленок, сформированных под MSM).

После инкубации с ДНКазой (100 мкг/мл) биомасса биопленок Sp245, сформированных под LB на стекле, убывала на 36% (см. рис. 2, б). Мутанты Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 теряли примерно такое же количество биомассы (32–40%). Аналогичная устойчивость к действию фермента выявлена и у биопленок, образованных под MSM (см. рис. 2, в). После обработки ДНКазой биомасса биопленок штамма Sp245 снижалась на 40%, а мутанты теряли примерно 29–33% биомассы (см. рис. 2, б).

По нашим неопубликованным данным, после инкубации с 40 мМ раствором периодата

натрия, окисляющего полисахариды, биомасса зрелых биопленок Sp245, сформированных на стекле под LB, убывает на 40%, а в случае лишенных жгутиков мутантов Sp245.1063, Sp245.1610 и SK039 эта величина составляет 60–75%. На стекле под MSM устойчивость биопленок всех штаммов к периодатному окислению возрастает, а биомасса биопленок снижается примерно на 20% (наши неопубликованные данные). После инкубации с проназой (100 мкг/мл) биомасса биопленок Sp245 или SK039, сформированных под LB на стекле, уменьшается на 20–30%, а в случае штамма Sp245.1610 на 46% [6]. Устойчивость образованных под MSM биопленок исследованных штаммов к действию протеазы была одинаковой. После обработки проназой биомасса биопленок уменьшалась примерно на 21–31% [6].

Таким образом, в исследованном нами матриксе биопленок бактерий вида *A. brasilense* содержание белковых и углеводсодержащих компонентов преобладает над содержанием нуклеиновых кислот, однако влияние инкубации с ДНКазой, снижающей биомассу биопленок всех исследованных штаммов, сопоставимо с воздействием на пленки азоспирилл протеазы и периодатного окислителя полисахаридов. Результаты этих сравнений позволяют полагать, что





эДНК является частью многокомпонентной системы, обеспечивающей как средство биопленок к поверхностям с разными физико-химическими свойствами, так и их структурную целостность.

### Список литературы

1. *Fibach-Paldi S., Burdman S., Okon Y.* Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promoting abilities of *Azospirillum brasilense* // FEMS Microbiol. Lett. 2012. Vol. 326, № 2. P. 99–108.
2. *Bogino P. C., Oliva M. M., Sorroche F. G., Giordano W.* The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // Intern. J. Mol. Sci. 2013. Vol. 14. P. 15838–15859.
3. *Шелудько А. В., Кулибякина О. В., Широков А. А., Петрова Л. П., Матора Л. Ю., Кацы Е. И.* Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлур, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2008. Т. 77, № 3. С. 358–363.
4. *Шелудько А. В., Филиппчева Ю. А., Шумилова Е. М., Хлебцов Б. Н., Буров А. М., Петрова Л. П., Кацы Е. И.* Изменения в формировании биопленок у *fhhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиология. 2015. Т. 84, № 2. С. 175–183.
5. *Шумилова Е. М., Шелудько А. В., Филиппчева Ю. А., Евстигнеева С. С., Пономарева Е. Г., Петрова Л. П., Кацы Е. И.* Изменение свойств клеточной поверхности и эффективности формирования биопленок у мутантов бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 по предполагаемым генам липидного метаболизма *tmsB1* и *fabG1* // Микробиология. 2016. Т. 85, № 2. С. 162–170.
6. *Телешева Е. М., Сиякин Д. Н., Шелудько А. В., Филиппчева Ю. А., Пономарева Е. Г., Петрова Л. П., Кацы Е. И.* Анализ влияния протеаз на структуру биопленок штамма *Azospirillum brasilense* Sp245 и его дефектных по жгутикованию *tmsB1* и *fabG1* мутантов // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2017. Т. 17, вып. 3. С. 322–327.
7. *Frolund B., Palmgren R., Keiding K., Nielsen P. H.* Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin // Water Res. 1996. Vol. 30. P. 1749–1758.
8. *Molin S., Tolker-Nielsen T.* Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure // Curr. Opin. Biotechnol. 2003. Vol. 14. P. 255–261.
9. *Watanabe M.* Growth and flocculation of a marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. Vol. 50. P. 682–691.
10. *Ramírez-Mata A., López-Lara L. I., Xiqui-Vázquez L., Jijón-Moreno S., Romero-Osorio A., Baca B. E.* The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense* // Res. in Microbiol. 2016. Vol. 167. P. 190–201.
11. *Madi L., Henis Y.* Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd : conditions and factors involved in cell-to cell adhesion // Plant Soil. 1989. Vol. 115, № 1. P. 89–98.
12. *Никитина В. Е., Пономарева Е. Г., Аленкина С. А., Коннова С. А.* Участие бактериальных лектинов клеточной поверхности в агрегации азоспирилл // Микробиология. 2001. Т. 70, № 4. С. 471–476.
13. *Ковтунов Е. А., Петрова Л. П., Шелудько А. В., Кацы Е. И.* Инсерция транспозона в хромосомную копию гена *fhhB* сопровождается дефектами в образовании полярного и латеральных жгутиков у бактерий *Azospirillum brasilense* Sp245 // Генетика. 2013. Т. 49, № 8. С. 1013–1016.
14. *Ковтунов Е. А., Шелудько А. В., Чернышова М. П., Петрова Л. П., Кацы Е. И.* Мутанты бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 со вставкой омегона в генах липидного метаболизма *tmsB* или *fabG* дефектны по подвижности и жгутикованию // Генетика. 2013. Т. 49, № 11. С. 1270–1275.
15. *Baldani V. L. D., Baldani J. I., Döbereiner J.* Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat // Can. J. Microbiol. 1983. Vol. 29, № 8. P. 924–929.
16. *Döbereiner J., Day J. M.* Associative symbiosis in tropical grass: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites // Symposium on Nitrogen Fixation / eds. W. E. Newton, C. J. Nijmans. Pullman : Washington State University Press, 1976. P. 518–538.
17. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* Molecular Cloning : a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
18. *Wang D., Xu A., Elmerich C., Ma L. Z.* Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions // ISME J. 2017. Vol. 11. P. 1602–1613.
19. *Croes C. L., Moens S., Bastelaere E. van, Vanderleyden J., Michiels K. W.* The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots // J. Gen. Microbiol. 1993. Vol. 139, № 9. P. 2261–2269.
20. *Dufrene Y. E., Rouxhet P. C.* Surface composition, surface properties and adhesiveness of *Azospirillum brasilense* – variation during growth // Can. J. Microbiol. 1996. Vol. 42. P. 548–556.

### On the Contribution of Cell Aggregation and Extracellular DNA to Biofilm Formation and Stabilization in *Azospirillum brasilense* Bacteria

**Yu. A. Filip'echeva, E. M. Telesheva, S. S. Yevstigneyeva, A. V. Shelud'ko, E. G. Ponomareva, L. P. Petrova, E. I. Katsy**

Yulia A. Filip'echeva, <https://orcid.org/0000-0003-3182-1007>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, ljuce@yandex.ru

Elizaveta M. Telesheva, <https://orcid.org/0000-0001-9405-1877>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, sentebrinka@mail.ru



Stella S. Yevstigneyeva, <https://orcid.org/0000-0001-6789-7324>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, [stels20295@yandex.ru](mailto:stels20295@yandex.ru)

Andrei V. Shelud'ko, <https://orcid.org/0000-0002-2535-5225>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, [shel71@yandex.ru](mailto:shel71@yandex.ru)

Elena G. Ponomareva, <https://orcid.org/0000-0003-3701-9090>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, [ponomareva\\_e@ibppm.ru](mailto:ponomareva_e@ibppm.ru)

Lilia P. Petrova, <https://orcid.org/0000-0002-1593-6157>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, [petrova\\_lp@mail.ru](mailto:petrova_lp@mail.ru)

Elena I. Katsy, <https://orcid.org/0000-0002-3299-3372>, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Ave. Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, [ei\\_katsy@mail.ru](mailto:ei_katsy@mail.ru)

Little is known about the functions of the principal matrix components and about the role of cell surface structures in the formation and stabilization of *Azospirillum* biofilms. It is known that as compared with *A. brasilense* strain Sp245, its *flhB1*, *fabG1*, and *mmsB1* mutants, defective in flagellar assembly, form biofilms less well. We made comparative study of bacterial aggregation, biofilm formation, and the effect of DNAase on biofilms. The results show that in planktonic culture, cell aggregation determines the initial stages in biofilm formation but does not contribute to biomass growth in mature films (observed most clearly with the mutants). Extracellular DNA is part of a multicomponent system that ensures the affinity of biofilms to physicochemically different surfaces and the structural integrity of biofilms.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, bacterial aggregation, biofilm matrix, extracellular DNA.

---

**Образец для цитирования:**

Филипъчева 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: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406>

**Cite this article as:**

Filip'echeva Yu. A., Telesheva E. M., Yevstigneyeva S. S., Shelud'ko A. V., Ponomareva E. G., Petrova L. P., Katsy E. I. On the Contribution of Cell Aggregation and Extracellular DNA to Biofilm Formation and Stabilization in *Azospirillum brasilense* Bacteria. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 4, pp. 399–406 (in Russian). DOI: <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2018-18-4-399-406>

---