

УДК 543.472.3

DOI 10.23648/UMBJ.2018.29.11366

ИНТЕНСИВНОСТЬ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК РИЗОБАКТЕРИАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

А.С. Хитрова, Н.И. Потатуркина-Нестерова,
Р.В. Иштутинов, И.Р. Бахтогаримов

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск, Россия

email: alekseeva_nastia88@mail.ru

В данной работе исследовалась способность почвенных ризобактерий, ассоциированных с культурными сельскохозяйственными растениями, образовывать биопленку in vitro.

*Цель работы – исследовать активность формирования биопленки корневой системы *Lycopersicon esculentum* Mill. ризобактериальными штаммами *Pseudomonas pseudoalcaligenes* в зависимости от фазы вегетации растения.*

Материалы и методы. В каждую фазу вегетации исследуемого растения были отобраны по 50 корневых смывов, в которых изучали видовой и количественный составы, определяли доминирующие штаммы ризобактерий. Далее производили моделирование образования биопленки ризобактериальными штаммами на чашках Петри с последующей их окраской кристаллическим фиолетовым и иммерсионной микроскопией. Исследование активности формирования биопленки производили статическим методом с использованием 96-луночных планшетов, в которых инкубировали ризобактерии, после чего полученные биопленки окрашивали генцианвиолетом. Результаты интерпретировали по интенсивности окрашивания спектрофотометрически.

*Результаты. В ходе работы было отмечено, что штаммы *P. pseudoalcaligenes*, отобранные в фазы всходов, бутонизации, цветения и плодоношения растения, обладали способностью к биопленкогенезу. Также наблюдалось изменение активности формирования биопленки ризобактериальными штаммами в процессе вегетации растения. Штаммы ризобактерий, отобранные в фазу всходов, отличались средней активностью формирования биопленки по сравнению со штаммами почвенных микроорганизмов, отобранных в фазы бутонизации, плодоношения и цветения.*

*Заключение. Полученные результаты исследования могут стать основой для разработки новых методов ростостимулирования растений, а также борьбы с фитопатогенами с помощью биопленкообразующих ризобактерий рода *Pseudomonas*.*

Ключевые слова: ризобактерии, биопленка.

Введение. В настоящее время установлена значительная роль ризобактерий в жизнедеятельности растений. Изучены разнообразные механизмы действия почвенных микроорганизмов, способствующих стимуляции роста растения, устойчивости к стрессовым факторам, повышению его продуктивности, а также сопротивлению фитопатогенным грибковым и бактериальным штаммам [1].

В последние годы произошла смена концепции планктонных форм микроорганизмов и сформирована общая теория о преобладании ассоциации микробных сообществ – биопленок [2, 3]. Установлено, что 90 % бак-

терий живет не в виде свободно существующих клеток – они прикреплены к субстрату. Согласно этой теории, бактерии, образуя биопленку, прикрепленную к биотическому или абиотическому субстрату, характеризуются биологическими свойствами, отличными от свойств клеток того же штамма, находящегося в планктонном состоянии [4, 5].

Существование бактерий внутри биопленок обеспечивает им ряд преимуществ по сравнению с изолированными формами [6, 7]. Микроорганизмы в биопленке устойчивы к стрессовым факторам окружающей среды, известна способность конкурентного выжи-

вания при взаимодействии с чужеродной флорой [8]. Свободно живущие микроорганизмы через свои продукты метаболизма вступают в конкурентные взаимодействия друг с другом. Бактерии биопленки обладают иными характеристиками клеточной поверхности, что является следствием вытеснения транзитной флоры антагонистической индигенной микрофлорой биопленки [9, 10].

Преимущества биопленки позволяют использовать их в различных сферах деятельности человека – промышленности, экологии, медицине. Известны единичные работы, свидетельствующие о способности почвенных микроорганизмов колонизировать корневую систему растений и образовывать биопленку [11], что имеет большое практическое значение, так как при этом происходит рост сопротивляемости растений к биотическим и абиотическим негативным факторам.

В опубликованных ранее работах мы изучали микробиоценоз ризосферы и ризопланы прикорневой зоны *Lycopersicon esculentum* Mill. [12]. В каждую фазу вегетации исследуемого растения было произведено по 50 корневых смывов, в которых определяли качественный состав микроорганизмов и их количественные показатели. Во всех фазах вегетации *Lycopersicon esculentum* Mill. доминирующим видом являлся *P. Pseudoalcaligenes*.

Цель исследования. Изучение активности формирования биопленки корневой системы *Lycopersicon esculentum* Mill. ризобактериальными штаммами *Pseudomonas pseudoalcaligenes* в зависимости от фазы вегетации растения.

Материалы и методы. Штаммы ризобактерий *P. pseudoalcaligenes* были отобраны из прикорневой зоны *Lycopersicon esculentum* Mill. в различные фазы вегетации: всходов, бутонизации, цветения и плодоношения.

Для определения способности ризобактериальных штаммов образовывать биопленку производили ее моделирование в жидкой питательной среде в чашках Петри диаметром 35 мм [13]. Полученную биопленку высушивали и окрашивали 0,4 % генцианвиоле-

том, микроскопировали иммерсионным методом при увеличении 100×16. Для получения снимков биопленки использовали микроскоп МИКМЕД-5.

Оценку активности формирования биопленки проводили при помощи статической методики с применением 96-луночных пластиковых планшетов [14, 15]. Суспензию бактерий вносили в лунки планшета, затем инкубировали в оптимальных условиях – при 37 °С в течение 24 ч. Затем удаляли содержимое лунок, промывали трехкратно фосфатным буфером, высушивали на воздухе, после чего окрашивали раствором кристаллвиолета. Экспозиция составила 10 мин. Краситель промывали фосфатным буфером, затем добавляли 96 % этиловый спирт. Об интенсивности биопленкообразования судили по степени окраски этилюата, которую измеряли спектрофотометрически (СФ-46 (ЛОМО)) OD_{630} . Для интерпретации результатов активности биопленкообразования использовали критерии, разработанные S. Stepanovic et al.: при значениях OD_{630} ниже 0,090 полагали, что штаммы не обладали способностью к образованию биопленки; при $0,090 < OD_{630} \leq 0,180$ штаммы обладали слабой способностью к биопленкообразованию; при $0,180 < OD_{630} \leq 0,360$ – средней; при $OD_{630} > 0,360$ – высокой способностью к образованию биопленки [16].

Полученные в ходе исследований численные материалы были обработаны статистически, достоверность различий сравниваемых показателей оценивалась по t-критерию Стьюдента. Статистическая обработка данных проводилась с помощью автоматизированных программ «Биостатистика» и Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и обсуждение. Результаты моделирования биопленки в чашках Петри показали, что 80 % ризобактериальных штаммов *P. pseudoalcaligenes*, отобранных в фазу всходов, способны к биопленкообразованию, в фазу бутонизации такую способность отмечали у 82 % штаммов, в фазы цветения и плодоношения данный показатель составил 84 и 86 % соответственно (рис. 1).

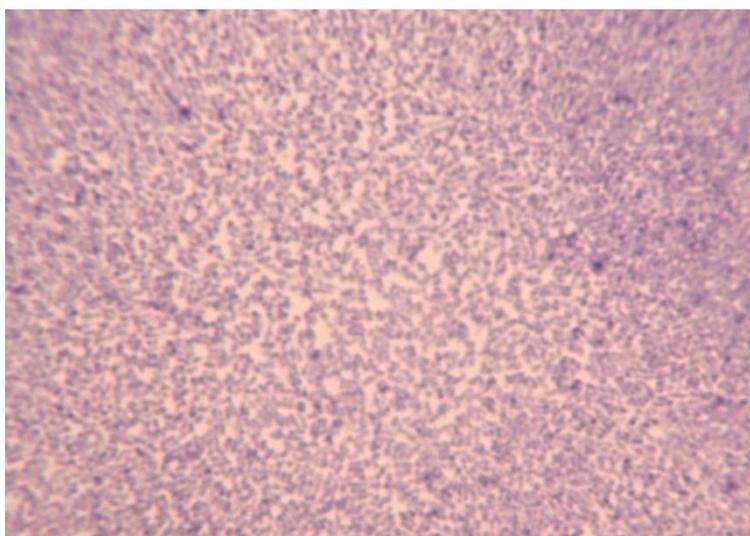


Рис. 1. Биопленка, образованная *P. pseudoalcaligenes*

Сравнительное исследование активности формирования биопленки *P. pseudoalcaligenes* показало, что ризобактериальные штаммы, отобранные в фазу всходов растения, обладали средней способностью к биопленкогенезу, их показатель OD_{630} составил $0,21 \pm 0,04$. Для ризобактерий, отобранных в фазу бутонизации, этот показатель увеличил-

ся до $0,39 \pm 0,06$ ($p < 0,05$), что говорит о высокой активности биопленкогенеза. В фазу плодоношения и цветения ризобактериальные штаммы также отличались высоким показателем активности формирования биопленки по сравнению с фазой всходов, их OD_{630} составил $0,37 \pm 0,05$ и $0,40 \pm 0,03$ соответственно (рис. 2).

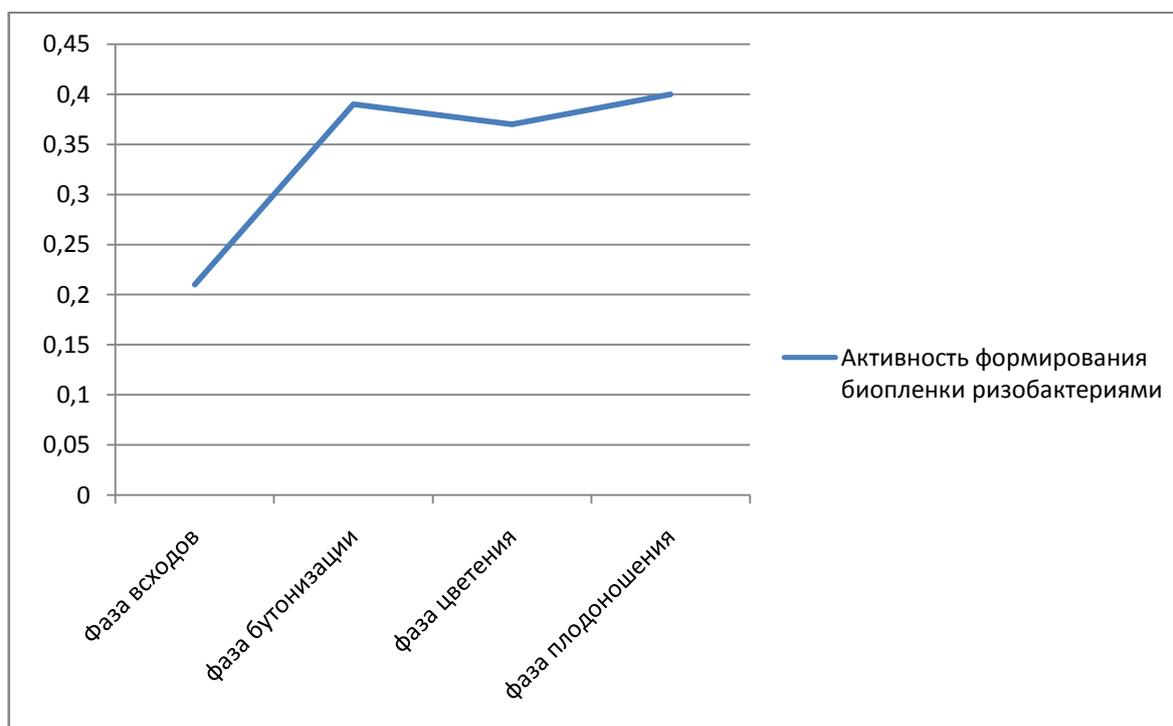


Рис. 2. Активность биопленкогенеза ризобактериальных штаммов *P. pseudoalcaligenes*, отобранных в различные фазы вегетации *Lycopersicon esculentum Mill.*

Заключение. Таким образом, результаты сравнительного исследования показывают, что микроорганизмы прикорневой зоны растений обладают способностью к биопленко-

образованию. Активность формирования биопленки увеличивается в ходе развития растения, достигая максимальных значений в фазу плодоношения ($0,40 \pm 0,03$).

Литература

1. Кравченко Л.В., Макарова Н.М., Азарова Т.С. Выделение и фенотипическая характеристика ростостимулирующих ризобактерий (PGPR), сочетающих высокую активность колонизации корней и ингибирования грибов. Микробиология. 2002; 71 (4): 521–525.
2. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции. Журнал инфектологии. 2010; 2 (3): 4–15.
3. Колчанова Н.Э., Окулич В.К., Шилин В.Е. Определение образования микробной биопленки бактериями периодонтального кармана и ее устойчивости к химическим и биологическим объектам. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015; 3: 56–61.
4. Fleming H.C., Windender J. The biofilm matrix. Nature Reviews Microbiology. 2010; 8: 623–633.
5. Хмель И.А. Quorum-sensing регуляция экспрессии генов: фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий. Микробиология. 2006; 75 (4): 457–464.
6. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? Педиатрия. 2011; 5 (11): 86–89.
7. Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Appl. Envir. Microbiology. 2008; 74 (2): 470–476.
8. Щепитова Н.Е. Биопленкообразование энтерококками кишечной микрофлоры животных. Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2015; 1 (51): 77–79.
9. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод. Вода: химия и экология. 2008; 2: 11–13.
10. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology. 2000; 54: 49–79.
11. Егоренкова И.В., Трезубова К.В., Игнатов В.В. Экологическое значение формирования биопленок на корнях ассоциативными бактериями *Paenibacillus polymyxa*. Адаптационные стратегии живых систем: материалы междисциплинарной научной конференции. 11–16 июня 2012. Крым; 2012: 284.
12. Алексеева А.С., Потатуркина-Нестерова Н.И. Сравнительная характеристика микробиоценоза ризосферы и ризопланы *Lycopersicon esculentum* Mill. Современные проблемы науки и образования. 2014; 6.
13. Чеботарь И.В. Биопленки *Staphylococcus aureus*: структурно-функциональные характеристики и взаимоотношения с нейтрофилами: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2015.
14. Терещенко В.С. Способ выявления биопленкообразующей способности у грамотрицательных бактерий. Биологические науки и фундаментальная медицина. 2015; 5: 917–919.
15. Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012; 1: 17–22.
16. Магданова Л.А., Голясная Н.В. Исследование видового разнообразия, мутационной и биопленкообразующей активностей представителей микробного биоценоза плавательного бассейна. Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов: материалы Всероссийского симпозиума с международным участием. М.; 2009: 119.

INTENSITY OF BIOFILM FORMATION BY RHIZOBACTERIAL STRAINS *PSEUDOMONAS PSEUDOALCALIGENES*

A.S. Khitrova, N.I. Potaturkina-Nesterova, R.V. Ishutinov, I.R. Bakhtogarimov

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia

e-mail: alekseeva_nastia88@mail.ru

This paper examines the ability of soil rhizobacteria associated with cultivated agricultural plants to form biofilms in vitro.

*The objective of this study is to examine the activity of biofilm formation of *Lycopersicon esculentum* Mill. root system by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* rhizobacterial strains depending on the phase of plant vegetation.*

Materials and Methods. During each phase of the examined plant vegetation 50 root washout samples were selected. They were analyzed for species and quantitative composition; dominant strains of rhizobacteria were determined. Further modeling of biofilm formation by rhizobacterial strains on Petri dishes was carried out. The strains were stained with crystal violet and immersion oils. The biofilm formation activity was examined by a static method using 96-well plates in which the rhizobacteria were incubated. Then, the biofilms obtained were stained with gentian violet. The results were interpreted spectrofluorimetrically according to the staining intensity.

Results. It was found out that strains of *P. Pseudoalcaligenes*, chosen during germination, budding, flowering and fruiting periods, had the ability to form biofilm. There was also a change in the activity of the biofilm formation due to rhizobacterial strain administration during vegetative period. Rhizobacteria strains chosen during the germination period were characterized by an average biofilm formation activity, in comparison with strains of soil microorganisms chosen in budding, fruiting and flowering periods.

Conclusion. The obtained results can become a basis for the development of new methods of plant growth stimulation. They can also help to control phytopathogens with the help of biofilm forming rhizobacteria of the genus *Pseudomonas*.

Keywords: rhizobacteria, biofilm.

References

1. Kravchenko L.V., Makarova N.M., Azarova T.S. Vydelenie i fenotipicheskaya kharakteristika rostostimuliruyushchikh rizobakteriy (PGPR), sochetayushchikh vysokuyu aktivnost' kolonizatsii korney i ingibirovaniya gribov [Isolation and phenotypic characteristics of growth-stimulating rhizobacteria (PGPR), combining high activity of root colonization and fungi inhibition]. *Mikrobiologiya*. 2002; 71 (4): 521–525 (in Russian).
2. Gostev V.V., Sidorenko S.V. Bakterial'nye bioplenki i infektsii [Bacterial biofilms and infections]. *Zhurnal infektologii*. 2010; 2 (3): 4–15 (in Russian).
3. Kolchanova N.E., Okulich V.K., Shilin V.E. Opredelenie obrazovaniya mikrobnoy bioplenki bakteriyami periodontal'nogo karmana i ee ustoychivosti k khimicheskim i biologicheskim ob'ektam [Determination of the biofilm formation by periodontal pocket bacteria and the resistance of microbial communities to chemical and biological objects]. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2015; 3: 56–61 (in Russian).
4. Fleming H.C., Windender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 2010; 8: 623–633.
5. Khmel' I.A. Quorum-sensing regulyatsiya ekspressii genov: fundamental'nye i prikladnye aspekty, rol' v kommunikatsii bakteriy [Quorum-sensing regulation of gene expression: Fundamental and applied aspects and the role in bacterial communication]. *Mikrobiologiya*. 2006; 75 (4): 457–464 (in Russian).
6. Mal'tsev S.V., Mansurova G.Sh. Chto takoe bioplenka [What is a biofilm]? *Pediatrics*. 2011; 5 (11): 86–89 (in Russian).
7. Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Envir. Microbiology*. 2008; 74 (2): 470–476.
8. Shchepitova N.E. Bioplenkoobrazovanie enterokokkami kischechnoy mikroflory zhivotnykh [Formation of biofilms by enterococci of intestinal microflora in animals]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2015; 1 (51): 77–79 (in Russian).

9. Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Mikrobnye bioplenki: perspektivy ispol'zovaniya pri oчитstke stochnykh vod [Microbial biofilms: potential use in wastewater treatment]. *Voda: khimiya i ekologiya*. 2008; 2: 11–13 (in Russian).
10. O'Toogle G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. 2000; 54: 49–79.
11. Egorenkova I.V., Tregubova K.V., Ignatov V.V. Ekologicheskoe znachenie formirovaniya bioplenok na kornyakh assotsiativnymi bakteriyami *Paenibacillus polymyxa* [Ecological significance of biofilm formation on the roots by associative bacteria *Paenibacillus polymyxa*]. *Adaptatsionnye strategii zhivyykh sistem: materialy mezhdistsiplinarnoy nauchnoy konferentsii* [Adaptive strategies of living systems: proceedings of an interdisciplinary scientific conference]. June 11–16, 2012. Krym; 2012: 284 (in Russian).
12. Alekseeva A.S., Potaturkina-Nesterova N.I. Sravnitel'naya kharakteristika mikrobiotsenoza rizosfery i rizoplany *Lycopersicon esculentum* Mill [Comparative characteristics of rhizosphere and rhizoplane *Lycopersicon esculentum* Mill. microbiocenosis]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2014; 6 (in Russian).
13. Chebotar' I.V. *Bioplenki Staphylococcus aureus: strukturno-funktsional'nye kharakteristiki i vzaimootnosheniya s neytrofilami* [Biofilms *Staphylococcus aureus*: structural and functional characteristics and relations with neutrophils]: avtoref. dis. ... kand. med. nauk. Moscow, 2015 (in Russian).
14. Tereshchenko V.S. Sposob vyyavleniya bioplenkoobrazuyushchey sposobnosti u gramotritsatel'nykh bakteriy [A method for detecting biofilm-forming ability in Gram-negative bacteria]. *Biologicheskaya nauka i fundamental'naya meditsina*. 2015; 5: 917–919 (in Russian).
15. Lyamin A.V., Botkin E.A., Zhestkov A.V. Metody vyyavleniya bioplenok v meditsine: vozmozhnosti i perspektivy [Methods for biofilm detecting in medicine: opportunities and perspectives]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012; 1: 17–22 (in Russian).
16. Magdanova, L.A., Golyasnaya N.V. Issledovanie vidovogo raznoobraziya, mutatsionnoy i bioplenkoobrazuyushchey aktivnostey predstaviteley mikrobnogo biotsenoza plavatel'nogo basseyna [Research of species diversity, mutational and biofilm-forming activities of the microbial biocenosis in the swimming pool]. *Sovremennye problemy fiziologii, ekologii i biotekhnologii mikroorganizmov: materialy Vserossiyskogo simpoziuma s mezhdunarodnym uchastiem* [Modern problems of microorganism physiology, ecology and biotechnology: proceedings of the All-Russian Symposium with international participation]. Moscow; 2009: 119 (in Russian).