



УДК 579.262

## АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ ПРОТЕАЗ НА СТРУКТУРУ БИОПЛЕНОК ШТАММА *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* Sp245 И ЕГО ДЕФЕКТНЫХ ПО ЖГУТИКОВАНИЮ *mmsB1* И *fabG1* МУТАНТОВ



Е. М. Телешева, Д. Н. Синякин, А. В. Шелудько, Ю. А. Филиппичева,  
Е. Г. Пономарева, Л. П. Петрова, Е. И. Кацы

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

Синякин Дмитрий Николаевич, магистрант кафедры генетики, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского. E-mail: diman.sinyakin@yandex.ru

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

Филиппичева Юлия Анатольевна, научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (Саратов), кандидат биологических наук. E-mail: ljuche@yandex.ru

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

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

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

Имеется мало данных о 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 *mmsB1* и *fabG1* мутанты хуже формируют биопленки на гидрофобной поверхности (полистирол), а на гидрофильной (стекло) – только *mmsB* мутант. В данной работе показано, что отличные от жгутиков белковые компоненты поверхности азоспирилл, чувствительные к действию проназы и трипсина, необходимы для прочного соединения бактерий в биопленках на стекле и полистироле и вносят вклад в прикрепление биопленок к полистиролу под богатой жидкой средой. Возможно, такими белковыми компонентами являются гемагглютинины азоспирилл.

**Ключевые слова:** *Azospirillum brasilense*, биопленки, белки матрикса.

DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-322-327

Бактерии рода *Azospirillum* распространены в разнообразных местообитаниях и вступают в ассоциативное взаимодействие с широким кругом растений [1], при котором не происходит образования каких-либо специализированных структур, наподобие клубеньков, характерных для бобово-ризобиального симбиоза [2]. Положительное влияние азоспирилл на рост и развитие растений обусловлено их способностью к фиксации атмосферного азота, продукции фитогормонов, контролю фитопатогенов и др. Определенное значение в успешном функционировании растительно-микробной ассоциации может иметь формирование биопленок азоспирилл на поверхности корней растений [3–5].

Бактериальные биопленки – это пространственно и метаболически структурированные сообщества заключенных в матрикс микроорганизмов [5, 6]. Внеклеточный матрикс биопленок содержит биополимеры разной химической природы (полисахариды, белки, нуклеиновые кислоты, липиды и пр.), обеспечивающие адгезию к поверхности, структурную и функциональную целостность биопленок [7]. Поверхностные структуры бактериальных клеток, также интегрированные в матрикс, поддерживают и стабилизируют его архитектуру [6, 7]. Так, дефекты в синтезе липополисахаридов (ЛПС) и экстраклеточных полисахаридов, связывающих краситель калькофлуор, оказывают заметное влияние на эффективность формирования биопленок у соответствующих мутантов азоспирилл [8].

Получены немногочисленные данные о роли разнообразных компонентов клеточной поверхности белковой природы в формировании и стабилизации биопленок азоспирилл. Так, например, инактивация у бактерии *A. brasilense* Sp245 плазмидных генов, кодирующих гипотетические TAD пили, приводит к подавлению образования биопленок [9]. Сохранение полярного жгутика (Fla) на клетках *A. brasilense* Sp245, интегрированных в зрелую биопленку, способствует поддержанию ее целостности и повышает ее устойчивость в условиях гидродинамического сдвига [10]. Биопленки Fla<sup>-</sup> мутантов содержат меньшее



количество биомассы и менее стабильны по сравнению с биопленками родительского штамма Sp245 [10, 11]. Однако биопленки мутантов, лишенных жгутиков, являются удобной моделью для изучения роли других структур белковой природы, участвующих в организации матрикса биопленок. В данном аспекте интересны 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 [12]. Инактивация предполагаемых генов липидного обмена *fabG1* или *mmsB1* также повлияла на некоторые характеристики клеточной поверхности азоспирилл, включающие изменения в относительном содержании ряда жирных кислот в препаратах ЛПС, относительной гидрофобности и динамике агрегации планктонных клеток [11].

Целью данной работы явилось исследование роли в стабилизации биомассы биопленок азоспирилл отличных от жгутиков белковых структур, чувствительных к протеиназной обработке.

#### Материалы и методы исследований

**Бактериальные штаммы.** В работе использовали штамм *A. brasilense* Sp245, выделенный из корней пшеницы [13], и его инсерционные Km<sup>R</sup> Fla<sup>-</sup> Laf<sup>-</sup> Sp245.1610 (*fabG1::Omegon-Km*) и Fla<sup>-</sup> SK039 (*mmsB1::Omegon-Km*) мутанты [12].

**Среды для культивирования бактерий.** Культивирование бактерий проводили на минимальной малатно-солевой среде (MSM) [14] или богатой среде LB [15] при 28°C. Канамицин (Km) до 50 мкг/мл вносили в среды при необходимости.

**Оценка биомассы биопленок.** Жидкие 18-часовые бактериальные культуры разводили средой LB или MSM до оптической плотности суспензий при длине волны 590 нм ( $A_{590}$ ), равной 0.05–0.10, и вносили в стеклянные пробирки (по 2 мл), ячейки полистирольных планшетов (по 200 мкл) с 96 плоскородными лунками или в чашки Петри из полистирола, на дне которых находились стерильные покровные стекла размером 24 × 24 мм, и инкубировали при 28°C в стационарных условиях. Перед окрашиванием биопленок отбирали планктонные бактерии. Биопленки окрашивали 1%-ным водным раствором красителя кристаллического фиолетового при комнатной температуре 10 мин и осторожно промывали водой. Связавшийся с биомассой биопленок краситель растворяли в этаноле и измеряли  $A_{590}$  [10]. Пленки, сформированные на покровных стеклах, использовали для микроскопии.

**Обработка биопленок протеазами.** Проназу или трипсин растворяли в 100 мМ Tris-HCl буфере (pH 7.5) до концентрации 1000 мкг/мл. Проназу инкубировали 2 ч при 37°C. Ферменты разводили в 50 мМ фосфатном буфере (ФБ; pH 7.0) в соотношении 1:9, добавляли к биопленкам, предварительно удалив планктонную культуру (по 2 мл в стеклянные пробирки и по 200 мкл в лунки полистирольных планшетов) и инкубировали 2 ч при 37°C. В контрольных вариантах использовали ФБ (pH 7.0) без ферментов.

После инкубации биопленки однократно отмывали дистиллированной водой и окрашивали 1%-ным раствором кристаллического фиолетового при комнатной температуре, затем дважды промывали дистиллированной водой. Краситель, связавшийся с биомассой биопленок, растворяли в этаноле и измеряли оптическую плотность раствора ( $A_{590}$ ). Результаты выражали в процентах относительно соответствующих контрольных проб.

**Определение гемагглютинирующей активности суспензий из биопленок, смытых с поверхности стекла.** Из пробирок после 6 суток культивирования удаляли планктонные бактерии и промывали биопленки 50 мМ фосфатно-солевым буфером (ФСБ; pH 7.0), затем их смывали аспирацией и суспендировали в 50 мМ ФСБ (pH 7.0). Суспензии клеток ( $A_{590} = 0.5$ ) вносили по 50 мкл в ячейки иммунохимических планшетов с 96 лунками по 50 мкл. Готовили серию двукратных разведений в ФСБ. К полученным разведениям добавляли по 50 мкл 2%-ной суспензии в ФСБ трипсинизированных или нативных кроличьих эритроцитов; через 18 ч инкубации при 4°C определяли титр гемагглютинации.

**Световая микроскопия биопленок.** Фазово-контрастную микроскопию покровных стекол, перевернутых биопленкой вниз и помещенных на предметное стекло с лункой, 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 биопленок 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 Microsoft Office Excel 2007. Доверительные интервалы определяли для 95% уровня значимости.



## Результаты и их обсуждение

### Исследование динамики формирования биопленок

Как нами показано ранее, процесс формирования биопленок мутантов *A. brasilense* Sp245.1610 и SK039 на поверхности раздела жидкой и твердой фаз включает последовательно адсорбцию и адгезию клеток (2–3 суток), за которыми следует прирост и стабилизация биомассы пленки (с 5–6 суток), как и в случае родительского штамма Sp245 [10]. Прикрепление бактерий к поверхности протекает независимо от их способности синтезировать флагеллы. Лишь в случае мутанта SK039 увеличивается продолжительность их адгезии на стекле до 4 суток. Количество биомассы в биопленках мутантов начинает отличаться от показателей штамма Sp245 к 6-м суткам культивирования (зрелые биопленки) (рис. 1 *а, б*). На стекле под LB биомасса биопленок Sp245.1610 не отличается от показателей Sp245 (см. рис. 1, *а*). Однако на гидрофобной поверхности клетки этого штамма, как и клетки штамма SK039, образуют более тонкие пленки (рис. 1*б*). Под MSM мутанты Sp245.1610 и SK039 также формируют менее выраженные биопленки, чем Sp245 (см. рис. 1, *а, б*). Результаты определения относительного количества биомассы в биопленках азоспирилл с помощью окрашивания и результаты прямых микроскопических измерений толщины биопленок согласуются между собой [10].

Толщина/биомасса пленок азоспирилл изменяется в ответ на изменение физико-химических параметров среды, окружающей биопленку. Так, через 2 часа после замены культуральной жидкости с планктонной культурой, окружающей 6-суточные биопленки, на 50 мМ ФБ (рН 7.0) часть клеток, образующих пленку, переходит в буфер. Это либо свободные особи, либо бактерии в составе агрегатов. Биомасса биопленок всех штаммов в основном снижается на 40–50% (см. рис. 1, *в, г*). Диссоциация биопленок, сформированных под MSM на полистироле, превышает 50%. На стекле аналогичное снижение биомассы происходит у биопленок мутанта Sp245.1610, сформированных под LB (рис. 1, *в, г*). Стоит отметить, что после 6 суток культивирования рН сред LB или MSM, окружающих биопленку, возрастает до величины  $(8.3 \pm 0.1)$  или  $(9.3 \pm 0.1)$  соответственно. При использовании вместо ФБ (рН 7.0) культуральной жидкости после удаления 6-суточных планктонных клеток не происходит диссоциации биопленок. Так, после такой инкубации с LB (рН 8.3) спустя 2.5 ч в биопленках штаммов Sp245, Sp245.1610, и SK039 сохраня-

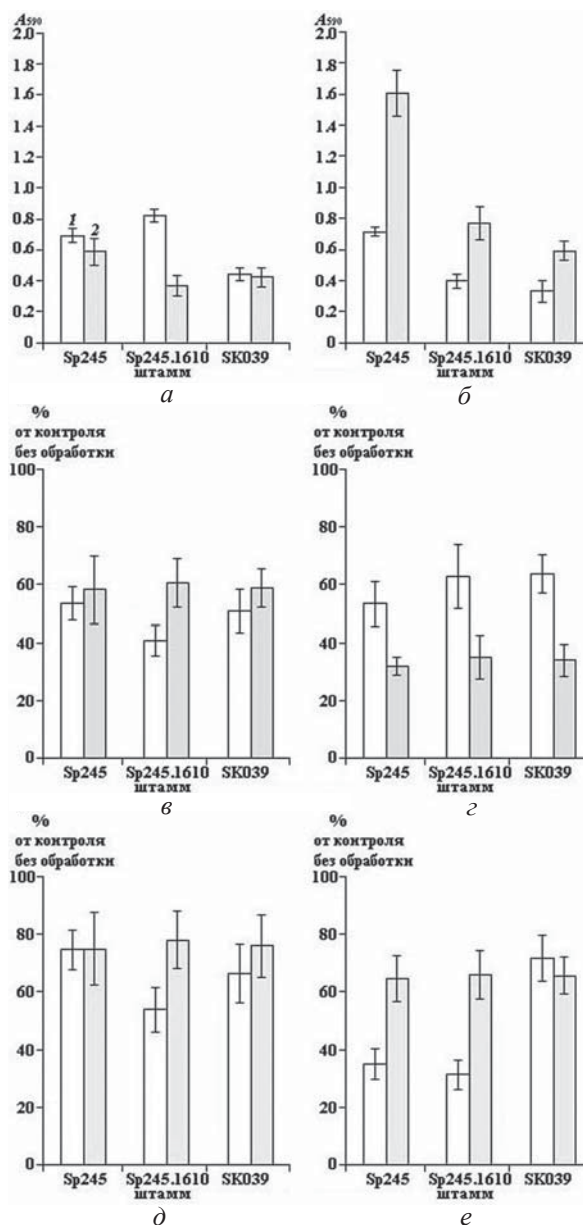


Рис. 1. Влияние фосфатного буфера (ФБ; рН 7.0) (*в, г*) и проназы (*д, е*) на биомассу 6-суточных биопленок (*а, б*) *A. brasilense*, сформированных на стекле (*а, в, д*) и полистироле (*б, г, е*) под жидкой питательной средой LB (1) или MSM (2).  $A_{590}$  – оптическая плотность кристаллического фиолетового, десорбированного после окрашивания биопленок (*а, б*); % – процентное отношение оптической плотности красителя, десорбированного с окрашенных пленок после их инкубации в ФБ (рН 7.0) (*в, г*) или растворе проназы (100 мкг/мл) (*д, е*) к аналогичному показателю без обработки

ются соответственно  $(93.3 \pm 6.6)$ ,  $(95.8 \pm 14.8)$  и  $(88.0 \pm 12.2)$ % биомассы.

Вполне вероятно, что прикрепление некоторого количества бактерий (клетка/клетка/поверхность) в биопленках обуславливают взаи-



модействия, чувствительные к изменению таких условий, как pH и/или, вероятно, ионная сила (состав сред LB/MSM [14, 15] свидетельствует об отличии данного показателя от такового у 50 мМ ФБ (pH 7.0)). Завершающей стадией формирования и развития биопленок является их диссоциация [5–7]. Распад биопленок возможен и в ответ на изменения окружающей среды [5–7]. Таким образом, наличие определенной доли особей, непрочно зафиксированных в биопленках, позволяет азоспириллам быстро покидать пленку в момент ее диссоциации. Необходимо отметить, что способность к диссоциации в одинаковой степени выражена как у подвижных клеток родительского штамма, так и у неподвижных мутантов (см. рис. 1 в, з).

*Исследование значения для стабилизации биомассы биопленок структур, чувствительных к протеиназной обработке*

После инкубации с проназой биомасса биопленок Sp245 или SK039, сформированных под LB на стекле, убывала на 20–30% и на 46% в случае штамма Sp245.1610 (см. рис. 1, д). В случае биопленок Sp245, Sp245.1610 и SK039 на полистироле уменьшение составило 65, 69 и 28%, соответственно штамму (см. рис. 1, е).

Устойчивость образованных под MSM биопленок всех исследованных штаммов к действию протеазы одинакова как на стекле, так и на полистироле (см. рис. 1, д, е). После обработки проназой (100 мкг/мл) биомасса биопленок снижалась на стекле примерно на 21–31%, а на

полистироле – на 25–35%. Исключение из MSM источника связанного азота не влияет на чувствительность биопленок на стекле к действию проназы; однако на полистироле биомасса биопленок Sp245 и Sp245.1610 снижалась в большей степени – до показателей  $(27.4 \pm 5.5)\%$  и  $(45.3 \pm 8.8)\%$  от контрольных значений.

После инкубации с протеазой нарушается единство клеток, образующих биопленку как на стекле (рис. 2, а1, в1), так и на полистироле. Часть бактерий из биопленок становятся либо свободными, либо находятся в составе агрегатов. Формированию контактов между клетками наряду с другими структурами способствуют продуцируемые азоспириллами гемагглютинины [16, 17]. Суспензии клеток Sp245, Sp245.1610 и SK039 из биопленок под LB/MSM, смытых с поверхности стекла, вызывают агглютинацию трипсинизированных эритроцитов с титром реакции (1:16)/(1:16), (1:4)/(1:4) и (1:1)/(1:4) соответственно. Различия в титре гемагглютинации могут быть обусловлены разной степенью связывания гемагглютининов с поверхностью бактериальной клетки и особенностями комплексов, образуемых гемагглютинами с другими молекулами, напрямую не участвующими в реакции, но влияющими на активность агглютининов. У штамма Sp245 выделенный с бактериальной поверхности агглютинин обладает сродством к О-полисахариду ЛПС этого штамма [17]. Биопленки мутантов Sp245.1610 и SK039 отличаются более высоким содержанием

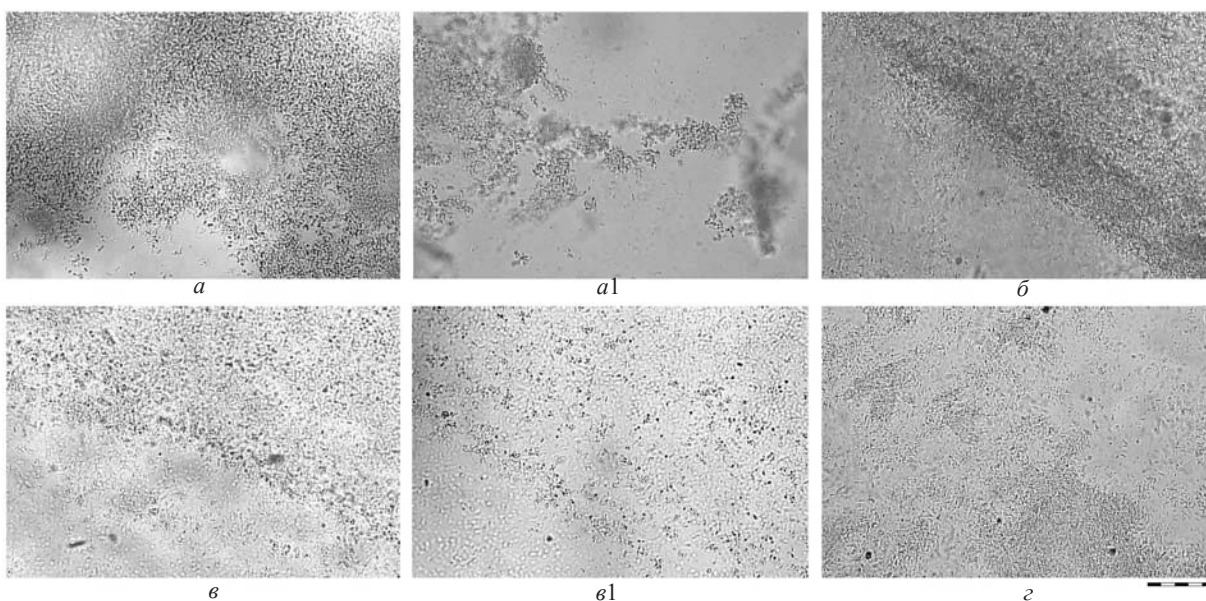


Рис. 2. Световая микроскопия 6-суточных биопленок *A. brasilense* Sp245 (а, б), Sp245.1610 (в) и SK039 (з), выращенных на стекле под жидкой MSM (а, в) или LB (б, д), до (а–д) и после (а1, в1) инкубации с проназой (100 мкг/мл). Масштабная линейка соответствует 50 мкм



ЛПС [11], что, вероятно, сказывается на титре гемагглютинирующей активности их клеток. Обработанные трипсином клетки штамма Sp245 утрачивают способность агглютинировать трипсинизированные эритроциты [17]. Биопленки Sp245, Sp245.1610 и SK039, сформированные на стекле под LB, после обработки трипсином в концентрации 100 мкг/мл, как и в случае проназы, сохраняли лишь  $(78.6 \pm 7.4)\%$ ,  $(71.0 \pm 13.3)\%$  и  $(76.0 \pm 8.3)\%$  биомассы. По-видимому, снижение биомассы пленок является следствием разрушения протеазами, среди прочих, и поверхностных биополимеров, обуславливающих гемагглютинацию и участвующих в образовании межклеточных контактов.

Таким образом, использование в работе мутантов *A. brasilense*, лишенных жгутиков, позволило оценить роль биополимеров белковой природы, соединяющих и удерживающих бактерии в биопленке и обеспечивающих ее стабильность и прикрепление к поверхности. К таким биополимерам могут относиться структуры, обуславливающие гемагглютинирующую активность клеток, которая у мутантов в отличие от родительского штамма Sp245 выражена в меньшей степени. В биопленках прикрепление азоспирилл (клетка/клетка/поверхность) независимо от их подвижности и способности синтезировать жгутики также обуславливают взаимодействия, чувствительные к изменению физико-химических параметров среды, окружающей пленки. Это наиболее заметно в случае биопленок, сформированных на гидрофобной поверхности под минимальной малатно-солевой средой.

Необходимо отметить, что иммунофлуоресцентная микроскопия с антителами на белковые антигены клеточной поверхности показывает наличие экспонированных белковых детерминант «планктонных клеток» у азоспирилл, сформировавших биопленки на корнях проростков пшеницы [4]. Сходные антигены присутствуют в биопленках этих бактерий, сформированных на модельной поверхности полистирола [8]. Иммуноферментный анализ и параллельный подсчет колониеобразующих единиц позволили выявить возрастание относительного содержания белковых антигенов при адаптации азоспирилл к существованию на корнях растений [4]. Таким образом, белковые структуры, стабилизирующие биопленки на абиотических поверхностях, могут выполнять сходную функцию и в случае биопленок азоспирилл, сформированных ими в корневой системе растения.

## 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. *Pedrosa F. O.* Physiology, biochemistry and genetics of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen-fixing bacteria // Crit. Rev. Plant Sci. 1988. Vol. 6, № 4. P. 345–384.
3. *Петрова Л. П., Шелудько А. В., Кацы Е. И.* Плазмидные перестройки и изменения в формировании биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2010. Т. 79, № 1. С. 129–132.
4. *Шелудько А. В., Широков А. А., Соколова М. К., Соколов О. И., Петрова Л. П., Матора Л. Ю., Кацы Е. И.* Колонизация корней пшеницы бактериями *Azospirillum brasilense* с различной подвижностью // Микробиология. 2010. Т. 79, № 5. С. 696–704.
5. *Ramey B. E., Koutsoudis M., Bodman S. B. von, Fuqua C.* Biofilm formation in plant–microbe associations // Curr. Opin. Microbiol. 2004. Vol. 7, № 6. P. 602–609.
6. *López D., Vlamakis H., Kolter R.* Biofilms // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010. Vol. 2, № 7. P. a000398.
7. *Flemming H.-C., Wingender J.* The biofilm matrix // Nature Rev. Microbiology. Vol. 8. P. 623–633.
8. *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 калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2008. Т. 77, № 3. С. 358–363.
9. *Wisniewski-Dyé F., Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alexandre G., Sukharnikov L. O., Wuichet K., Hurst G. B., McDonald W. H., Robertson J. S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Condemine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A. H., Gonzalez V., Mavingui P., Zhulin I. B.* *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments // PLoS Genetics. 2011. Vol. 7, № 12. P. e1002430.
10. *Шелудько А. В., Филипьева Ю. А., Шумилова Е. М., Хлебцов Б. Н., Буров А. М., Л. П. Петрова Л. П., Кацы Е. И.* Изменения в формировании биопленок у *flhB1* мутанта бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245, лишённого жгутиков // Микробиология. 2015. Т. 84, № 2. С. 175–183.
11. *Шумилова Е. М., Шелудько А. В., Филипьева 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* // Микробиология. 2016. Т. 85, № 2. С. 162–170.
12. *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 *mmsB* или *fabG* дефектны по подвижности и жгутикованию // Генетика. 2013. Т. 49, № 11. С. 1270–1275.



13. 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.
14. 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.
15. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning : a Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
16. Никитина В. Е., Пономарева Е. Г., Аленькина С. А., Коннова С. А. Участие бактериальных лектинов клеточной поверхности в агрегации азоспирилл // Микробиология. 2001. Т. 70, № 4. С. 471–476.
17. Шелудько А. В., Пономарева Е. Г., Варшаломидзе О. Э., Ветчинкина Е. П., Кацы Е. И., Никитина В. Е. Гемагглютинирующая активность и подвижность бактерий *Azospirillum brasilense* в присутствии разных источников азота // Микробиология. 2009. Т. 78, № 6. С. 749–756.

**Analysis of Protease Effect on Biofilm Structure of *Azospirillum Brasilense* Strain Sp245 and Its Flagellation-Defective *mmsB1* and *fabG1* Mutants**

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

Elizaveta M. Telesheva, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, sentebrinka@mail.ru

Dmitry N. Sinyakin, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, diman.sinyakin@yandex.ru

Andrey V. Shelud'ko, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, shel71@yandex.ru

Yuliya A. Filip'echeva, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, ljuche@yandex.ru

Elena G. Ponomareva, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, ponomareva\_e@ibppm.ru

Liliya P. Petrova, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, petrova\_lp@mail.ru

Elena I. Katsy, Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Russian Academy of Sciences, 13, Prospekt Entuziastov, Saratov, 410049, Russia, ei\_katsy@mail.ru

*Azospirillum* bacteria are engaged in associative interactions with a wide range of plants. In this type of interaction, there formed no specialized structures like nodules, which are characteristic of the legume-*Rhizobium* symbiosis. The formation of biofilms by *Azospirillum* on the plant root surface can be important for the successful functioning of plant-microbe associations. Scarce data exist on the role of cell surface protein structures in the formation and stabilization of *Azospirillum* biofilms. It is known that as compared to *A. brasilense* Sp245, its flagellation-defective *mmsB1* and *fabG1* mutants form biofilms on a hydrophobic surface (polystyrene) worse and only mutant *mmsB* forms thinner biofilms on a hydrophilic surface (glass). The aim of this work was to examine the role of protease-sensitive nonflagellar protein structures in the stabilization of biomass of *Azospirillum* biofilms. The presence of contacts between cells and the thickness/biomass of biofilms before and after protease treatment were determined by direct microscopic examination and by crystal violet staining of biofilms. The quantitative measure of biofilm biomass thickness was the  $A_{590}$  of a solution of desorbed dye. The hemagglutinating activity of suspension of biofilms washed off the glass surface was determined by using trypsinized rabbit erythrocytes. In this study, it was shown that the protein components of the *Azospirillum* cell surface which are different from flagella and are sensitive to pronase and trypsin are necessary for strong connection of bacteria in biofilms on glass and polystyrene. These proteins contribute to the attachment of biofilms to polystyrene under a rich liquid medium and probably are hemagglutinins of *Azospirillum*. Our previous data show that the protein structures that stabilize biofilms on abiotic surfaces can function similarly with biofilms formed by azospirilla on the roots of plants.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, biofilms, matrix proteins.

**Образец для цитирования:**

Телешева Е. М., Синякин Д. Н., Шелудько А. В., Филиппьева 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. Сарат. 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.

**Cite this article as:**

Telesheva E. M., Sinyakin D. N., Shelud'ko A. V., Filip'echeva Yu. A., Ponomareva E. G., Petrova L. P., Katsy E. I. Analysis of Protease Effect on Biofilm Structure of *Azospirillum Brasilense* Strain Sp245 and Its Flagellation-Defective *mmsB1* and *fabG1* Mutants. *Izv. Saratov Univ. (N.S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2017, vol. 17, iss. 3, pp. 322–327 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2017-17-3-322-327.