

## Влияние на азотните източници върху развитието на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* K-12

Иво Ганчев

Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, София

Email: ivotg@abv.bg

### Резюме

*Bacillus subtilis* е грам-положителна бактерия, която се отличава със способността да се диференцира до метаболитно неактивни спори, които са силно устойчиви към неблагоприятните фактори на околната среда. Канибализмът е механизъм за забавяне на спорообразуването при щамове *Bacillus subtilis*. В естествените местообитания щамове *Bacillus subtilis* встъпват в конкурентни взаимоотношения с други микробни видове при недостиг на хранителни вещества в средата. Сведенията за взаимодействието им с други микробни щамове от състава на ризосферния слой на почвата при наличие на различни азотни източници вследствие на органичното натоварване остават оскъдни в литературата. Лизираните клетки отделят хранителни вещества, които служат като хранителен източник, като забавят образуването на спори. Субпопулацията на клетки, в която са експресирани гените за канибалните протеини, проявява склонност към синтеза на извънклетъчен матрикс като част от структурата на биофилмите. Това проучване демонстрира антагонистичната активност на щамове *B. subtilis* 170 и 168 спрямо *E. coli* K-12 в процеса на формиране на смесени биофилми. Образуваните биофилми чрез съвместно култивиране на щамове *B. subtilis* и *E. coli* K-12 бяха онагледени и анализирани с помощта на конфокална сканираща лазерна микроскопия. Тяхното формиране представлява сложен процес, който включва секреция на сърфактин, липопептиден антиминобен агент или супланцин или се явява резултат от протичането на механизма на канибализма. В настоящето изследване е установена антагонистична активност на щамове *B. subtilis* при съвместното им култивиране с щам *E. coli* K-12 при наличие на различни азотни източници в растежните среди като индуктори за образуването на канибалните протеини. Лизирането на клетките на щам *E. coli* K-12 се наблюдава при наличие на пептон, триптон и соев казеинов хидролизат в средата за култивиране на биофилмите. Тези азотни източници не индуцират формирането на спори от щамове *B. subtilis* 170 и 168 в структурата на смесените биофилми. Резултатите от проучването водят до заключението, че щамове *B. subtilis* оказват антагонистичен ефект спрямо *E. coli* при съвместното им развитие до биофилми, което служи като механизъм за преживяване на неблагоприятните условия на околната среда.

**Ключови думи:** смесени биофилми, *B. subtilis*, *E. coli* K-12, канибализъм, антагонизъм, конкуренция, спорообразуване

# Protein content enhances biofilm development in *Bacillus Subtilis* and *Escherichia coli* K-12 strains

Ivo Ganchev

The “Stephan Angeloff” Institute of Microbiology, BAS, Sofia

Email:ivotg@abv.bg

## Abstract

Ganchev, I. (2020). Protein content enhances biofilm development in *Bacillus Subtilis* and *Escherichia coli* K-12 strains, *Bulgarian Journal of Soil Science Agrochemistry and Ecology*, 54(3), 89-102.

*Bacillus subtilis* is a Gram-positive bacterium that is well known for its ability to differentiate into metabolically inactive spores that are highly resistant to environmental stresses. Cannibalism is a mechanism to delay sporulation in *Bacillus subtilis*. In the nature, *B. subtilis* cells have to compete with other organisms present in the microflora under nutritional limitation. It is interesting to raise the question regarding the behavior of *B. subtilis* cells in mixed cultures in medium that content different nitrogen sources. The lysed cells release nutrients that serve to feed the community, effectively delaying spore formation. The subpopulation of cells that differentiates into cannibals is the same subpopulation that produces the extracellular matrix that holds cells together in biofilms. Using this strain model, this study demonstrated the antagonistic activity of *B. subtilis* 170 and 168 strains against *E. coli* K-12. The formed biofilms by co-cultivation of *B. subtilis* and *E. coli* K-12 strains were analyzed by using of confocal scanning laser microscopy. It is known that formation of biofilms by *B. subtilis* is a complex process that includes secretion of surfactin, a lipopeptide antimicrobial agent or suplancin or the mechanism of cannibalism. However in addition to the competition among the cells of *B. subtilis*, these cells also compete with other organisms for the limited nutrients. In this work, we report the cannibalistic behavior of *B. subtilis* in presence of *Escherichia coli* in medium that content peptone, caseine, tryptone and soy casein hydrolyzate. We demonstrate that *B. subtilis* 170 and 168 strains lyses cells of *E. coli* K-12 1655 in the presence of peptone, tryptone and soy casein hydrolyzate and does not induce spore formation. Our experiments also suggest that *B. subtilis* prefers predation of *E. coli* to cannibalism in mixed cultures. This may offer *B. subtilis* a niche to survive in an environment with limited nutrients and under competition from other microorganisms.

**Key words:** multispecies biofilm, *B. subtilis*, *E. coli* K-12, cannibalism, antagonism, competition, spore formation

Почвата представлява хетерогенна среда, отличаваща се с флукуация в стойностите на факторите, които повлияват на растежа и развитието на микробните видове в нея (Paul, 1989). Съдържанието на соли се движи в диапазона от 0,8% до 2,0%, а най-висок дял от въглеродните съединения се пада на хуминовите киселини, което стимулира растежа на бактериите до биофилми в почвения слой, особено в ризосферата (van Elsas J D & van Overbeek L S, 1993). Ризодепозицията, благодарение на чието протичане се стимулира развитието на микробните съобщества до биофилми по корените на растенията, се изразява в освобождаването на ексудати, съдържащи аминокиселини, монозахариди и органични киселини, ензими, восъци, етилен и въглероден диоксид (Whipps, 1990). Способността на ризобактериите да се имплантират под формата на биофилми по растенията се дължи на наличието на липополизахариди и други протеини по външната повърхност на клетката и на свойството им да секретират екзоцелуларни полизахариди (Dutkiewicz et al., 2016).

Микробиотата на ризосферния слой и образуваните от тях биофилми са съставени от отличаващи се по своите морфологични, генетични и метаболитни характеристики видове, включени в синтезираните от тях екзополимери като част от тяхната структура. *Bacillus subtilis* представлява грам-положителен бактериален вид, който е разпространен в ризосферния слой на почвата и се развива под формата на биофилми по повърхностния слой на корените на растенията (Cazorla et al., 2007) и със способността си да продуцира съединения с антимикробен ефект като сърфактин и повърхностноактивни агенти обезпечава устойчивостта им срещу развитите на редица патогенни видове (Chen et al., 2012; Chen et al., 2013; Garcia-Gutierrez et al., 2013; Zerrouh et al., 2013), сред които се открояват щамове на видовете *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, на родовете *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Candida sp.*, *Erwina sp.* и *Xanthomonas sp.* (Morikawa, 2006).

Образуването на протените на канибализма обезпечава нарастването на числеността на клетъчната популация на щамове *B. subtilis*, способни към диференциация до образуване на биофилми, и намаляването на броя на спорите в тях (Lin et al., 2001). Skf токсините на канибализма оказват микробоцидно действие спрямо бактериалните щамове *Xanthomonas oryzae* (Nandy et al., 2007) и *E. coli* (Gonzalez-Pastor et al., 2007), както и всички бактериални видове, с които съжителстват в смесената популация (Lopez et al., 2009; Nandy et al., 2007; Claverys & Havarstein, 2007). Стимулиращият ефект на токсините на канибализма върху процеса на образуване на смесени биофилми с участието на щамове *B. subtilis* се изразява в индиректната индукция на гените за биосинтезата на матрикса, осъществявана от основния регулатор Spo0A с помощта на регулаторните протеини AbrB (Branda et al., 2001) и SinI/SinR (Chu et al., 2006). Устойчивите на токсините клетки се отличават с високо вътреклетъчно равнище на Spo0A, което способства за формиране на комплекса SinI/SinR и активиране на epsA-O оперона, отговорен за синтезирането на полизахаридите от състава на матрикса (Branda et al., 2001), и uqxM-sipW-tasA, кодиращ биосинтезата на протеина TasA (Branda et al., 2006). Наличието на сърфактин в средата за култивиране създава предпоставки образуването на протеините на канибализма и повишаване на равнището на транскрипция на гените за образуване на екзоцелуларния матрикс на биофилмите, формиращи се с участието на щамове *B. subtilis* (Lopez et al., 2009; Lopez & Kolter, 2010). Ролята му се изразява в активиране на съсредоточената в мембраната хистиндин киназа KinC, което води до фосфорилане на основния регулатор Spo0A (Lopez et al., 2009). Повишаването на активността му се осъществява при наличие на други белтъци с антибиотичен ефект като нистатин, валиномицин, грамицин, които се секретират от актиномицетни щамове *Streptomyces ssp.*, населяващи почвата. Тяхното влияние води до стимулиране на образуването на секретията на протеините на канибализма от щамове *B. subtilis*, и развитието им до

формирани на биофилми (Lopez et al., 2009; Nandy et al., 2007).

Въпреки това сведенията за техните особености остават оскъдни в съвременната литература, което да послужи като отправна точка при оценка на ролята им в ризосферния слой на почвата. Целта на проучването по тази причина се свежда до изследване на взаимоотношенията между щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* в процесите на образуване на смесени биофилми и микроскопските им характеристики при култивирането им в среди, отличаващи се по съдържанието на азотните източници.

## Материали и методи

Използваните в настоящето изследване бактериални щамове са систематизирани в таблица 1.

Растежът на биофилма се провежда в различни растежни среди (обикновен бульон, соево-казеинов бульон, триптон бульон и пептонна вода). За целите на задачата предварително са подготвени 18-часови култури от щамове *B. subtilis* 170, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 в среда обикновен бульон (Лаборатория „БулБио“ – гр. София). 50 µl от течните култури се засяват в 5 cm<sup>3</sup> течна среда обикновен бульон, соево-казеинов бульон, триптон бульон и пептонна вода (Лаборатория „БулБио“ – гр. София).

За всеки фактор експериментът се реализира в пет епруветки, като в първата се засяват само 50 µl от течната култура на щам *B. subtilis* 170, на втората - *B. subtilis* 168, третата - *E. coli* K-12 1655, в четвъртата епруветка се засяват по 50 µl от течната култура на щам *B. subtilis* 170 и 50 µl от течната култура на щам *E. coli* K-12 1655, в петата се засяват по 50 µl от течната култура на щам *B. subtilis* 168 и 50 µl от течната култура на щам *E. coli* K-12 1655. Свежите култури се разпределят в 96-ямкови плаки. Всяка свежа култура се разпределя в 12 ямки, като във всяка ямка се поставят по 150 µl от течната свежа култура. В крайните незасяти ямки се накапва по 150 µl дестилирана вода. Култивирането на биофилмите на плаките се извършва при температура от 20° C и продължителност от 24

h. След това от всяка ямка се отделя планктонът и се промива трикратно с физиологичен разтвор (0,85% NaCl), накарват се по 150 µl физиологичен разтвор в половината от ямките и с помощта на предварително обгорен и охладен в стерилен физиологичен разтвор нож се отлепя биофилмът от тях, като за всеки вариант на опита се събира суспензията от 6 ямки в една епендорфка.

Правят се серийни разреждания по метода на Кох и се отчита общата численост на колонииите след посевка върху Месопептонен агар (Лаборатория „БулБио“ – гр. София) и инкубация при 37° C за 24 h, както и броят на колонииите на щам *E. coli* K-12 1655 след посевка върху среда MacConseeu агар (Лаборатория „БулБио“ – гр. София) и инкубация при 37° C за 24 h. По разликата между броя на колонииите, прорастнали върху среда Месопептонен агар (Лаборатория „БулБио“ – гр. София) и MacConseeu агар (Лаборатория „БулБио“ – гр. София), се съди за числеността на колонииобразуващите единици на щамове *B. subtilis* в изследваните биофилми.

Във втората половина от ямките се извършва оцветяване посредством накапване на 150 µl 0,1% разтвор на кристал виолет за време от 15 min., след което внимателно се отделя багрилото от всяка ямка, промива се излишъкът от оцветител с 0,85% разтвор на NaCl и се солубилизира със 70% етанол, който се накапва по 150 µl във всяка изследвана ямка. Оптичната плътност на биофилмите се измерва при дължина на вълната от 540 nm на “ELLIZA Reader 90” (“ЕЛТА 90 М” – гр. София).

За наблюдаване на биофилмите от щамове на вида *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* беше използвана конфокална лазерно сканираща микроскопия Leica TCS SPE при дължина на вълната от 540 nm. Оцветяването на биофилмите се извърши с флуорисцентно багрило Live Bacterial Gram Stain Kit (Biotum) според инструкцията на фирмата производител. Обработката на данните от микроскопските наблюдения бяха определени по изчислителна методика, описана от Heydorn et al., (2000).

Всички експерименти бяха извършени

трикратно, като представените резултати представляват средноаритметична стойност от три независими едно от друго определения. Използван беше критерият на Стюдант, като различията в отделните стойности бяха приети за статистически значими при стойност на параметъра  $p < 0,05$ .

## Резултати и дискусия

Белтъците от състава на средата за култивиране представляват важен хранителен източник за развитието на бактериалните видове. Относително оскъдни са сведенията за метаболизма на азотсъдържащите органични съединения върху конкурентните взаимоотношения между микробните видове от структурата на биофилмите.

Най-голям относителен прираст в биомасата на биофилмите от  $0,655 \pm 0,004$  за двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* 1655 и  $0,654 \pm 0,003$  при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* 1655 се постига при култивирането им в среда, съдържаща в качеството на азотен източник соево-казеинов хидролизат (фиг. 1). При това оптичната плътност от 540 nm при култивирането на биофилми от смесените микробни популации в среда от соево-казеинов хидролизат не се отличават значително от стойността им при щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 ( $p > 0,05$ ) и значително привишават получения резултат при щам *E. coli* K-12 1655 ( $p < 0,05$ ).

Сходни различия се наблюдават между оптичната плътност при 540 nm при смесените и моновидовите биофилми на щамове *B. subtilis* 170, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при култивирането им в среда, съдържаща като азотен източник казеин и пептон. Присъствието на пептон не води до статически значими разлики в оптичната плътност при 540 nm при самостоятелното култивиране на щам *E. coli* K-12 1655 и съвместното му развитие с щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168. Замяната с триптон води до достигане на оптичната плътност при 540 nm за биофилмите от  $0,414 \pm 0,53$  при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и  $0,276 \pm 0,72$  при двойката щамове

*B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, което се доближава до стойностите на моновидовите биофилми на щамове *B. subtilis* 170, *B. subtilis* 168 ( $p > 0,05$ ) и значително привишават получения резултат при щам *E. coli* K-12 1655 ( $p < 0,05$ ). Култивирането в пептонна вода очертава по-различна тенденция, изразяваща се в постигането на по-голям прираст на биомасата на биофилмите от смесени микробни съобщества при проведеното проучване в сравнение с триптона и обикновения бульон, но стойността им е значително по-ниска спрямо култивиране в соево-казеинов бульон ( $p < 0,05$ ).

Наличието на триптон, дрожден екстракт и обикновен бульон в средата за култивиране се отразява неблагоприятно върху процеса на формиране на биофилми от щамове, като стойностите им се колебаят в тесен интервал ( $p > 0,05$ ). Изведените зависимости са в съгласие с резултатите от проучванията на Abdel-Mawgoud et al., (2008) по влиянието на вида на азотния източник върху биосинтезата на сърфактина като сигнална молекула и Zeriouh et al., (2013) по ролята му в процеса на формиране на биофилми. Сърфактинът играе важна роля като сигнална молекула при развитието на щам *B. subtilis* NCIB3610 до образуване на биофилми (Lopez et al., 2009). Мутациите в *degQ* гена, отговорен за биосинтезата на сърфактин, водят до снижаване на способността към образуване на биофилми при щам *Bacillus subtilis* NCD-2 (Wang et al., 2015). Щам *B. subtilis* 168 загубва своята подвижност при култивирането на в богати на азотни източници среди вследствие на точкови мутации в *swrA* гена (Ghelardi et al., 2012). Наличието на мутации обяснява пониската стойност на оптичната плътност при 540 nm за биофилмите от двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при проведеното проучване. С помощта на биоинформационен анализ е установено, че генният участък, отговорен за биосинтезата на субтиломецина при щам *B. subtilis* MMA7, представлява част от *skf* оперона за Skf протеина (Phelan et al., 2013), който се среща при щам *B. subtilis* 168 (Gonzalez-Pastor et al., 2003). Чувствителността им към съединенията с антибиотичен ефект

е обусловена от равнището на експресия на  $\sigma$ -факторите (Huang et al., 1998), които кодират транспортните белтъци, чието функциониране е свързано с разход на АТФ (Huang et al., 1999). Измененията на активността на регулираните от тези фактори гени при щамове *B. subtilis* за металотиол трансферазата и инициацията на биосинтезата на мастни киселини обуславя проникваемостта на цитоплазмената мембрана и устойчивостта им към антимикробните агенти от състава на средата (Cao et al., 2001). В настоящето изследване се установява намаляване на биомасата на биофилмите от щам *B. subtilis* 168 при асоциацията му с щам *E. coli* K-12 1655 в сравнение с моновидовите биофилми при проведеното проучване.

Образуването на сърфактин обезпечава фосфорилирането на основния регулаторен белтък Spo0A, което протича с участието на киназата KinC, и положително се регулира експресията на гените, отговорни за биосинтезата на матрикса на биофилмите (Lopez et al., 2009). Стойността на оптичната плътност при 540 nm след оцветяване с кристал виолет при биофилмите на щамове *B. subtilis* 170 и при асоциацията им с щам *E. coli* K-12 1655 е по-висока в сравнение с моновидовите биофилми, образувани от щам *E. coli* K-12 1655. Средата, съдържаща в качество на азотен източник соев-казеинов хидролизат, оказва най-силно индуциращ ефект върху образуването на биофилми в резултат на съвместното развитие на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 в сравнение с други източници, което се свързва с различното им отражение върху биосинтезата на съпланцина и протените на канибализма и фосфорилираната форма на основния регулаторен белтък Spo0A за образуване на биофилми, развитието на клетъчна подвижност и появата на спори (Gonzalez-Pastor et al., 2003).

Съдържанието на соев-казеинов хидролизат, пептон и триптон обезпечава антагонистичната активност на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 при взаимодействието им с щам *E. coli* K-12 1655 по време на образуването на биофилми. Статичното култивиране на

биофилмите в среда на основата на соево-казеинов бульон води до численост на колонии-те от  $133,86 \pm 0,46 \times 10^6$  cfu/cm<sup>3</sup> при щам *B. subtilis* 170 и  $85,06 \pm 0,46 \times 10^6$  cfu/cm<sup>3</sup> при щам *B. subtilis* 168, като стойността им се променя до равнище съответно от  $128,53 \pm 0,92 \times 10^6$  cfu/cm<sup>3</sup> и  $111,93 \pm 0,46 \times 10^6$  cfu/cm<sup>3</sup> в процеса на съвместното им култивиране с щам *E. coli* K-12 1655. Наличието на соев хидролизат не води до образуването на колонии на щам *E. coli* K-12 1655 както при моновидовите, така и при смесените биофилми при проведеното проучване. В проучването на Ji et al., (2015) наличието на соев-казеинов хидролизат създава условия за образуване на субланцин от щам *B. subtilis* 168 в концентрация от  $58,40 \pm 5,33$  mg/ml, която се понижава незначително при замяната му с пептон ( $50,11 \pm 4,56$  mg/ml), като според други изследвания тази концентрация осигурява антимикробния спектър на щамове *B. subtilis* спрямо щамове *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. lwoffii* и *X. campestris* (Nandy et al., 2007). Числеността на колонии на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 не се отличава статистически значимо в структурата на моновидовите биофилмите и биофилмите, образувани в резултат на съвместното им култивиране с щам *E. coli* K-12 1655 ( $p > 0,05$ ) (таблица 2 и 3).

Присъствието на казеин в средата създава условия за развитието на конкурентни взаимоотношения между изследваните щамове в структурата на биофилмите, при което доминантни се явяват щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 при достигната численост на популациите съответно от  $137,33 \pm 0,57 \times 10^6$  cfu/cm<sup>3</sup> и  $87,9 \pm 0,98 \times 10^6$  cfu/cm<sup>3</sup> в структурата на биофилмите при асоциацията им с щам *E. coli* K-12 1655, което значително превишава числеността им при моновидовите биофилми ( $p < 0,05$ ) (таблица 2 и 3). Казеинът стимулира антимикробния ефект на щам *B. subtilis* B38 спрямо щамове *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* Mc 4100 LBCB, *Escherichia coli* DH5a LBCB, който е значително по-слабо изразен при асоциацията му с щамове *Bacillus thuringiensis* B15 LILM, *Bacillus licheniformis* LMT, *Bacillus mycoides* LMT, *Staphylococcus*

*aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* LM и *Staphylococcus epidermis* LM (Tabbene et al., 2009). В настоящето проучване не се установяват статистически значими различия в числеността на колонииите на щам *E. coli* K-12 1655 в процеса на неговото самостоятелно култивиране и взаимодействието му с щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 до образуване на биофилми ( $p > 0,05$ ), което свидетелства за по-слабо изразения му ефект върху образуването на антиминобни съединения от щамове *B. subtilis*. Замяната с пептон обуславя по-различен характер на образуването на биофилми, изразяващ се в постигането на по-висока численост на колонииите на щам *E. coli* K-12 1655 при самостоятелното му развитие, която силно се снижава при асоциацията му с щамове *B. subtilis* ( $p < 0,05$ ) при проведеното изследване.

Наличието на триптон и соево-казеинов хидролизат в средата за култивиране инхибира процеса на образуване на спори в структурата на биофилмите, образувани при взаимодействието на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655. Числеността на спорите в биофилмите на щам *B. subtilis* 170 е  $4,96 \pm 0,15 \times 10^3$  cfu/cm<sup>3</sup> при наличие на пептон като азотен източник и се изменя до стойност от  $(7,03 \pm 0,17) \times 10^3$  cfu/cm<sup>3</sup> при замяната му със соев хидролизат. Асоциацията им с щам *E. coli* K-12 1655 не води до появата на спори в структурата на биофилмите. Присъствието на казеин и пептон като азотни източници в средата за култивиране при проведеното проучване причинява появата на спори в структурата на биофилмите, образувани от съвместното развитие на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655. При това не се установяват статистически значими разлики в тяхната численост, която е значително по-малка от броя им в моновидовите биофилми, където общият брой на колонииите съставлява  $(6,8 \pm 0,10) \times 10^3$  cfu/cm<sup>3</sup> при щам *B. subtilis* 170 и  $(7,13 \pm 0,15) \times 10^3$  cfu/cm<sup>3</sup> при *B. subtilis* 168 в присъствието на казеин, докато замяната му с пептон води до значително по-малък брой спори от  $(2,5 \pm 0,17) \times 10^3$  cfu/cm<sup>3</sup> за щам *B. subtilis*

170 и  $(3,36 \pm 0,20) \times 10^3$  cfu/cm<sup>3</sup> за щам *B. subtilis* 168. Стойностите им са близки до броя на спорите в биофилмите от смесени микробни съобщества при замяната с пептон ( $p > 0,05$ ) и са значително по-ниски спрямо моновидовите биофилми, образувани от щамове *B. subtilis* 170 ( $p < 0,05$ ) и *B. subtilis* 168 ( $p < 0,05$ ) при същите условия на култивиране (таблица 4).

В регулацията на процеса на образуване на спори от щамове на вида *B. subtilis* по време на развитието им до биофилми по различни повърхности взема участие регулаторният протеин Spo0A (Gonzalez-Pastor et al., 2003). Gonzalez-Pastor et al., (2003) са установили, че Spo0A се включва в процесите на регулация на активността на гените *skf*, отговорен за биосинтезата на специфичния инхибиращ процеса на образуване на спори фактор, и *sdp*, чийто краен продукт се явява спорулиращ протеин (Molle et al., 2003). Клетките на щам *B. subtilis* се отличават със свойството да образуват Skf фактора в началния стадий на спорообразуването, чийто ефект е сходен с механизма на действие на антибиотиците и се изразява в оказване на микробицидно въздействие върху неспорообразуващите клетки (Gonzalez-Pastor et al., 2003). Според други проучвания Skf факторът причинява лизиране на клетките на видовете на рода *Xanthomonas*, с които съжителстват с щамове *B. subtilis* при развитието им в ризосферния слой на ориза (Lin et al., 2001). Инхибиращият спорообразувателния процес протеин Sdp функционира кооркдинирано с белтъка Skf, вследствие на което се достига до програмирана клетъчна смърт при клетките, отличаващи се с ниско равнище на експресията на регулатора Spo0A, докато Sdp инхибира образуването на спори от клетките с високо равнище на Spo0A (Gonzalez-Pastor et al., 2003). Нарастването на съдържанието на хранителни вещества от лизирането на част от клетъчната популация по време на образуването на биофилми в присъствието на различни азотни източници в средата за култивиране обезпечава диференциацията на клетките до образуване на матрикс и възпрепятства появата на спори, което протича с разход на клетъчна

енергия, и обяснява отсъствието им или пониската численост на спорите в структурата на смесените биофилми спрямо биофилмите на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 в настоящето изследване.

Отделните среди, отличаващи се по вида на съдържащия се в тях азотен източник, имат различно отражение върху морфологичните характеристики на биофилмите, образувани в резултат на съвместното развитие на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655. Най-голяма стойност в средната дебелина на образуваните структури се постига при статичното им култивиране в среда, съдържаща соев екстракт като азотен източник. Величината им съставлява  $14,35 \pm 0,40 \mu\text{m}$  при съвместното развитие на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 до образуване на биофилми при постигната стойност в коефициента на неравност от  $0,02 \pm 0,012$ . Стойността му значително се понижава при наличие на триптон в средата за култивиране, докато образуваните структури се отличават с неравна повърхност, като коефициентът на неравност нараства до размер от  $0,12 \pm 0,04$ . Средната дебелина се колебае в тесен интервал от  $11,53 \pm 0,19 \mu\text{m}$  до  $12,42 \pm 0,40 \mu\text{m}$  в присъствието на казеин и пептон като азотни източници, но като цяло величината ѝ е по-ниска в сравнение на култивирането на биофилмите на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 в среда, съдържаща соев хидролизат. Наличието на соев хидролизат определя образуването на структури със средна дебелина от  $12,27 \pm 0,54 \mu\text{m}$  вследствие на съвместното култивиране на двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при коефициент на неравност от  $0,03 \pm 0,02$ , която представлява 85,5% от стойността ѝ при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655. Сходна закономерност се установява и при величината оптичната плътност на образуваните структури върху повърхността на полистеренови плаки при 540 nm. Замяната с казеин и пептон създава условия за формирането на биофилми, чиято средна дебелина не се отличава статистически помежду им ( $p > 0,05$ ), докато коефициентът

на неравност на повърхността ѝ се движи в диапазона от  $0,07 \pm 0,02$  до  $0,08 \pm 0,01$ . Стойността му е по-голяма при наличие на триптон като азотен източник в средата за култивиране на биофилмите на двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, при което размерът на средната дебелина съставлява  $8,68 \pm 0,38 \mu\text{m}$  и представлява 82,12% спрямо величината ѝ при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655.

Най-силно изразено е влиянието на соевия хидролизат върху процеса на формиране на биофилми вследствие на съвместното развитие на двойките щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, свидетелство за което е постигната най-ниска стойност на отношението на относителната площ на разпространение към обема, която съставлява съответно  $0,068 \pm 0,001 \mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$  и  $0,081 \pm 0,004 \mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ , като нараства значително при замяната с триптон като азотен източник ( $p < 0,05$ ). Величината му се установява в тесни граници при наличие на казеин и пептон, но като цяло стойността му намалява при замяната със соев хидролизат (таблица 5; фиг. 2 и 3).

Получените данни са в съгласие с изводите от предходни проучвания, според които образуването на матрикса на биофилмите с участието на щамове *B. subtilis* се осъществява по несигнален механизъм (Gonzalez-Pastor et al., 2011; Gonzalez-Pastor et al., 2003). Ниското вътреклетъчно равнище на фосфорилираната форма на  $\text{Spo0A} \sim \text{P}$ , което настъпва в богата на хранителни източници среда, индуцира експресията на два оперона на канибализма, които кодират биосинтезата и секрецията на два пептида с токсично действие – SKF, който се уявява убиващ спорите фактор, и SDP, чието образуване се съпровожда с инхибиране на процеса на формиране на спори в структурата на биофилмите (Gonzalez-Pastor et al., 2011) и активиране на биосинтезата на основните структурни компоненти, изграждащи матрикса на биофилмите (Shank et al., 2011). Клетките, в които протича експресията на оперона за канибализма, се отличават с устойчивост на въздействието на двата токсични пептида



**Таблица 1.** Бактериални щамове, използвани в проучването

Щам	Описание	Източник
<i>Bacillus subtilis</i> 170	Щам 170	ИМ-БАН <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Щам 168, trpC2	ИМ-БАН <sup>a</sup>
<i>Escherichia coli</i> W1655	Щам К-12, F lac <sup>+</sup> str <sup>s</sup> met <sup>-</sup>	NBIMСС <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Национална банка по промишлени микроорганизми и тъканни култури, София

<sup>b</sup> Секция „Микробна биохимия“, Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, БАН, София (Vasileva-Tonkova et al., 2011; Sotirova et al., 2012; Sotirova et al., 2008)

**Таблица 2.** Влияние на вида на азотния източник в средата върху структурата на микробното съобщество в смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* К-12 1655

№	Вид на азотния източник, 2 %	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 170 cfu/cm <sup>3</sup>	Численост в биофилмите на <i>E. coli</i> К-12 1655 cfu/cm <sup>3</sup>	Численост в смесените биофилми cfu/cm <sup>3</sup>	
				<i>B. subtilis</i> 170	<i>E. coli</i> К-12 1655
1.	Триптон	26,16±0,15x10 <sup>6</sup>	0	10,4±0,3x10 <sup>6</sup>	0
2.	Казеин	60,53±0,92x10 <sup>6</sup>	44,6±0,4x10 <sup>6</sup>	137,33±0,57x10 <sup>6</sup>	50,66±0,46x10 <sup>6</sup>
3.	Соев екстракт	133,86±0,46x10 <sup>6</sup>	0	128,53±0,92x10 <sup>6</sup>	0
4.	Пептон	106,13±0,4x10 <sup>6</sup>	34,4±0,2x10 <sup>6</sup>	121,66±0,6x10 <sup>6</sup>	1,53±0,3x10 <sup>6</sup>

**Таблица 3.** Влияние на вида на азотния източник в средата върху структурата на микробното съобщество в смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* К-12 1655

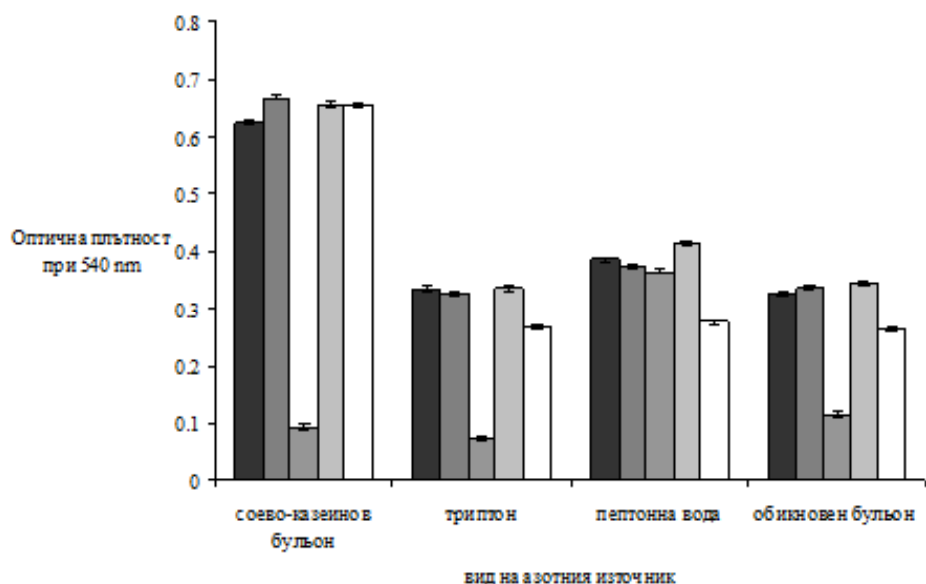
№	Вид на азотния източник, 2 %	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 168 cfu/cm <sup>3</sup>	Численост в биофилмите на <i>E. coli</i> К-12 1655 cfu/cm <sup>3</sup>	Численост в смесените биофилми cfu/cm <sup>3</sup>	
				<i>B. subtilis</i> 168	<i>E. coli</i> К-12 1655
1.	Триптон	1,13±0,15x10 <sup>6</sup>	0	2,6±0,1x10 <sup>6</sup>	0
2.	Казеин	37,86±0,46x10 <sup>6</sup>	44,6±0,4x10 <sup>6</sup>	87,9±0,98x10 <sup>6</sup>	19,03±0,25x10 <sup>6</sup>
3.	Соев екстракт	85,06±0,46.10 <sup>6</sup>	0	111,93±0,46x10 <sup>6</sup>	0
4.	Пептон	105±0,2x10 <sup>6</sup>	34,4±0,2x10 <sup>6</sup>	109,87±0,92x10 <sup>6</sup>	0

**Таблица 4.** Влияние на вида на азотния източник в средата върху числеността на спорите в структурата на смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* К-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* К-12 1655

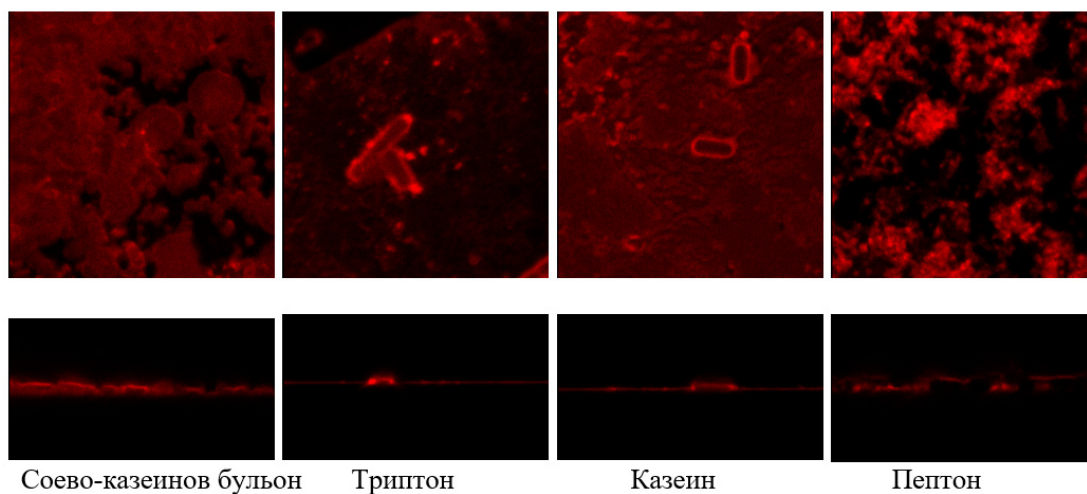
№	Вид на азотния източник 2 %	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 170 cfu/cm <sup>3</sup>	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 168 cfu/cm <sup>3</sup>	Численост в смесените биофилми cfu/cm <sup>3</sup>	
				<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> 1655	<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> 1655
1.	Триптон	(4,96±0,15)×10 <sup>3</sup>	(5,73±0,16)×10 <sup>3</sup>	0	0
2.	Казеин	(6,8±0,10)×10 <sup>3</sup>	(7,13±0,15)×10 <sup>3</sup>	(0,1±0,57)×10 <sup>3</sup>	(0,1±0,30)×10 <sup>3</sup>
3.	Соев екстракт	(6,26±0,05)×10 <sup>3</sup>	(7,03±0,17)×10 <sup>3</sup>	0	0
4.	Пептон	(2,5±0,17)×10 <sup>3</sup>	(3,36±0,20)×10 <sup>3</sup>	(0,1±0,07)×10 <sup>3</sup>	(0,2±0,06)×10 <sup>3</sup>

**Таблица 5.** Морфометрични характеристики на смесените биофилми на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* К-12 1655, *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* К-12 1655 в зависимост от растежната среда

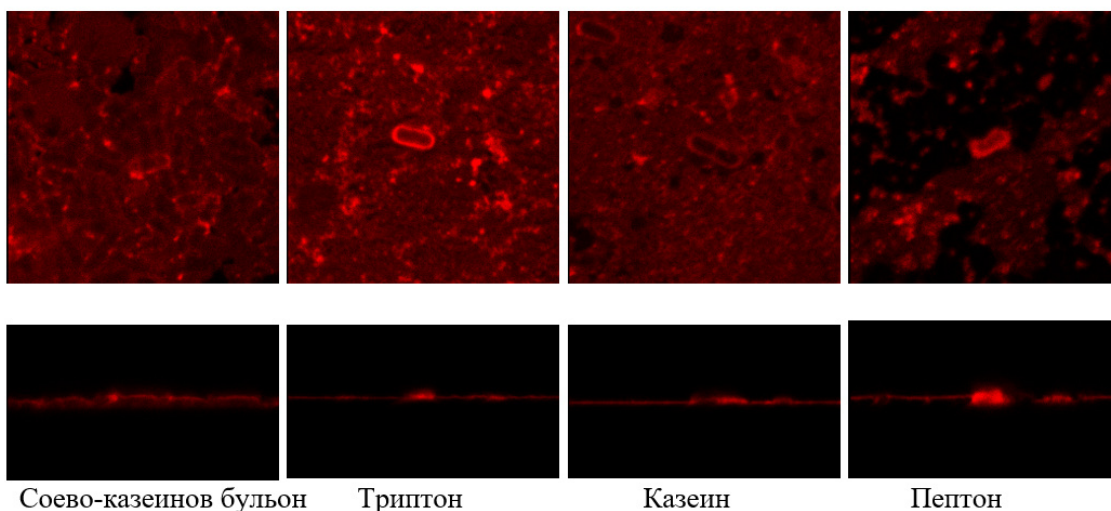
Растежна среда	Средна дебелина, μm	Коефициент, отчитащ неравностите	Относителна площ, μm <sup>2</sup>	Отношение площ/обем, μm <sup>2</sup> ·μm <sup>-3</sup>
Биофилми на щамове <i>Bacillus subtilis</i> 170 и <i>Escherichia coli</i> К-12 1655				
Соево-казеинов хидролизат	14,35±0,40	0,02±0,012	0,99±0,012	0,068±0,001
Триптон	10,57±0,38	0,16±0,03	0,99±0,014	0,094±0,003
Казеин	11,53±0,19	0,12±0,04	0,99±0,015	0,086±0,001
Пептон	12,42±0,40	0,03±0,01	0,84±0,049	0,078±0,002
Биофилми на щамове <i>Bacillus subtilis</i> 168 и <i>Escherichia coli</i> К-12 1655				
Соево-казеинов хидролизат	12,27±0,54	0,03±0,02	0,99±0,021	0,081±0,004
Триптон	8,68±0,38	0,16±0,04	0,81±0,026	0,115±0,005
Казеин	10,52±0,38	0,08±0,01	0,99±0,021	0,095±0,003
Пептон	10,56±0,21	0,07±0,02	0,99±0,016	0,094±0,002



**Фиг. 1.** Влияние на вида на азотния източник в средата за култивиране върху прираста на биофилмите на: ■ *B. subtilis* 170; ■ *B. subtilis* 168; ■ *E. coli* 1655; ■ *B. subtilis* 170+ *E. coli* 1655; □ *B. subtilis* 168+ *E. coli* 1655



**Фиг. 2.** Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни растежни среди. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20° C. Оцветяването е извършено с комплексно флуорисцентно багрило Live Bacterial Gram Stain Kit (Biotum), а наблюденията бяха извършени с помощта на конфокална лазерно сканираща микроскопия Leica TCS SPE при дължина на вълната от 540 nm



**Фиг. 3.** Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни растежни среди. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20° C. Оцветяването е извършено с комплексно флуорисцентно багрило Live Bacterial Gram Stain Kit (Biotum), а наблюденията бяха извършени с помощта на конфокална лазерно сканираща микроскопия Leica TCS SPE при дължина на вълната от 540 nm

(Gonzalez-Pastor et al., 2011). Този процес се осъществява при взаимодействието на щамове *B. subtilis* с бактериални видове, влизайщи в състава на микробиотата на почвата, и играе важна роля при увеличаване на числеността на клетките, способни към диференциация към образуващи матрикс клетки, по време на формирането на биофилми в смесени микробни съобщества (Liu et al., 2011; Nandy et al., 2007). Образуването и секрецията на сигнални протеини на канибализма от щамове *B. subtilis* в богати на азотни източници среди води до намаляване на числеността на спорообразуващите клетки и стимулира активирането на гените за биосинтезата на матрикса на биофилмите (Shank et al., 2011; Gonzalez-Pastor et al., 2011; Lopez et al., 2009), вследствие на което средният диаметър и отношението на относителната площ на разпространение към обема на образуваните структури в резултат на съвместното развитие на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 значително превишава стойността им при култивирането

в солева среда, съдържаща единствено глюкоза като хранителен и енергетичен източник при проведеното изследване.

Относителната площ на разпространение на образуваните структури при статичното им култивиране върху покривни стъкла се движи в тесен интервал от  $0,99 \pm 0,012 \mu\text{m}^2$  до  $0,99 \pm 0,015 \mu\text{m}^2$  при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, както и в границата от  $0,99 \pm 0,016 \mu\text{m}^2$  до  $0,99 \pm 0,021 \mu\text{m}^2$  при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 в присъствието на соев хидролизат, пептон и казеин като азотни източници в средата за култивиране. Стойността ѝ се снижава до  $0,84 \pm 0,049 \mu\text{m}^2$  за биофилмите на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и до  $0,81 \pm 0,026 \mu\text{m}^2$  при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при култивирането им среда, включваща триптон. Получените данни се отдават на различното отражение на отделните азотни източници върху биосинтезата на екзоцелуларните полизахариди и белтъци при щамове *B. subtilis* от състава на матрикса на биофилмите при взаимодействието им с

щам *E. coli* K-12 1655, които вземат участие в адхезията на структурите и разпространението им върху повърхностния слой на субстрата. Според проучването на Lopez et al., (2009) равнището на фосфорилираната форма на основния регулатор SpoOA определя степента на експресията на гените за протеините на канибализма и съпътстващата синтеза на основните компоненти, изграждащи матрикса на структурите и обезпечаващи тяхното разпространение. Степента на протичането на тези процеси е обусловена от активността на киназите, която се регулира по различни сигнални механизми, голяма част от които не са добре проучени (Lopez et al., 2009). Сред предполагаемите механизми се явява секрецията на съединения с антибиотичен ефект от съжителстващи видове в различните екосистеми, което определя съотнeshението на спорообразуващите и способни към диференция до биофилми клетки в клетъчната популация на щамове *B. subtilis* (Shank et al., 2011). Влиянието на отделните азотни източници върху образуването на колицини от щамове *E. coli* е различно (Kim et al., 2014), което може да обясни получения при проведеното изследване резултат.

## Заклучение

С най-силно изразен индуциращ ефект върху процеса на формиране на биофилми, образувани в резултат на съвместното култивиране на двойките щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, се отличава соевият хидролизат сред изпитваните азотни източници, като стойностите на оптичната им плътност, средната им дебелина, относителна площ на разпространение и отношението на площта към обема са най-високи при култивирането им в среда на основата на соево-казеинов хидролизат.

Съдържанието на казеин в средата за култивиране обуславя конкуретните взаимоотношения между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, докато наличието на соев хидролизат определя

антагонистичните взаимоотношения.

Отделните азотни източници имат различно отражение върху числеността на спорите в структурата на биофилмите, образувани с участието на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655.

**Благодарности** – статията е разработена и публикувана с финансовата помощ на програма „ERASMUS+“.

## Литература

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H. (2008). Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 150(3), 305-325.
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., & Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular microbiology*, 59(4), 1229-1238.
- Branda, S. S., González-Pastor, J. E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., & Kolter, R. (2001). Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11621-11626.
- Cao, M., Wang, T., Ye, R., Helmann, J. (2001). Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis*  $\sigma$ W and  $\sigma$ M regulons - *Mol Microbiol.*, 45: Cao M, B. Bernat, Z. Wang, R. Armstrong, J. Helmann (2001). FosB, a cysteine-dependent fosfomycin resistance protein under the control of sigma(W), an extracytoplasmic-function sigma factor in *Bacillus subtilis* - *J Bacteriol.*, 183:2380–31267
- Cazorla, F. M., Romero, D., Pérez-García, A., Lugtenberg, B. J. J., Vicente, A. D., & Bloemberg, G. (2007). Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizosphere displaying biocontrol activity. *Journal of applied microbiology*, 103(5), 1950-1959.
- Chen, Y., Chai, Y., Guo, J. H., & Losick, R. (2012). Evidence for cyclic di-GMP-mediated signaling in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 194(18), 5080-5090.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Liu, H., Kolter, R., Losick, R., & Guo, J. H. (2013). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental microbiology*, 15(3), 848-864.
- Chu, F., Kearns, D. B., Branda, S. S., Kolter, R., & Losick, R. (2006). Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 59(4), 1216-1228.
- Claverys, J. P., & Havarstein, L. S. (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nature Reviews Microbiology*, 5(3), 219-229.

- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M., Golec, M., Milanowski, J.** (2016). *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. *Beneficial effects - Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 23(2), 206–222
- FE, P. E. C.** (1989). Soil microbiology and biochemistry *Academic Press. Inc San Diego, Calif.*
- García-Gutiérrez, L., Zeriouh, H., Romero, D., Cubero, J., de Vicente, A., & Pérez-García, A.** (2013). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF 6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. *Microbial Biotechnology*, 6(3), 264–274.
- Ghelardi, E., Salvetti, S., Ceragioli, M., Gueye, S. A., Celandroni, F., & Senesi, S.** (2012). Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, 78(18), 6540–6544.
- González-Pastor, J. E.** (2011). Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews*, 35(3), 415–424.
- González-Pastor, J. E., Hobbs, E. C., & Losick, R.** (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 301(5632), 510–513.
- Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersbøll, B. K., & Molin, S.** (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 146(10), 2395–2407.
- Huang, X., Gaballa, A., Cao, M., & Helmann, J. D.** (1999). Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function  $\sigma$  factor,  $\sigma^W$ . *Molecular microbiology*, 31(1), 361–371.
- Ji, S., Li, W., Xin, H., Wang, S., & Cao, B.** (2015). Improved production of sublancin 168 biosynthesized by *Bacillus subtilis* 168 using chemometric methodology and statistical experimental designs. *BioMed Research International*, 2015.
- Kim, Y. C., Tarr, A. W., & Penfold, C. N.** (2014). Colicin import into *E. coli* cells: a model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1717–1731.
- Lin, D., Qu, L. J., Gu, H., & Chen, Z.** (2001). A 3.1-kb genomic fragment of *Bacillus subtilis* encodes the protein inhibiting growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of applied microbiology*, 91(6), 1044–1050.
- López, D., & Kolter, R.** (2010). Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 134–149.
- Lopez, D., Vlamakis, H., & Kolter, R.** (2008). Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS microbiology reviews*, 33(1), 152–163.
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S. T., Eichenberger, P., González-Pastor, J. E., Liu, J. S., & Losick, R.** (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 50(5), 1683–1701.
- Morikawa, M.** (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of bioscience and bioengineering*, 101(1), 1–8.
- Nandy, S. K., Bapat, P. M., & Venkatesh, K. V.** (2007). Sporulating bacteria prefers predation to cannibalism in mixed cultures. *FEBS letters*, 581(1), 151–156.
- Phelan, R. W., Barret, M., Cotter, P. D., O’connor, P. M., Chen, R., Morrissey, J. P., ... & Barbosa, T. M.** (2013). Subtilomycin: a new lantibiotic from *Bacillus subtilis* strain MMA7 isolated from the marine sponge *Haliclona simulans*. *Marine drugs*, 11(6), 1878–1898.
- Shank, E. A., Klepac-Ceraj, V., Collado-Torres, L., Powers, G. E., Losick, R., & Kolter, R.** (2011). Interspecies interactions that result in *Bacillus subtilis* forming biofilms are mediated mainly by members of its own genus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(48), E1236–E1243.
- Sotirova, A. V., Spasova, D. I., Galabova, D. N., Karpenko, E., & Shulga, A.** (2008). Rhamnolipid–biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Current microbiology*, 56(6), 639–644.
- Sotirova, A., Avramova, T., Stoitsova, S., Lazarkevich, I., Lubenets, V., Karpenko, E., & Galabova, D.** (2012). The importance of rhamnolipid-biosurfactant-induced changes in bacterial membrane lipids of *Bacillus subtilis* for the antimicrobial activity of thiosulfonates. *Current microbiology*, 65(5), 534–541.
- Tabbene, O., Slimene, I. B., Djebali, K., Mangoni, M. L., Urdaci, M. C., & Limam, F.** (2009). Optimization of medium composition for the production of antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* B38. *Biotechnology progress*, 25(5), 1267–1274.
- Vasileva-Tonkova, E., Sotirova, A., & Galabova, D.** (2011). The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacterial strains and isolates from industrial wastewater. *Current microbiology*, 62(2), 427–433.
- Wang, P., Guo, Q., Ma, Y., Li, S., Lu, X., Zhang, X., & Ma, P.** (2015). DegQ regulates the production of fengycins and biofilm formation of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* NCD-2. *Microbiological research*, 178, 42–50.
- Whipps, J. M.** (1990). Carbon economy. In: Lynch J M, editor. *The rhizosphere*. West Sussex, U.K: *John Wiley & Sons*
- Zeriouh, H., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Romero, D.** (2014). Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity. *Environmental microbiology*, 16(7), 2196–2211.