

Взаимовръзка между биофилмообразуващата способност и биологичната активност на щамове *Bacillus subtilis*

Иво Ганчев

Институт по микробиология „Стефан Ангелов“, Българска академия на науките, София

E-mail: ivotg@abv.bg

Резюме

Оскъдни са сведенията за механизма на щамове *Bacillus subtilis*, позволяващ разпространението им в ризосферния слой на почвата и ролята му на биоконтролен агент. Настоящото изследване се съсредоточава върху биологичната активност на щамове *B. subtilis* 170 и 168 към щам *E. coli* K-12. Образуваните биофилми от съвместното култивиране на щамове *B. subtilis* и *E. coli* K-12 са охарактеризирани с помощта на конфокално лазерно сканираща микроскопия. Формирането им от щамове *B. subtilis* представлява комплексен процес, включващ секрецията на сърфактин, антимикробен агент с липопептидна природа, или съпланцин или протеините на канибализма. За изясняване на значението на соевия протеин като индуктор на биосинтезата на съпланцин от щамове *B. subtilis* в настоящето изследване биофилмите бяха култивирани при различна концентрация, като ниската му концентрация не осигурява антимикробната активност на щамове *B. subtilis* 170 и 168 спрямо *E. coli* K-12 и води до образуване на биофилми с ниска стойност на биомасата върху повърхност от полистирен. Антибактериалната активност на щамове *B. subtilis* 170 и 168 срещу *E. coli* K-12 се определя чрез използване на статично култивиране на биофилми в 96-ямкови плаки. Въпреки че определените минимални инхибиторни концентрации са сравнително високи ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), нивата на съпланцин в полистиреновата повърхност, колонизирана от *B. subtilis*, вероятно са достатъчни за инхибиране на растежа на щам *E. coli* K-12 по време на биофилмообразуване. Резултатите от това изследване показват, че при колонизиране върху повърхността от полистирен щамове *B. subtilis* 170 и 168 се характеризират със способността да формират биофилми в резултат на съвместното им култивиране с щам *E. coli* K-12 и секретират на съпланцин, което се явява механизъм за защита на растенията срещу инфекцията от патогенни бактерии.

Ключови думи: биофилми, *B. subtilis*, *E. coli* K-12, биоконтролен агент

Relationship between biofilm forming ability and biological activity of *Bacillus subtilis* strains

Ivo Ganchev

The “Stephan Angeloff” Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia

E-mail: ivotg@abv.bg

Abstract

Ganchev, I. (2020). Relationship between biofilm forming ability and biological activity of *Bacillus subtilis* strains, *Bulgarian Journal of Soil Science Agrochemistry and Ecology*, 54(3), 103-117.

Relatively little is known about the exact mechanisms used by *Bacillus subtilis* in its behavior as a biocontrol agent in the rhizosphere. Using this strain model, this study demonstrated the biocontrol ability of a wild-type *B. subtilis* 170 and 168 strain 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. To determine the role of soy protein hydrolyzate as inductor of suplancine production in biocontrol by *B. subtilis*, in this study was tested the concentration of soy protein hydrolyzate on the biofilm formation by and, thus, deficient concentration of protein in the culture medium. *B. subtilis* 170 and 168 were ineffective as a biocontrol agent against *E. coli* K-12 in vitro and also failed to form robust biofilms on polystyrene surface. The antibacterial activity of *B. subtilis* 170 and 168 strains against *E. coli* K-12 was determined using of static cultivation of biofilms in 96-well plate and also by live-dead staining methods. Although the minimum inhibitory concentrations determined were relatively high ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), the levels of the suplancine in polystyrene surface colonized by *B. subtilis* are likely to be sufficient to kill *E. coli* K-12 strain. The results in this study collectively indicate that upon polystyrene surface colonization, *B. subtilis* 170 and 168 form a stable, extensive biofilm during their co-cultivation with *E. coli* K-12 and secretes suplancine, which is the proposed mechanism for a plant protection against attack by pathogenic bacteria.

Key words: biofilm, *B. subtilis*, *E. coli* K-12, biocontrol agent

Бактериите населяващи ризосферния слой на почвата се отличават със свойството да колонизират повърхностния слой на корените на растенията и могат да увеличат добива на селскостопанските култури чрез механизми, които осигуряват подобро усвояване на минерални хранителни вещества, потискане на развитието на патогенни микроорганизми или секрецията на фитохормони. Ризосферните бактерии встъпват във взаимодействие с други почвени микроорганизми, които обикновено присъстват в ризосферата, като в някои случаи действат като средство за биоконтрол срещу патогенни бактерии (Castorena et al., 2016; Redmile-Gordon et al., 2014; Lambers et al., 2009; Muratova et al., 2003).

Един от представителите на ризосферните бактерии *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 сурфактин и повърхностноактивни агенти обезпечава устойчивостта срещу развитието на редица патогенни видове (Chen et al., 2012; Chen et al., 2013; Garcia-Gutierrez et al., 2013; Zerriouh et al., 2014), сред които се открояват щамове на видовете *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, на родовете *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Candida sp.*, *Erwinia sp.* и *Xanthomonas ssp.* (Morikawa, 2006). Бактериалните съобщества, населяващи отделните екосистеми, вземат участие в образуването и разлагането на органични вещества, в разграждането на органични замърсители, чието акумулиране в околната

среда се явява резултат от антропогенното въздействие, и в регулацията на кръговрата на въглерода, азота и тежките метали (Johnson, 2012). Протичането на тези процеси в природните и техногенните екосистеми се определя от взаимодействията между бактериалните видове от дадено съобщество, отличаващи се по своите метаболитни особености, и съвместното им развитие до биофилми (Sollich et al., 2017). Тези закономерности лежат в основата на биологичното пречистване на отпадъчни води (Rodríguez-Martínez et al., 2006) и осъществяването на процеса на нитрификация в биобасейните (Lopez et al., 2008). Микробните биофилми се формират в местообитания, неблагоприятни за растежа и развитието на бактериите, като киселите шахти, където рН на средата е 5,0, а тяхното образуване в тях обезпечава процесите на окисление и редукция на сярасъдържащите съединения (Yokoо et al., 2015; Johnson, 2012) и термалните извори (Sollich et al., 2017). Комплексната структура на микробните съобщества в тези екологични ниши осигурява протичането на важни за поддържането на екологичното равновесие процеси като фотосинтеза, фиксация на азота и ферментация. 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 е съставена от отличаващи се по своите морфологични, генетични и метаболитни характеристики видове, включени в синтезирания от самите тях екзополимери като част от структурата на биофилмите.

Щамове *B. subtilis* се характеризират със свойството да продуцират антибиотични съединения с белтъчна природа като субтилин, субтилозин А, чиято биосинтеза се регулира на равнището на транслация на кодиращите ги гени (Cao et al., 2002; Stein, 2005). Те са изградени от хидрофобна верига и цикличен фрагмент, съдържащ остатъци на D-аминокиселини и орнитин, което определя високата им устойчи-

вост към въздействието на пептидази и протеази, въздействието на високите температури и различната рН-стойност на средата (Elias & Banin, 2012; López & Kolter, 2010). Освен това цистеиновите остатъци от тяхната структура се подлагат на окислителни промени, които повлияват характера на вътремолекулярното взаимодействие между тиоестерните връзки, в резултат на което се постига устойчивост на структурата на антибиотика към окислителни изменения (Stein, 2005). Образуваните при условия на високо съдържание на азотни източници в средата антибиотици от щамове *B. subtilis* се характеризират с антагонистичен ефект спрямо други грам-положителни (*Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* и *Staphylococcus aureus*) и грам-отрицателни бактериални видове (*S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. cohiniiu* *S. scui*ri), което обезпечава конкурентното им преимущество в различни екологични ниши като ризосферния слой на почвата (Luo & Helmann, 2009). Образоването им се стимулира от присъствието на соев хидролизат (Ji et al., 2015), казеин (Zerioush et al., 2014) и от триптон като азотни източници в средата за култивиране (Tabbene et al., 2009). Ролята им при образуването на биофилми с участието на щамове *B. subtilis* в процеса на асоциацията им с други грам-положителни и грам-отрицателни бактериални видове, отражението им върху популационата структура в тях остава недобре проучена в съвременната научнотехническа литература. В тази връзка целта на изследването се изразява в проучване на зависимостта между способността към образуване на биофилми и спори на щамове *Bacillus subtilis* при взаимодействието им с щамове *Escherichia coli* и тяхната антагонистична активност при култивиране в среда, съдържаща като азотен източник соево-казеинов хидролизат като индуктор за синтезата на антибиотични съединения от щамове *Bacillus subtilis*, както и структурно-морфологичните характеристики на смесените биофилми.

Материали и методи

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

Растежът на биофилма се провежда в различни растежни среди с различни концентрации на соев хидролизат при концентрация на белтък от 0,2%, 0,5%, 0,75%, 1,0% и 2,0%. Съдържанието на белтък в отделните среди се определя по метода на Лоури, описан от Stambolova et al., (1978). 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). При проведените експерименти 50 µl от течните култури се засяват в 5 cm³ течни среди M63(0,02 M KН₂PO₄, 0,04 M K₂HPO₄, 0,02 M (NH₄)₂SO₄, 0,1 mM MgSO₄ и 0,04 M глюкоза), към които се прибавя соево-казеинов бульон, така че концентрацията на белтък да бъде 0,2%, 0,5%, 0,75%, 1,0% и 2,0%.

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 епруетка 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 MacConsee 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 MacConsee агар (Лаборатория „БулБио“ – гр. София), се съди за числеността на образуващите колонии 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, излишъкът от оцветител се промива 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 Стюдънт, като различията в отделните стойности бяха приети за статистически значими при стойност на параметъра $p < 0,05$.

Резултати и дискусия

Нарастването на съдържанието на соево-казеинов хидролизат от 0,2% до 2,0% създава условия за пропорционално увеличаване на прираста на биомасата на биофилмите, образувани както в резултат на взаимодействието на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* 1655, така и при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* 1655 (фиг. 1). При съдържание на соев протеин в средата от 2,0% оптичната плътност при 540 nm достига до стойност 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 (фиг. 1). Характерът на изменение на стойността му при смесените биофилми, което се осъществява линейно в зависимост от белтъчното съдържание на средата, се доближава до образуването на биофилми от щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168, докато при щам *E. coli* K-12 1655 оптичната плътност намалява линейно при промяна на концентрацията на соев екстракт в диапазона от 0,2% до 2,0%.

Право пропорционалното нарастване на оптичната плътност на биофилмите след оцветяване с кристал виолет при 540 nm, образувани от щамове *B. subtilis* 170, *B. subtilis* 168 и в процеса на взаимодействието им с щам *E. coli* K-12 1655, вследствие на промяната на белтъчното съдържание се свързва с биосинтезата на съпланцин (Fox & Bala, 2000), който изпълнява ролята на регулаторна молекула при развитието им в прикрепено по различни повърхности състояние (Valamakis et al., 2013). Активността му при щам *B. subtilis* BS5 значително нараства при белтъчно съдържание на средата от 1,0% според проучването на Abdel-Mawgoud et al., (2008), като в настоящето проучване стойността на оптичната плътност при тези условия на култивиране е при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и за двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, което значително привишава размера им при съдържание на белтък от 0,2% ($p < 0,05$) в хранителната среда. В друго изследване белтъчното съдържание от 2,0% в средата за култивиране води до образуване на съпланцин в концентрация от $122,6 \pm 1,64$ mg/l (Ji et al.,

2015), което обезпечава диференциацията на клетките на щам *B. subtilis* до развитие на биофилми (Valamakis et al., 2013).

Нарастването на стойността на оптичната плътност на биофилмите на щамове *B. subtilis* при асоциацията им с щам *E. coli* K-12 1655 е в съгласие с на резултатите от проучването на López et al., (2009), при което мутантните щамове с високо равнище на експресия на *skf* и *sdp* оперони секретират голямо количество токсини на канибализма в средата, вследствие настъпва лизиране на популацията от клетки, чувствителни на тяхното въздействие, нараства съдържанието на хранителните вещества и достига до диференциация на устойчивите клетки до образуване на матрикса и развитието им до биофилми. С този механизъм на регулация на образуването на биофилми от щамове *B. subtilis* при асоциацията им с щамове *E. coli* под влияние на образувания и секретирани от тях съпланцин може да се обясни нарастването на биомасата им при изменение на концентрацията на белтък в средата за култивиране. Координираната експресия на протеините на канибализма и синтезата на матрикса на биофилмите се обезпечава от сигналната молекула на кворум-сенсинг системата сърфактина (López et al., 2009), чиято биосинтеза се затормозява при съдържание на белтък над 0,5% според редица проучвания (Ghelardi et al., 2012; Al-Wahaibi et al., 2014; Fox & Bala, 2000) и оказва влияние върху клетъчната подвижност при щамове *B. subtilis* (Kinsinger et al., 2003).

Популациите на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 преобладават в структурата на биофилмите при асоциацията им с щамове *E. coli* K-12 1655 при белтъчно съдържание в диапазона от 0,75% до 1,0%. Ниската концентрация на белтък от 0,2% в средата за култивиране при проведеното проучване обезпечава численост на колонии на щам *E. coli* K-12 1655 от $10,66 \pm 0,61 \times 10^6$ cfu/cm³ и $24,66 \pm 0,50 \times 10^6$ cfu/cm³ в структурата на смесените биофилми, която двукратно превишава стойността на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 ($p < 0,05$). В изследването на Powers et al., (2015) щамове *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas protegens*

секретират вещество с антибиотично действие, което инхибира активността на гените за образуване на биофилми при щам *B. subtilis* в субинхибиторна концентрация от 2,23 μM при съвместното им развитие върху кореновата повърхност на *Arabidopsis*. Количините са антимикробни пептиди, които се секретират от щамове *E. coli* при неблагоприятни условия на околната среда, ниско съдържание на хранителни вещества и оказват цитотоксичен ефект както върху техните клетки, така и върху съжителстващите видове (Cascales et al., 2007). В настоящето изследване се установява намаляване на числеността на колонии на щамове *B. subtilis* и *E. coli* в структурата на смесените биофилми при култивирането им в среда с белтъчно съдържание в границата от 0,5% до 1,0%. Повишаването на активността на σW -фактора при щамове *B. subtilis* способства за транскрипцията на гените, отговорни за устойчивостта им към въздействието на амилоциклините, продуцирани от щамове *B. amyloliquefaciens* според проучването на Branda et al., (2006). Експресията на опероните *yfhLM* с *yknWXYZ*, регулирана от същия σ -фактор, обезпечава устойчивостта им към *Sdp* протените на канибализма (Branda et al., 2006). Степента на регулация на гените, отговорни за устойчивостта на щамове *B. subtilis* към влиянието на антимикробните съединения, секретирани от съжителстващи видове, обуславя и по-ниската численост на популацията му в структурата на биофилма, образуван при взаимодействието му с щам *E. coli* K-12 1655 при съдържание на белтък от 0,5 % при проведеното изследване.

Промяната съдържанието на соев хидролизат в интервала от 0,75% до 1,0% води до изменение в числеността на популацията на щам *B. subtilis* 170 от $21,5 \pm 0,4 \times 10^6$ cfu/cm³ до $24,06 \pm 0,2 \times 10^6$ cfu/cm³, която надвишава приблизително два пъти числеността на популацията на щам *E. coli* K-12 1655 в структурата на биофилма. Получените данни свидетелстват за конкурентни взаимоотношения между двата щамове по време на формирането на биофилми при съдържание на соев хидролизат

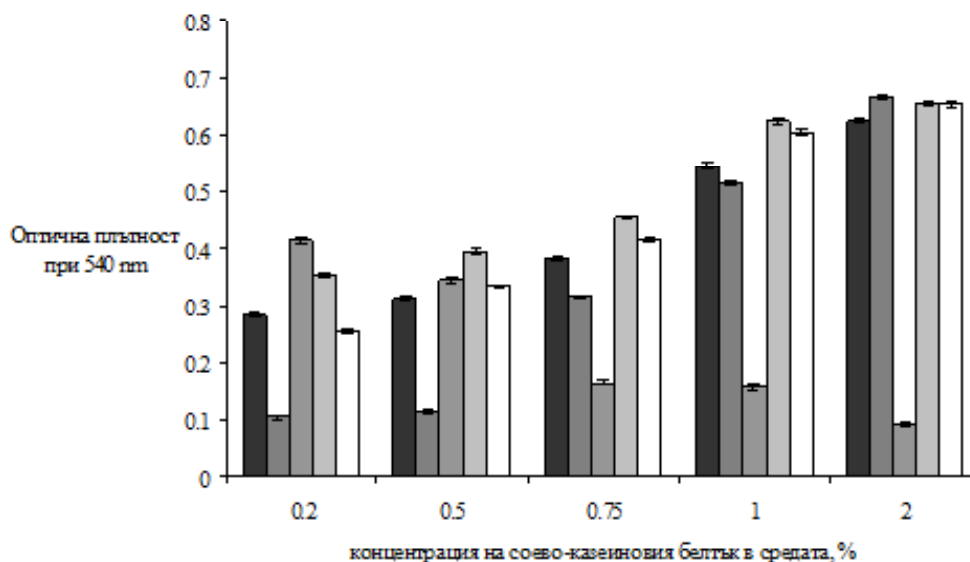
от 0,1% до 1,0%. Антимикробният ефект на щамове *B. subtilis* в процеса на развитието им до биофилми съвместно с други микробни видове е обусловен от способността им да образуват и секретират протеини с антибиотично действие и сърфактанти при конкретните условия на средата (Hofemeister et al., 2004). Биосинтезата на съпланцина се иницира при щам *B. subtilis* 168 при минимално съдържание на соев хидролизат в средата от 0,8% (Ji et al., 2015), което подтиска развитието и разпространението на щамове *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* Mc 4100 LBCB, *Escherichia coli* DH5a LBCB в структурата на образуваните от съвместното им развитие биофилми (Zerrouh et al., 2014; Tabbene et al., 2009).

При концентрация на белтък от 2,0% в средата се отчита антагонистична активност на щамове на вида *B. subtilis* при асоциацията им с щамове *E. coli* K-12 1655. Въздействието на антибиотичните вещества и токсините на канибализма не се ограничава само до спорообразуващите клетки на щамове *B. subtilis* в процеса на формиране на биофилми (Shank et al., 2011). Те преимуществено оказват негативно влияние върху преживяемостта на клетките на съжителстващите видове (Nandy et al., 2007). Тяхната концентрация при съдържание на белтък от 2,0% в средата за култивиране се движи в диапазона от 122,6 mg/l при култивиране на щам *B. subtilis* 168 (Ji et al., 2015) до 250 mg/l при щам *B. subtilis* DSM 15029 (Fox & Bala, 2000), която инхибира разпространението на щамове *B. cereus*, *L. monocytogenes* и *C. sporogenes* в структурата на биофилмите (Phelan et al., 2013). Генетичният участък, отговорен за образуването на бактериоцина от щам *B. subtilis* MMA7, представлява част от *skf* оперона, който кодира и биосинтезата на цитотоксичния спорообразващ фактор *SkfA*, който причинява лизиране неспорообразуващите клетки (Gonzalez-Pastor, 2011) и клетките на съжителстващия вид (Nandy et al., 2007), което обяснява отсъствието на колонии на щам *E. coli* K-12 1655 в популацията, съставляваща образуваните смесени биофилми в резултат на съвместното му развитие с щамове *B. subtilis*

170 и *B. subtilis* 168 при проведеното проучване (таблица 2 и 3).

Числеността на спорите в структурата на биофилмите в настоящето проучване, образувани от щамове на един микробен вид, нараства в линейна зависимост при промяна на концентрацията на белтъка от 0,2% до 2,0%, като при щам *B. subtilis* 170 се установява нарастване от $(0,26 \pm 0,05) \times 10^3$ cfu/cm³ до $(6,26 \pm 0,05) \times 10^3$ cfu/cm³, докато при щам *B. subtilis* 168 измененията настъпват в границата от $(0,73 \pm 0,06) \times 10^3$ cfu/ml до $(7,03 \pm 0,17) \times 10^3$ cfu/cm³. Тяхната стойност съставлява от 2% от общата биомаса на биофилмите при съдържание на белтък от 0,2%, а нарастването на концентрацията му до стойност от 2,0% се съпътства с увеличаване на дела на спорите до 4% в структурата на биофилмите на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168. В процеса на формиране на биофими, образувани от асоциацията на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, се забелязва противоположна тенденция, изразяваща в намаляване на числеността на спорите, което се осъществява линейно при промяна на белтъчното съдържание в границата от 0,2% до 1,0%. Нарастването на стойността му до 2,0% инхибира процеса на формиране 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 съдържание на белтък от 0,2% числеността на спорите се равнява на $(20,6 \pm 0,10) \times 10^3$ cfu/cm³ при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и $(21,4 \pm 0,25) \times 10^3$ cfu/cm³ при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 и значително превишава стойността им при моновидовите биофилми. Делът им в образуваните биофилми представлява съответно 24% и 30%. Нарастването на стойността му до 1,0% се съпровожда с редуциране на числеността на спорите до $(6,16 \pm 0,15) \times 10^3$ cfu/ml при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и $(6,66 \pm 0,56) \times 10^3$ cfu/ml при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, което не се отличава статистически значимо при моновидовите биофилми (таблица 4).

Високата концентрация на белтъка в средата за култивиране води до активиране на транскрипцията на *skf* оперона при щам *B. subtilis* 168, който включва и генетичния участък за биосинтезата на събланцина и кодира образуването на SkfA и SDP протените, които специфично повлияват на спорите (Gonzalez-Pastor et al., 2003). Канибализмът се явява механизъм за инхибиране на образуването на спори в процеса на развитието на бактериите да биофилми. Лизирането на клетките служи като източник на хранителни вещества, което позволява да се образуват структури с ниска численост на спорите в тях (Gonzalez-Pastor et al., 2003). Ниското равнище на експресия на *skf* оперона при щамове *B. subtilis* при съдържание на соев протеин в средата в границата от 0,2% до 2,0% обяснява линейното нарастване на числеността на спорите на образуваните биофилми в настоящето проучване. Nandy et al., (2007) установяват, че щам *B. subtilis* не образува спори при съвместното си развитие с щам *E. coli*, което се явява резултат от действието на факторите на канибализма върху спорообразуващите клетки и индукцията на гените за биосинтезата на матрикса, изграждащ структурата на биофилма, както и лизирането на клетките на щам *E. coli*. Неспорообразуващите клетки на щам *B. subtilis* усвояват хранителните вещества от състава на средата, образуващи се в резултат на лизиса на клетките на щам *E. coli* според проучването на Claverys и Navarstein (2007), което възпрепятства протичането на процеса на формиране на спори и обезпечава диференциация на клетките до образуване на биофилми. Протичането на този регулаторен процес при съвместното развитие на изследваната двойка щамове обяснява линейното снижаване на числеността на спорите в структурата на биофилмите на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* 1655. Противоположната зависимост при моновидовите биофилми при проведеното проучване е в съгласие с резултатите от проучването на Gonzalez- Pastor et al., (2003), според което процесът на спорообразуване по време на формиране на биофилми има



Фиг. 1. Влияние на концентрацията на соево-казеинов хидролизат в средата върху прираста на биофилмите от: ■ *B. subtilis* 170; ■ *B. subtilis* 168; ■ *E. coli* 1655; ■ *B. subtilis* 170+ *E. coli* 1655; □ *B. subtilis* 168+ *E. coli* 1655. Растежът на биофилмите е осъществен в 96-ямкови плаки за време от 24 h при температура от 20° C в среда M63 с различно съдържание на соево-казеинов хидролизат. Оптичната плътност е измерена при 540 nm след оцветяване на биофилмите с 0,1% кристал виолет.

$y=0,0916.x+0,1546$, $r^2=0,9435$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 170

$y=0,1524.x+0,1138$, $r^2=0,9520$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 168

$y=-0,0829.x+0,4833$, $r^2=0,9155$, $p<0,05$ - *E. coli* K-12 1655

$y=0,0831.x+0,2474$, $r^2=0,9379$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655

$y=0,1069.x+0,1317$, $r^2=0,9672$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 168-*E. coli* K-12 1655

Таблица 1. Бактериални щамове, използвани в проучването

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

^a Национална банка по промишлени микроорганизми и тъканни култури, София

^b 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 концентрацията на соево-казеинов хидролизат в средата върху структурата на микробното съобщество в смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655

№	Концентрация на соевия протеин, %	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 170 cfu/cm ³	Численост в биофилмите на <i>E. coli</i> K-12 1655 cfu/cm ³	Численост в смесените биофилми cfu/cm ³	
				<i>B. subtilis</i> 170	<i>E. coli</i> K-12 1655
1	0,2	10,63±0,55x10 ⁶	26,26±0,3x10 ⁶	4,8±0,2x10 ⁶	10,66±0,61x10 ⁶
2	0,5	47,4±0,45x10 ⁶	28,6±0,75x10 ⁶	15,46±0,6x10 ⁶	14,53±0,41x10 ⁶
3	0,75	49,26±0,30x10 ⁶	12,3±0,3x10 ⁶	24,06±0,4x10 ⁶	12,2±0,26x10 ⁶
4	1,0	36,2±0,72x10 ⁶	8,13±0,15x10 ⁶	21,5±0,2x10 ⁶	9,56±0,3x10 ⁶
5	2,0	133,86±0,46x10 ⁶	0	128,53±0,92x10 ⁶	0

Таблица 3. Влияние на концентрацията на соево-казеинов хидролизат в средата върху структурата на микробното съобщество в смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655

№	Концентрация на соевия протеин, %	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 168 cfu/cm ³	Численост в биофилмите на <i>E. coli</i> K-12 1655 cfu/cm ³	Численост в смесените биофилми cfu/cm ³	
				<i>B. subtilis</i> 168	<i>E. coli</i> K-12 1655
1	0,2	10,43±0,15x10 ⁶	26,26±0,3x10 ⁶	10,53±0,41x10 ⁶	24,66±0,50x10 ⁶
2	0,5	45,46±0,25x10 ⁶	28,6±0,75x10 ⁶	26,4±0,52x10 ⁶	18,66±0,41x10 ⁶
3	0,75	45,23±0,25x10 ⁶	12,3±0,3x10 ⁶	21,23±0,6x10 ⁶	12,1±0,36x10 ⁶
4	1,0	34,8±0,72x10 ⁶	8,13±0,15x10 ⁶	20,2±0,4x10 ⁶	6,2±0,2x10 ⁶
5	2,0	85,06±0,46x10 ⁶	0	111,93±0,46x10 ⁶	0

Таблица 4. Влияние на концентрацията на соево-казеинов хидролизат в средата върху числеността на спорите в структурата на смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* 1655

№	Концентрация на соевия екстракт, %	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 170 cfu/cm ³	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 168 cfu/cm ³	Численост в смесените биофилми cfu/cm ³	
				<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 1655	<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 1655
1	0,2	(0,26±0,05)x10 ³	(0,73±0,06)x10 ³	(20,6±0,10)x10 ³	(21,4±0,25)x10 ³
2	0,5	(1,06±0,06)x10 ³	(1,23±0,08)x10 ³	(14,4±0,17)x10 ³	(15,3±0,13)x10 ³
3	0,75	(2,16±0,17)x10 ³	(3,66±0,57)x10 ³	(10,3±0,20)x10 ³	(12,1±0,76)x10 ³
4	1,0	(3,53±0,57)x10 ³	(4,30±0,1)x10 ³	(6,16±0,15)x10 ³	(6,66±0,56)x10 ³
5	2,0	(6,26±0,05)x10 ³	(7,03±0,17)x10 ³	0	0

y=1,447.x-1,687, r²=0,9395, p<0,05 - *B. subtilis* 170

y=1,565.x-1,307, r²=0,9486, p<0,05 - *B. subtilis* 168

y=-4,944.x+25,124, r²=0,9931, p<0,05 - *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655

y=-5,144.x+26,524, r²=0,9886, p<0,05 - *B. subtilis* 168-*E. coli* K-12 1655

обратим характер. В клетъчната популация от шамове с мутации в *skf* оперона процесът на образуване на спори в структурата на биофилма протича нормално и по своите морфологични особености са идентични с изходния или дивия щам (Gonzalez-Pastor et al., 2003).

Средната дебелина запазва относително постоянен размер при култивирането на биофилмите в среда със съдържание на соево-каеинов хидролизат в границата от 0,2% до 0,5%, като стойността на образуваните структури се колебае в тесен интервал от $11,19 \pm 0,24$ μm до $11,82 \pm 0,25$ μm при двойката шамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 при коефициент на неравност от $0,06 \pm 0,02$ до $0,08 \pm 0,02$ и в диапазона от $9,39 \pm 0,14$ μm до $9,98 \pm 0,32$ μm за двойката шамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, като коефициентът на неравност се установява в границата от $0,12 \pm 0,02$ до $0,14 \pm 0,03$. Увеличаването на концентрацията му се съпътства с пропорционално нарастване на величината на средната дебелина в линейна зависимост при съвместното култивиране на двойките шамове до формиране на биофилми. Стойността на средната дебелина достига до размер от $14,35 \pm 0,40$ за биофилмите, формирани от съвместното култивиране на двойката шамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, и $12,27 \pm 0,54$ за биофилмите на двойката шамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при нарастване на съдържанието на белтък до 2,0% при проведеното проучване. Отношението на относителната площ на разпространение към обема на образуваните структури намалява също линейно за изследваната двойка шамове при промяна на белтъчното съдържание на средата за култивиране в границата от 0,2% до 2,0%, като стойността му съставлява $0,089 \pm 0,002$ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ за структурите, образувани в резултат на съвместното култивиране на двойката шамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, при белтъчно съдържание на средата от 0,2%, което намалява до размер от $0,082 \pm 0,006$ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ при нарастване на концентрацията му до 1,0%. Белтъчното съдържание на средата за култивиране от 2,0% обезпечава развитието на двойката шамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12

1655 в прикрепено състояние до образуване на структури, отличаващи се със стойност на отношението на относителната площ на разпространение към обема им от $0,068 \pm 0,001$ $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3}$ (таблица 5; фиг. 2 и 3).

Силното намаляване на относителния обем и средната дебелина на образуваните в резултат на съвместното култивиране на изследваната двойка шамове до образуване на биофилми при проведеното проучване е в съгласие с резултатите на López et al., (2009), според които средната дебелина на биофилмите на мутантния щам *B. subtilis* ($\Delta\text{dlt}\Delta\text{abh}$) се характеризира с по-голяма дебелина в сравнение с изходния щам, което се свързва с експресията на гените за биосинтезата на екзоцелуларния матрикс. Експресията на гените, регулирана от основния регулатор на процесите на образуване на биофилми и спори от шамове *B. subtilis* Spo0A, се обуславя от равнището на фосфорилираната му форма Spo0A~P в клетките (Fujita et al., 2005, Wang et al., 2015). Реакциите на пренос на фосфатни групи до основния регулаторне белтък Spo0A протичат с участието на различни кинази (Jiang et al., 2000). Киназата KinD взема участие в контрола на процесите на образуване на спори и биосинтезата на основните компоненти, изграждащи матрикса на биофилмите при шамове *B. subtilis* в процеса на асоциацията му с други микробни видове (López et al., 2009). Ниското ниво на фосфорилиране на регулатора Spo0A създава условия за повишаването на равнището на транскрипция на гените, отговорни за образуването на матрикса на биофилмите, както и инициира формирането на протените на канибализма (Fujita et al., 2005). Протичането на тези регулаторни процеси се явява резултат от активирането на *skfA-H* гена, отговорен за образуването на Skf протените, понижаването на активността на негативния регулатор AbrB и *sdrABC* оперона за синтезата на протеина канибализма (Gonzalez-Pastor et al., 2003).

Устойчивостта му към въздействието на други антимикробни фактори, секретирани от близкородствени видове, се детерминира от високото равнище на експресия на регулаторния белтък Spo0A (Shank et al., 2011) и е най-силно

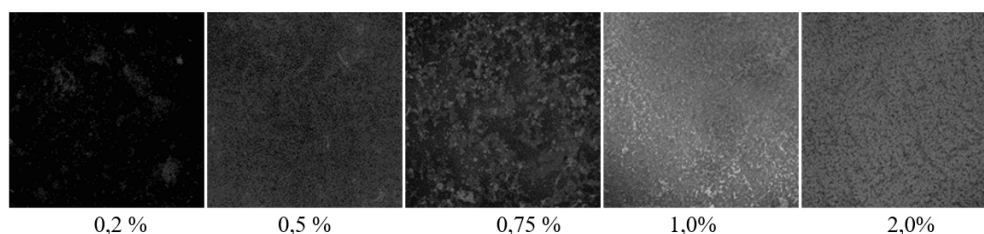
Таблица 5. Морфометрични характеристики на смесените биофилми на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655, *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 в зависимост от концентрацията на соево-казеинов хидролизат на средата

Концентрация на белтък в средата, %	Средна дебелина, μm^*	Коефициент, отчитащ неравностите	Относителна площ, μm^{2**}	Отношение площ/обем, $\mu\text{m}^2 \cdot \mu\text{m}^{-3***}$
Биофилми на щамове <i>Bacillus subtilis</i> 170 и <i>Escherichia coli</i> K-12 1655				
0,2	11,19 \pm 0,24	0,08 \pm 0,02	0,50 \pm 0,019	0,089 \pm 0,002
0,5	11,69 \pm 0,33	0,07 \pm 0,09	0,59 \pm 0,017	0,085 \pm 0,002
0,75	11,82 \pm 0,25	0,06 \pm 0,02	0,66 \pm 0,013	0,084 \pm 0,002
1,0	12,11 \pm 0,24	0,05 \pm 0,07	0,74 \pm 0,008	0,082 \pm 0,006
2,0	14,35 \pm 0,40	0,02 \pm 0,01	0,99 \pm 0,012	0,068 \pm 0,001
Биофилми на щамове <i>Bacillus subtilis</i> 168 и <i>Escherichia coli</i> K-12 1655				
0,2	9,39 \pm 0,14	0,14 \pm 0,02	0,77 \pm 0,010	0,106 \pm 0,016
0,5	9,64 \pm 0,24	0,14 \pm 0,03	0,85 \pm 0,006	0,103 \pm 0,003
0,75	9,98 \pm 0,32	0,12 \pm 0,02	0,89 \pm 0,013	0,100 \pm 0,004
1,0	10,38 \pm 0,25	0,13 \pm 0,01	0,94 \pm 0,038	0,096 \pm 0,002
2,0	12,27 \pm 0,54	0,03 \pm 0,02	0,99 \pm 0,021	0,081 \pm 0,004

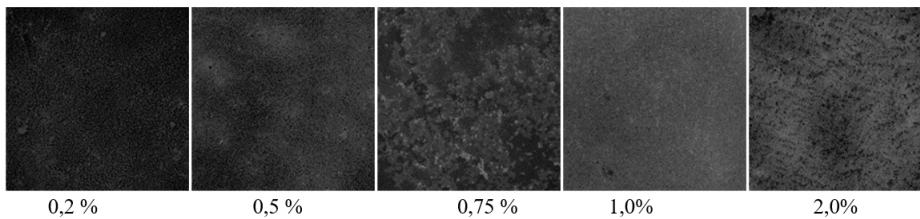
* $y=0,774 \cdot x+10,11$, $r^2=0,9069$, $p<0,05$ – *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655; $y=0,75 \cdot x+8,282$, $r^2=0,9155$, $p<0,05$ – *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655

** $y=0,123 \cdot x+0,347$, $r^2=0,969$, $p<0,05$ – *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655; $y=0,053 \cdot x+0,729$, $r^2=0,9863$, $p<0,05$ – *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655

*** $y=-0,0052 \cdot x+0,0961$, $r^2=0,918$, $p<0,05$ – *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655; $y=-0,0067 \cdot x+0,115$, $r^2=0,903$, $p<0,05$ – *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655



Фиг. 2. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни стойности на белтъчното съдържание на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20° C. Оцветяването е извършено с комплексно флуорисцетно 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 стойности на белтъчното съдържание на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20° С. 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

изразена в клетките с високо равнище на експресия на гените за матрикса (Gonzalez-Pastor et al., 2011). Секретията на колицини от щамове *E. coli* K-12 1655 при съдържание на белтък от 0,2% до 1,0% индуцира хиперканибализма на щамове *B. subtilis* (López et al., 2009), което обезпечава диференциацията му до образуване на матрикс (López et al., 2010) и обяснява пропорционалното нарастване на средната дебелина на образуваните структури при достигане на концентрация на белтък от 2,0%.

Ниското вътреклетъчно равнище на фосфорилираната форма на регулатора Spo0A обезпечава индукцията на опероните *epsA-O* и *tapA*, отговорни за биосинтезата на екзоцелураните полизахариди и амилоидните белтъчни влакна от състава на матрикса на биофилмите и тяхната разпространение по повърхностния слой на субстрата (Branda et al., 2001). Протичането на този механизъм на регулация на активността на опероните обяснява нарастването на относителната площ на разпространение на образуваните структури при промяна на съдържанието на белтък в средата за култивиране от 0,2% до 2,0%, като стойността ѝ се изменя в границата от $0,50 \pm 0,019 \mu\text{m}^2$ до $0,99 \pm 0,012 \mu\text{m}^2$ при съвместното култивиране на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli*

K-12 1655. При двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 относителната площ на разпространение съставлява $0,77 \pm 0,010 \mu\text{m}^2$ при концентрация на белтък от 0,2% и достига стойност от $0,99 \pm 0,021 \mu\text{m}^2$ при нарастване на белтъчното съдържание до 2,0%. Силната взаимовръзка между оптичната плътност при 540 nm, средната дебелина, отношението на площта към обема и относителната площ на разпространение на образуваните структури, установена при проведеното проучване, е в съгласие с проучванията на Fujita et al., (2005), които водят до заключението, че диференциацията в експресията на гените, обусловена от равнището на регулаторния протеин Spo0A, е в тясна взаимовръзка със съдържанието на фосфорилираната му форма в клетките (Fujita et al., 2005, Veening et al., 2008). Ниското вътреклетъчно равнище на фосфорилираната на регулаторния протеин Spo0A води до инициация на биосинтезата на матрикса на биофилмите и канибалните белтъци, докато нарастването на съдържанието му стимулира процеса на спорообразуване (Fujita et al., 2005), което обяснява обратно пропорционалната зависимост между числеността на спорите в структурата на смесените биофилми и стойността на средната им дебелина, относителната площ на разпространение

и относителния обем на единици площ при проведеното проучване. Устойчивите на въздействието на секретираниите в процеса на формиране на тези структури протеини на канибализма клетки се отличават с високо ниво на експресията на оперона *epsA-O*, който кодира образуването на екзоцелуларните полизахариди, и оперонния участък *uqxM-sipW-tasA*, чиято транскрипция води до биосинтезата на белтъка *TasA*, който се включва в състава на матрикса на биофилма и обезпечава разпространението му по повърхностния слой на субстрата (Romero et al., 2010). Активирането на синтезата на протените от структурата на матрикса на биофилмите при щамове *B. subtilis* определя пропорционалното нарастване на стойността на относителната площ на разпространение на стуктурите при промяна на съдържанието на белтък в средата за култивиране, като най-отчетливо се наблюдава при нарастване на концентрацията му над 0,75%.

Заклучение

Соево-казеиновият хидролизат оказва 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, като стойностите на оптичната им плътност, средната им дебелина, относителна площ на разпространение и отношението на площта към обема зависят от концентрацията му в средата за култивиране.

Съдържанието на соево-казеинов хидролизат в средата за култивиране обуславя конкурентите взаимоотношения между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 в структурата на биофилмите в настоящето проучване, докато наличието на соев хидролизат в концентрация от 2,0% определя антагонистичната активност на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168.

Процесът на формиране на спори в структурата на биофилмите, 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 стимулира при ниска концентрация на соево-казеинов хидролизат в средата, докато концентрацията му от 2,0% инхибира тяхното формиране и не е в тясна връзка с антагонистичната им активност.

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.
- Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., & Shibulal, B. (2014). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 324-333.
- 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. D. (2002). Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* σ W and σ M regulons. *Molecular microbiology*, 45(5), 1267-1276.
- Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleantous, C., Llobes, R., Postle, K., ... & Cavard, D. (2007). Colicin biology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(1), 158-229.
- Castorena, E. V. G., del Carmen Gutiérrez-Castorena, M., Vargas, T. G., Bontemps, L. C., Martínez, J. D., Méndez, E. S., & Solorio, C. A. O. (2016). Micromapping of microbial hotspots and biofilms from different crops using digital image mosaics of soil thin sections. *Geoderma*, 279, 11-21.
- 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 rhizoplane 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.
- Claverys, J. P., & Håvarstein, L. S.** (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and *raison d'être*. *Nature Reviews Microbiology*, *5*(3), 219-229.
- Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., 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.
- Elias, S., & Banin, E.** (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, *36*(5), 990-1004.
- Fox, S. L., & Bala, G. A.** (2000). Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource technology*, *75*(3), 235-240.
- Fujita, M., González-Pastor, J. E., & Losick, R.** (2005). High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, *187*(4), 1357-1368.
- García-Gutiérrez, L., Zerriouh, 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.
- 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.
- Jiang, M., Shao, W., Perego, M., & Hoch, J. A.** (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, *38*(3), 535-542.
- Johnson, D. B.** (2012). Geomicrobiology of extremely acidic subsurface environments. *FEMS microbiology ecology*, *81*(1), 2-12.
- Kinsinger, R. F., Shirk, M. C., & Fall, R.** (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of bacteriology*, *185*(18), 5627-5631.
- Lambers, H., Mougel, C., Jaillard, B., & Hinsinger, P.** (2009). Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and soil*, *321*(1-2), 83-115.
- 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.
- Luo, Y., & Helmann, J. D.** (2009). Extracytoplasmic function σ factors with overlapping promoter specificity regulate sublancin production in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, *191*(15), 4951-4958.
- Morikawa, M.** (2006). Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of bioscience and bioengineering*, *101*(1), 1-8.
- Muratova, A., Hübner, T., Narula, N., Wand, H., Turkovskaya, O., Kusch, P., ... & Merbach, W.** (2003). Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiological research*, *158*(2), 151-161.
- 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.
- Powers, M. J., Sanabria-Valentín, E., Bowers, A. A., & Shank, E. A.** (2015). Inhibition of cell differentiation in *Bacillus subtilis* by *Pseudomonas protegens*. *Journal of bacteriology*, *197*(13), 2129-2138.
- Redmile-Gordon, M. A., Brookes, P. C., Evershed, R. P., Goulding, K. W. T., & Hirsch, P. R.** (2014). Measuring the soil-microbial interface: extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from soil biofilms. *Soil Biology and Biochemistry*, *72*, 163-171.
- Rodríguez-Martínez, E. M., Pérez, E. X., Schadt, C. W., Zhou, J., & Massol-Deyá, A. A.** (2006). Microbial diversity and bioremediation of a hydrocarbon-contaminated aquifer (Vega Baja, Puerto Rico). *International journal of environmental research and public health*, *3*(3), 292-300.
- Romero, D., Aguilar, C., Losick, R., & Kolter, R.** (2010). Amyloid fibers provide structural integrity to *Bacillus subtilis* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(5), 2230-2234.
- 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.

Sollich, M., Yoshinaga, M. Y., Häusler, S., Price, R. E., Hinrichs, K. U., & Bühring, S. I. (2017). Heat stress dictates microbial lipid composition along a thermal gradient in marine sediments. *Frontiers in microbiology*, 8, 1550.

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.

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.

Stambolova, M., Chomoneva-Nikopol, T., Argirova, T. (1978). Guide for practical classes in biochemistry - *Science and Art*, Sofia.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular microbiology*, 56(4), 845-857.

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.

Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugregard, P., Losick, R., & Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157-168.

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.

Yokoo, R., Hood, R. D., & Savage, D. F. (2015). Live-cell imaging of cyanobacteria. *Photosynthesis research*, 126(1), 33-46.

Zerriouh, 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.