

Иво Тодоров Ганчев

**КО-АГРЕГАЦИЯ МЕЖДУ ЩАМОВЕ *Bacillus subtilis* И *Escherichia coli* K-12 И
ОБРАЗУВАНЕ НА СМЕСЕНИ БИОФИЛМИ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертация, представена за присъждане на образователна и научна степен „Доктор“
по Биологични науки (01.06.10. Микробиология)

Научен ръководител
Доц. д-р Стоянка Стоицова

София
2019 г.

Дисертационният труд е обсъден на Национален семинар по Обща микробиология при Институт по микробиология „Стефан Ангелов“ към Българска академия на науките на заседание, състояло се на 15.04.2019 г. и насрочен за защита.

Дисертацията съдържа 173 страници, включително 68 фигури и 46 таблици. В библиографията са включени 300 литературни източника, като три са на български език и 297 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 2019 г. в Заседателната зала на Института по микробиология „Стефан Ангелов“ към Българска академия на науките.

I. ВЪВЕДЕНИЕ

В природните екосистеми голяма част от бактериите (повече от 90 % от всички бактериални видове) са разпространени във вид на специфични организирани структури, прикрепени по абиотични и биотични повърхности [Karatan and Watnick, 2009; Hall-Stoodley et al., 2004], наречени биофилми [Karatan and Watnick, 2009]. Тяхното формиране представлява сложен, строго регулиран процес, който се обуславя от множество фактори, включващи генетичния контрол на регулацията на биологичните процеси, свойствата на бактериалните клетки при различните условия на култивиране, характеристиките на субстрата, върху който се извършва прикрепянето на биофилма, факторите на околната среда (pH-стойността на средата, температурата, вида и концентрацията на хранителните източници и други) [Srey et al., 2013]. Способността към биофилмообразуване представлява съществена част от цикъл на развитието на голяма част от микробните видове, разпространени в природата [Hall-Stoodley et al., 2004].

Изследователската дейност по механизмите на образуване на биофилмите в природата и в техногенните системи, както търсенето на методи и подходи за ограничаване на тяхното разпространение се дължи на обстоятелството, че патогенните бактериални видове в състава на биофилмите създават трудности пред медицинската практика, свързани със значителната им устойчивост към въздействието на различни по своята природа и структура антимикробни средства и фактори на имунната защита на организма при асоциацията му с микробните видове [Lopez et al., 2010]. Образуването на бактериални биофилми причинява появата и развитието на хронични заболявания [Mizan et al., 2015]. Използваните в медицинската практика материали като катетри за уринарно болни хора крият риск от колонизацията на различни микробни видове и разпространението на различни инфекции, което се обуславя от способността на бактериите да се развиват в прикрепено състояние по тяхната повърхност до образуване на биофилми [Wang et al., 2010]. Населяващите устната кухина на човека бактериални видове се отличават със свойството да се прикрепят по повърхността на зъбния емайл и да формират комплекси съобщества [Biyikoglu et al., 2012], сред които се открояват видовете *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola* [Sano et al., 2014].

В хранителната индустрия образуването на микробни биофилми по повърхността на хранителните продукти и по повърхностите на технологичното оборудване увеличава риска от замърсяването им с патогенни бактерии [Hall-Stoodley et al., 2004]. Около 80 % от бактериалните инфекции по хранителните продукти в САЩ са свързани с развитието на микробни биофилми [Srey et al., 2013]. Устойчивостта им към въздействието на дезинфекционните средства обуславя развитието и разпространението им по повърхността на технологичното оборудване в пивоварната индустрия, при преработката на морски, месни и млечни продукти [Mizan et al., 2015; Srey et al., 2013; Farkas et al., 2013].

Развитието и разпространението на бактериите под формата на биофилми в тръбопроводите, нефтените инсталации и други технически съоръжения стои в основата на биокорозията на тези повърхности и произтичащите от това негативни последици и загуби за микробиологичната и нефтената промишленост [Farkas et al., 2013].

От друга страна, формирането на биофилми има своите положителни страни в практиката, свързани с възможностите за разработването на биологични методи за пречистване на отпадъчните води [Andrews et al., 2006; Phuong et al., 2009]. В биотехнологичната индустрия образуването на биофилми обезпечава устойчивостта на бактериалните продуценти към действието на токсичните вещества от състава на културалната среда [Seo et al., 2013]. Образуването на биофилми от бактериите – антагонисти в селскостопанската практика осигурява конкурентната им борба с други микробни видове, чието развитие по селскостопанските култури е свързано с поява на редица заболявания. Някои бактериални видове, населяващи ризосферния слой на селскостопанските култури, като *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azorhizobium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, се развиват до формиране на биофилми в процеса на колонизацията им по повърхността на корените, което определя ролята им на растежни фактори и биоконтролни агенти, което се дължи на секрецията на антимикробни съединения и ензими, растежни регулатори, т.е. тази форма на развитие на микробните видове в ризосферата обезпечава устойчивостта на селскостопанските култури към абиотичен стрес и други неблагоприятни фактори на околната среда [Rathi et al., 2015].

Биофилмите са съобщества от микроорганизми, образуващи се на граничната повърхност между две фази, както и съобщества, прикрепени към една или друга повърхност, заключени в образувания от матрикс [Lopez et al., 2010]. Клетките от структурата на биофилмите се отличават от планктонните (неприкрепени) клетки по по-високата си устойчивост към различни по своята структура и характеристики, механизъм на действие антимикробни средства, по-високата си адаптационна способност към неблагоприятните фактори на околната среда [Lopez et al., 2010; Stanley and Lazazzera, 2004; Morikawa, 2004]. Тяхното формиране се осъществява на различни повърхности, включващи граничната повърхност между твърдото тяло и течната фаза, между въздушната и течната фаза, и могат да включват популациите, развиващи се клетки на един микробен вид, или да представляват съобщества, обхващащи различни микробни видове [Karatan and Watnick, 2009; Davey and O Tool, 2000]. Освен това в състава на биофилмите могат да присъстват в различни съотношения плесени и първаци. Биофилмите, които се образуват с участието на два или повече бактериални вида, са широко разпространени в природата [Moons et al., 2009; Hall-Stoodley et al., 2004].

Физиолого-биохимичните особености на бактериалните видове, скоростта на растеж и гибел на клетките от състава на биофилмите, секрецията и натрупването на продукти на жизнената дейност, механизмите на подвижност и образуването на извънклетъчни полизахариди, белтъци и ДНК оказват влияние върху структурата и характеристиките на биофилмите [Lopez et al., 2010]. Сложната архитектура на биофилмите обезпечава метаболитната кооперация на клетките вътре в пространствено организираните системи, създава условия, благоприятстващи установяването на симбиотични, антагонистични и мутуалистни взаимоотношения между отделните бактериални видове [Karatan and Watnick, 2009]. Вследствие на това в структурата на биофилмите се наблюдават сложни многоклетъчни взаимодействия, което дава основание микробните биофилми да се разглеждат като функционален аналог на многоклетъчен организъм [Burmølle et al., 2014]. Важен етап от развитието на биофилми с участието на шамове на различни видове се по време на адхезията и колонизацията им по различни по своята природа повърхности се явява осъществяването на процеса на ко-агрегация [Sano et al., 2014].

Сведенията за формирането на биофилми от шамове на различни бактериални видове остават оскъдни в съвременната научнотехническа литература, което определя необходимостта процесът да се проучи детайлно с помощта на шамове, чийто генетични характеристики са добре проучени. Първа стъпка към разрешаването на проблема е изследването на ко-агрегацията между клетките на различни микробни видове.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Цел: Да се изследват взаимоотношенията между щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* в процесите на ко-агрегация и образуване на смесени биофилми

За изпълнението на поставената цел са съставени следните **задачи**:

1. Комплексно охарактеризиране на процесите на ко-агрегация между двойките щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* на базата на 2 моделни щамове *Bacillus subtilis* и 6 моделни щамове *Escherichia coli* K-12:

- Изследване на ефекта на рН и температура върху стойността на индекса на ко-агрегация между двойките щамове;

- Изследване на ефекта на хелатобразуващи агенти върху ко-агрегацията между двойките щамове;

- Изследване на ефекта на нейонни детергенти върху ко-агрегацията между двойките щамове;

- Изследване на ефекта на термичното въздействие върху бактериалните клетки върху ко-агрегацията между двойките щамове;

- Изследване на ефекта на протеолитични ензими върху ко-агрегацията между двойките щамове;

2. Проверка на хипотезата за корелация между способността на двойките щамове за ко-агрегация и способността към образуване на смесени биофилми. Избор на двойка щамове за по-нататъшни изследвания

3. Комплексно охарактеризиране на ефекта на фактори на средата върху процесите на образуване на смесени биофилми между двойките щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* на базата на 2 моделни щамове *Bacillus subtilis* и 1 моделен щам *Escherichia coli* K-12:

- Изследване на ефекта на различни среди на култивиране върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на различни концентрации на сеово-казеинов хидролизат върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на различни въглехидратни източници върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на различни концентрации на глюкоза върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на рН върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на температурата на култивиране върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на концентрацията на натриеви йони върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на различни концентрации на фери-йони върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на извънклетъчна протеаза върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на D-аланин върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на секреторни метаболити – стерилни супернатанти на щам *Escherichia coli* K-12 1655, върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях;

- Изследване на ефекта на биосърфактант-съдържащи супернатанти, изолирани щамове *Bacillus subtilis* 170 и 168, върху образуването и микроскопските характеристики на смесените биофилми и структурата на бактериалното съобщество в тях.

4. Влияние на активни метаболити от щамове *Lactobacillus* върху образуването на смесени биофилми от моделните щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* K-12

III. МЕТОДИ

1. Изследване на ко-агрегацията на щамове

1.2.1. Бактериална автоагрегация

1.2.2. Ко-агрегация на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

1.2.3. Проучване на рН на средата върху ко-агрегацията на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

1.2.4. Проучване влиянието на температурата върху ко-агрегацията на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

1.2.5. Определяне на индекса на ко-агрегация при наличие на хелатиращ агент (ЕДТА) и нейонни детергенти (Tween и Triton) върху ко-агрегацията на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

1.2.6. Влияние на ензимната обработка на клетките върху процеса на ко-агрегация на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

1.2.7. Влияние на термичната обработка на клетките върху процеса на ко-агрегация на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

1.2.8. Определяне на инхибиращия ефект на монозахариди върху ко-агрегацията на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

1.2.9. Епифлуоресцентна микроскопия на агрегатите на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

2. Изследване на образуването на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

2.1. Количествено определяне на растежа на биофилмите

2.2. Определяне на пропорциите на живите клетки и спори в биофилмите от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12 по метода на Кох

2.3. Проучване на влиянието на растежната среда и температурата на култивиране върху процеса на образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

2.3.1. Влияние на въглехидратните източници върху образуването на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

2.3.2. Влияние на азотните източници върху образуването на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

2.3.3. Проучване на влиянието на рН на средата върху образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

2.3.4. Проучване на влиянието на температурата на култивиране върху образуването на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

2.3.5. Проучване на съдържанието на натриев хлорид върху процеса на образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

2.3.6. Проучване на съдържанието на фери йони върху процеса на образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

3. Влияние на секреторни метаболити на щамове *B.subtilis* 170, *B.subtilis* 168, *E.coli* K-12 1655 върху процеса на образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

3.1. Проучване на влиянието на протеазата, секретирана от щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168, върху процеса на образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

3.2. Проучване на влиянието на сърфактанта, секретиран от щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168, върху процеса на образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

3.3. Проучване на влиянието на D-аланина върху процеса на образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

3.4. Проучване на влиянието на безклетъчни супернатанти на щамове *E.coli* K-12 1655 върху процеса на образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

4. Проучване на влиянието на безклетъчни супернатанти на щамове *Lactobacillus* върху процеса на образуване на биофилми от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

5. Конфокална лазерносканираща микроскопия на биофилмите от щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

6. Статистическа обработка

IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Проучване на ко-агрегацията на щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

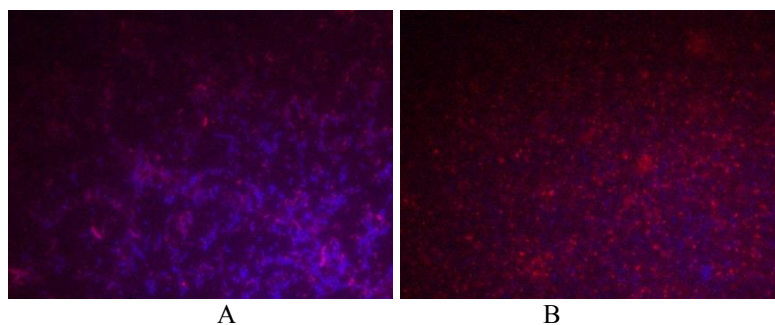
Щамовете *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168, *E.coli* K-12 в настоящето проучване се отличават по автоагрегационната си способност, като с най-висока стойност в индекса на автоагрегация от $54,32 \pm 0,58$ % се характеризира щам *B.subtilis* 170. Тя се доближава по своята стойност до щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 ($p > 0,05$) и се отличава със значително по-висока стойност от други щамове *E.coli* K-12 ($p < 0,05$) (табл.1).

Статистически незначими са разликите в индекса на автоагрегация сред щамовете *E.coli* K-12 406, *E.coli* K-12 446, *E.coli* K-12 420 и *E.coli* K-12 W3110, който се движи в тесния интервал от 41,53 % до 44,95 % ($p > 0,05$). Най-ниска стойност на индекса на агрегация от $41,53 \pm 0,51$ % се наблюдава при щам *Escherichia coli* K-12 W3110. Стойността ѝ нараства незначително до $44,52 \pm 0,06$ % при щам *Escherichia coli* K-12 406 ($p > 0,05$) и $43,97 \pm 0,21$ % при щам *Escherichia coli* K-12 420 ($p > 0,05$). Величината им е по-ниска в сравнение с щамове *Escherichia coli* K-12 1655, *Bacillus subtilis* 170 и *Bacillus subtilis* 168.

Таблица 1. Индекс на автоагрегация и ко-агрегация на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

№	Щам	Индекс на автоагрегация, %	Индекс на коагрегация, %	
			<i>B.subtilis</i> 170	<i>B.subtilis</i> 168
1.	<i>Bacillus subtilis</i> 170	$54,32 \pm 0,58$	-	-
2.	<i>Bacillus subtilis</i> 168	$52,85 \pm 0,26$	-	-
3.	<i>Escherichia coli</i> 1655	$53,94 \pm 0,95$	$77,01 \pm 0,63$	$79,21 \pm 0,72$
4.	<i>Escherichia coli</i> 406	$44,52 \pm 0,06$	$76,10 \pm 0,00$	$79,08 \pm 0,23$
5.	<i>Escherichia coli</i> 446	$44,95 \pm 0,73$	$77,02 \pm 0,08$	$78,50 \pm 0,42$
6.	<i>Escherichia coli</i> 420	$43,97 \pm 0,21$	$73,57 \pm 0,11$	$78,06 \pm 0,61$
7.	<i>Escherichia coli</i> W3110	$41,53 \pm 0,51$	$71,04 \pm 0,60$	$78,86 \pm 0,21$

Индексът на ко-агрегация нараства значително при асоциацията на щамове *E.coli* K-12 с щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168. Най-висока стойност в индекса на ко-агрегация се отчита при двойките щамове *E.coli* K-12 1655 и *B.subtilis* 170, *E.coli* K-12 1655 и *B.subtilis* 168. Стойностите им съставляват съответно $77,01 \pm 0,63$ % и $79,21 \pm 0,72$ % и привишава двукратно размера на индекса на автоагрегация при щамове при щамовете *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168, *E.coli* K-12 ($p < 0,05$). Величината ѝ не отличава значително от стойностите на индекса на ко-агрегация спрямо другите двойки щамове при проведеното изследване ($p > 0,05$). Стойността в индекса на ко-агрегация се колебае в интервала от $71,04 \pm 0,60$ % до $77,01 \pm 0,63$ % при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12, докато интервалът на вариране се движи от $78,06 \pm 0,61$ % до $79,21 \pm 0,72$ % при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12. С помощта на епифлуоресцентна микроскопия са онагледени междуклетъчните контакти в образуваните коагрегати (фиг. 1).



Фигура 1. Епифлуоресцентна микроскопия на агрегати, образувани (А) *Bacillus subtilis* 170 (червено оцветяване) и *Escherichia coli* K-12 1655 (синьо оцветяване), (В) *Bacillus subtilis* 168 (червено оцветяване) и *Escherichia coli* K-12 1655 (синьо оцветяване). Оцветяването е извършено непосредствено след престой в буферен разтвор за ко-агрегация за 4 h с помощта на флуоресцентно багрило, спрегнато с пшеничен аглутинин. Наблюденията бяха извършени на епифлуоресцентен микроскоп с живачна лампа при УВ и син филтър.

2.1.2. Влияние на рН върху ко-агрегацията

Процесът на ко-агрегация при взаимодействието на грам-положителните и грам-отрицателните бактерии се повлиява от рН-стойността на средата, резултатите от които са представени на табл.2 и 3. Процентът на ко-агрегация за изследваните щамове се характеризира с най-високи стойности в киселата и алкална среда както за двойките щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12, така и при двойките щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12. Увеличаването на рН – стойността на средата от рН 6,0 до рН 7,0 се съпътства с незначително снижаване на стойността в индекса на ко-агрегация. Тази закономерност се явява резултат от намаляването на силите на сцепление между бактериалните клетки посредством неутрализацията им от отрицателните йони от състава на клетъчната повърхност в кисела среда, което води да нарастване на биомасата от клетъчни флокули (табл. 2 и 3).

Таблица 2. Индекс на ко-агрегация на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 при различна рН-стойност на буферния разтвор

Щамове	Индекс на ко-агрегация, %			
	рН 5,0	рН 6,0	рН 7,0	рН 8,0
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> H-12 420	65,60±0,50	65,60±0,44	62,65±0,00	65,91±0,50
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 1655	65,05±0,18	62,32±0,19	62,20±0,78	65,27±0,18
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 406	61,64±0,26	58,04±0,34	55,13±0,93	59,93±0,35
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 446	63,41±0,74	60,84±0,17	56,80±0,00	63,01±0,87
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 W3110	61,29±0,78	57,37±0,94	52,09±0,83	60,29±0,83

$y=1,315.x^2-6,577.x+71,02$, $r^2=0,9327$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 170 + *E. coli* K-12 420

$y=1,45.x^2-7,196.x+70,825$, $r^2=0,998$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 170 + *E. coli* K-12 1655

$y=1,85.x^2-9,954.x+69,495$, $r^2=0,952$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 170 + *E. coli* K-12 406

$y=1,445.x^2-7,449.x+69,55$, $r^2=0,959$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 170 + *E. coli* K-12 446

$y=2,03.x^2-10,57.x+69,98$, $r^2=0,977$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 170 + *E. coli* K-12 W3110

Таблица 3. Индекс на ко-агрегация на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 при различна рН-стойност на буферния разтвор

Щам	Индекс на ко-агрегация, %			
	рН 5,0	рН 6,0	рН 7,0	рН 8,0
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 420	62,17±0,34	59,85±0,02	50,43±0,39	62,95±0,03
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 1655	65,86±0,36	64,23±0,98	50,48±0,48	66,32±0,65
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 406	63,68±0,38	61,34±0,11	54,74±0,87	63,68±0,35
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 446	62,70±0,84	59,16±0,62	52,70±0,81	63,96±0,78
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 W3110	58,14±0,92	55,76±0,70	53,62±0,75	58,14±0,81

$y=5,46.x^2-27,308.x+84,42$, $r^2=0,973$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 168 + *E. coli* K-12 420

$y=6,86.x^2-34,575.x+94,15$, $r^2=0,965$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 168 + *E. coli* K-12 1655

$y=1,32.x^2-6,66.x+69,11$, $r^2=0,977$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 168 + *E. coli* K-12 406

$y=2,45.x^2-12,18.x+72,55$, $r^2=0,938$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 168 + *E. coli* K-12 446

$y=1,47.x^2-7,489.x+64,325$, $r^2=0,937$, $p<0,05$ - *B. subtilis* 168 + *E. coli* K-12 W3110

2.1.3. Влияние на температурата върху ко-агрегацията

От друга страна, температурата се явява важен фактор на околната среда, който дава отражение върху степента на коагрегация на клетките на бактериалните видове (табл. 4 и 5). Нарастването на температура от 20 до 37 °C води до значително увеличаване на стойността на индекса на ко-агрегация за всички изпитвани двойки щамове. Средната стойност на процента на клетки на двойките щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12, способни към ко-аграгационни взаимодействия, се движи в диапазона от 59,32±0,78 % до 68,14±0,35 %, който се нараства до стойности от 61,20±0,52 % до 77,56±0,47 % при промяна на температура на средата до 37 °C. Процентът на нарастване на числеността на клетките, вземащи участие в процеса на формиране на флокули от взаимодействието на двойките щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12, съставлява стойности от 5,73 % до 18,04 %. Последващото увеличаване в стойността на температурата не води до съществени изменения в индекса на ко-агрегация или се съпровожда с неговото снижаване за изпитваните култури ($p>0,05$).

2.1.4. Влияние на хелатобразуващите агенти (ЕДТА), нейонните детергенти Tween и Triton върху индекса на ко-агрегация на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

От таблица 6 и 7 се вижда, че с най-голяма инхибиторна активност спрямо процеса на ко-агрегация се отличава Tween, като индексът на ко-агрегация варира в диапазона от 19,12 % до 28,35% при двойкото щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12, докато при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-

12 стойността му се колебае в границата от 22,26 % до 29,84 %. По-ниска е степента на редукция на ко-агрегацията между изследваните щамове под въздействие на Triton, следвана от ЕДТА. Средната стойност на индекса на ко-агрегация съставлява $57,20 \pm 0,21$ % и $58,94 \pm 0,42$ % за двойките щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 при наличие на Triton, което е незначително по-ниско спрямо контролната проба (отсъствие на инхибитор) и по-високо в сравнение с въздействието на ЕДТА. Сходна закономерност се установява и при двойките щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 при проведеното проучване.

Таблица 4. Индекс на ко-агрегация на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 при различна температура на пробите

Щамове	Индекс на ко-агрегация, %		
	20 °C	37 °C	45 °C
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 420	67,57 $\pm$ 0,19	70,80 $\pm$ 0,11	66,18 $\pm$ 0,84
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 1655	68,14 $\pm$ 0,35	77,56 $\pm$ 0,47	63,53 $\pm$ 0,15
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 406	57,13 $\pm$ 0,14	65,42 $\pm$ 0,04	63,58 $\pm$ 0,12
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 446	67,40 $\pm$ 0,59	72,38 $\pm$ 0,13	61,54 $\pm$ 0,15
<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> K-12 W3110	59,32 $\pm$ 0,78	61,20 $\pm$ 0,52	57,14 $\pm$ 0,08

$$y = -3,925.x^2 + 15,005.x + 56,49, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 170 + E. coli K-12 420$$

$$y = -11,725.x^2 + 44,595.x + 35,27, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 170 + E. coli K-12 1655$$

$$y = -5,065.x^2 + 23,485.x + 38,71, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 170 + E. coli K-12 406$$

$$y = -7,91.x^2 + 28,71.x + 46,6, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 170 + E. coli K-12 446$$

$$y = -2,97.x^2 + 10,79.x + 51,5, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 170 + E. coli K-12 W3110$$

Таблица 5. Индекс на ко-агрегация на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 при различна температура на пробите

Щамове	Индекс на ко-агрегация, %		
	20 °C	37 °C	40 °C
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 420	50,46 $\pm$ 0,73	61,57 $\pm$ 0,23	59,14 $\pm$ 0,05
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 1655	67,07 $\pm$ 0,42	76,10 $\pm$ 0,32	69,86 $\pm$ 0,69
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 406	57,06 $\pm$ 0,34	60,53 $\pm$ 0,38	51,46 $\pm$ 0,85
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 446	57,63 $\pm$ 0,76	67,27 $\pm$ 0,49	56,91 $\pm$ 0,81
<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> K-12 W3110	53,99 $\pm$ 0,16	59,19 $\pm$ 0,63	55,08 $\pm$ 0,56

$$y = -6,77.x^2 + 31,42.x + 25,81, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 168 + E. coli K-12 420$$

$$y = -7,635.x^2 + 31,935.x + 42,77, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 168 + E. coli K-12 1655$$

$$y = -6,25.x^2 + 22,28.x + 41,05, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 168 + E. coli K-12 406$$

$$y = -10.x^2 + 39,64.x + 27,99, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 168 + E. coli K-12 446$$

$$y = -4,655.x^2 + 19,165.x + 39,48, r^2 = 1, p < 0,05 - B. subtilis 168 + E. coli K-12 W3110$$

Таблица 6. Индекс на ко-агрегация между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 при наличие на ЕДТА, Tween и Triton

№	Щам	Индекс на ко-агрегация, %			
		Контрола	ЕДТА	Tween	Triton
1.	<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> 1655	77,01 $\pm$ 0,63	69,55 $\pm$ 0,75	57,05 $\pm$ 0,42	58,88 $\pm$ 0,21
2.	<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> 420	76,10 $\pm$ 0,00	62,37 $\pm$ 0,42	59,06 $\pm$ 0,21	58,94 $\pm$ 0,42
3.	<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> 446	77,82 $\pm$ 0,08	65,76 $\pm$ 0,13	55,76 $\pm$ 0,17	56,30 $\pm$ 0,39
4.	<i>B. subtilis</i> 170+ <i>E. coli</i> 406	73,57 $\pm$ 0,11	64,98 $\pm$ 0,27	59,49 $\pm$ 0,91	61,89 $\pm$ 0,33
5.	<i>B. subtilis</i> 170 + <i>E. coli</i> W3110	71,04 $\pm$ 0,60	58,92 $\pm$ 0,71	56,19 $\pm$ 0,23	57,20 $\pm$ 0,21

Таблица 7. Индекс на ко-агрегация между щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 при наличие на ЕДТА, Tween и Triton

№	Щам	Индекс на ко-агрегация, %			
		Контрола	ЕДТА	Tween	Triton
1.	<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> 1655	79,21 $\pm$ 0,72	70,68 $\pm$ 0,28	55,84 $\pm$ 0,87	62,06 $\pm$ 0,49
2.	<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> 420	79,48 $\pm$ 0,23	70,18 $\pm$ 0,32	55,76 $\pm$ 0,49	63,46 $\pm$ 0,48
3.	<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> 446	78,50 $\pm$ 0,42	69,62 $\pm$ 0,43	61,03 $\pm$ 0,79	64,35 $\pm$ 0,50
4.	<i>B. subtilis</i> 168+ <i>E. coli</i> 406	78,06 $\pm$ 0,61	70,53 $\pm$ 0,30	60,11 $\pm$ 0,41	64,87 $\pm$ 0,36
5.	<i>B. subtilis</i> 168 + <i>E. coli</i> W3110	78,86 $\pm$ 0,21	71,33 $\pm$ 0,41	58,81 $\pm$ 0,40	66,42 $\pm$ 0,95

2.1.5. Ефект на термичното въздействие, протеиназа К и трипсин върху върху индекса на ко-агрегация на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

Термичната толерантност на флокулите, образувани между щамове на вида *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12, както и между двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 са представени в табл. 8 и 9. С най-висока устойчивост на термичното въздействие до 80 °C за 15 мин. се отличават двойките щамове *B.subtilis* 170+*E.coli* K-12 1655, и *B.subtilis* 168+*E.coli* K-12 1655, следвани от двойките *B.subtilis* 170+*E.coli* K-12 406, *B.subtilis* 168+*E.coli* K-12 406. Сnižаването в стойността на индекса на ко-агрегация между двойката щамове на вида *B. subtilis* и *E. coli* в настоящето проучване е по-силно изразено при въздействието на клетките с протеиназа К в сравнение с трипсин (табл. 8 и табл. 9). Степента на редукция на флокулиралите клетки под влиянието на протеиназа К съставлява стойност от 12 % за двойките щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 и 11,5 % при двойките щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12. Влиянието на трипсина е по-слабо изразено, като стойностите на индекса на ко-агрегация се доближават до контролните проби, отличаващи се с отсъствие на инхибитор в буферния разтвор ($p>0,05$).

Таблица 8. Индекс на ко-агрегация между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 след термична обработка до 80 °C, въздействие с трипсин и протеиназа К

Щамове	Индекс на ко-агрегация, %			
	контрола	Термично въздействие	Трипсин	Протеиназа К
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 420	73,99±0,18	71,19±0,65	71,32±0,15	62,69±0,39
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 1655	74,30±0,90	72,85±0,80	70,92±0,09	58,78±0,81
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 446	70,55±0,13	68,66±0,45	71,57±0,45	69,36±0,52
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 406	72,53±0,50	71,24±0,37	63,40±0,66	59,11±0,97
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 W3110	70,92±0,88	70,55±0,32	68,56±0,47	63,55±0,55

Таблица 9. Индекс на ко-агрегация между щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 след термична обработка до 80 °C, въздействие с трипсин и протеиназа К

Щамове	Индекс на ко-агрегация, %			
	контрола	Термично въздействие	Трипсин	Протеиназа К
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 420	73,99±0,18	71,19±0,65	71,32±0,15	62,69±0,39
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 1655	74,30±0,90	72,85±0,80	70,92±0,09	58,78±0,81
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 446	70,55±0,13	68,66±0,45	71,57±0,45	69,36±0,52
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 406	72,53±0,50	71,24±0,37	63,40±0,66	59,11±0,97
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 W3110	70,92±0,88	70,55±0,32	68,56±0,47	63,55±0,55

2.1.6.. Влияние на монозахаридите върху процеса на ко-агрегация на щамове на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12

В значителна степен процесът на ко-агрегация между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12, както *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 в настоящето проучване се инхибира при наличие на N-ацетилглюкозамин. Инхибиторният ефект на N-ацетилгалактозамина варира в диапазона от 8,28 до 9,58 %. Метилманозидът проявява незначителна инхибиторна активност върху степента на ко-агрегация между изпитваната двойка щамове, където се отчитат средни стойности в индекса на ко-агрегация от 2,66 % за двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 и 1,63 % за изследваната двойка *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12. Получените резултати свидетелстват за обстоятелството, че процесът на ко-агрегация между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 се явява резултат от лектин-полизахаридни взаимодействия (табл. 10 и табл. 11).

Таблица 10. Индекс на коагрегация между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 при наличие на N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин и метилманозид

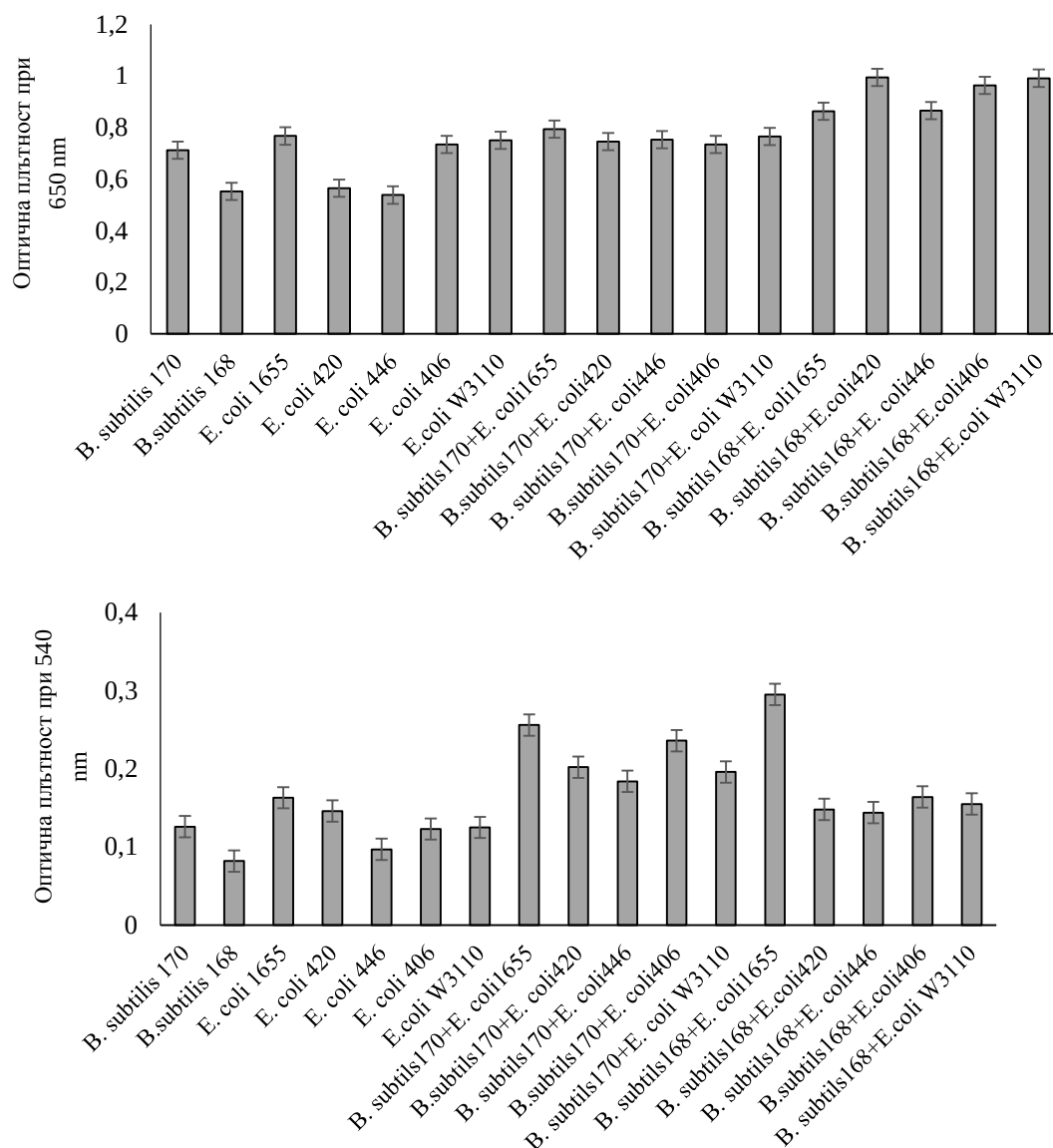
Щамове	Индекс на ко-агрегация, %			
	контрола	N-ацетилгалактозамин	N-ацетилглюкозамин	Метилманозид
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 420	73,99±0,18	66,89±0,36	65,40±0,66	71,88±0,71
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 1655	74,30±0,90	64,63±0,90	66,42±0,16	72,31±0,37
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 446	70,55±0,13	68,59±0,63	65,93±0,96	69,01±0,14
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 406	72,53±0,50	66,52±0,91	68,86±0,45	70,95±0,86
<i>B.subtilis</i> 168+ <i>E.coli</i> K-12 W3110	70,92±0,88	57,92±0,23	62,84±0,22	68,63±0,13

Таблица 11. Индекс на коагрегация между щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 при наличие на N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин и метилманозид

Щамове	Индекс на ко-агрегация, %			
	контрола	N-ацетилгалактозамин	N-ацетилглюкозамин	Метилманозид
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 420	70,55±0,13	67,28±0,21	68,03±0,21	65,49±0,77
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 1655	74,30±0,93	64,63±0,90	65,39±0,51	66,01±0,84
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 446	70,55±0,12	67,28±0,21	68,03±0,21	65,49±0,77
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 406	73,99±0,18	66,89±0,36	72,28±0,38	67,85±0,46
<i>B.subtilis</i> 170+ <i>E.coli</i> K-12 W3110	70,92±0,18	65,79±0,60	68,48±0,92	59,79±0,86

2. Биофилмобразуване при щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

Способността към биофилмобразуване е характерна за щамовете *Bacillus subtilis* 170, *Bacillus subtilis* 168 в процеса на взаимодействието им с щамове *Escherichia coli* K-12 (фиг. 2 А и В). Най-висок прираст в биомасата на образуваните биофилми се установява при двойката щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 и консорциума, включващ щамовете *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655. Стойностите на оптичната плътност при 540 nm са съответно $0,256 \pm 0,002$ и $0,295 \pm 0,003$, които провишават двукратно стойностите им при биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 ($0,126 \pm 0,002$) и *Bacillus subtilis* 168 ($0,182 \pm 0,002$), както и при щам *Escherichia coli* 1655 ($0,163 \pm 0,002$) ($p < 0,05$). Прирастът на биомасата на биофилмите от щамове *Escherichia coli* K-12 се движи в широк диапазон от $0,097 \pm 0,002$ до $0,163 \pm 0,002$, като съвместното му култивиране с щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Bacillus subtilis* 168 води да статистическо значимо нарастване на оптичната плътност при 540 nm след оцветяване с кристал виолет в границата от $0,184 \pm 0,000$ до $0,256 \pm 0,002$ при взаимодействието му с щам *Bacillus subtilis* 170, както и в пределите от $0,144 \pm 0,002$ до $0,196 \pm 0,002$ в процеса на съвместното му култивиране с щам *Bacillus subtilis* 168 при проведеното статично култивиране на биофилмите ($p < 0,05$).



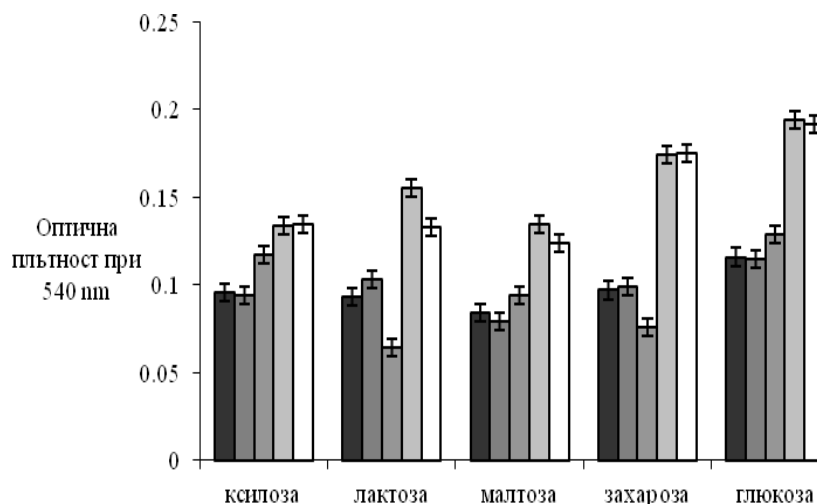
Фигура 2. Общ растеж (А) и биофилми (В) при шамове *Bacillus subtilis* 170, *Bacillus subtilis* 168 в процеса на взаимодействието им с шамове *Escherichia coli* K-12. Растежът на биофилмите е осъществен в среда LB бульон в 96-ямкови плаки за време от 24 h при температура от 20 °C. Оптичната плътност е измернена при 650 nm за отчитане на общия растеж и 540 nm след оцветяване на биофилмите с 0,1 % кристал виолет. Общият растеж е измерен при 650 nm преди оцветяване на биофилмите с 0,1 % кристал виолет.

2.1.1. Влияние на вида на въглехидратните източници в средата за култивиране върху биофилмобразуването от шамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

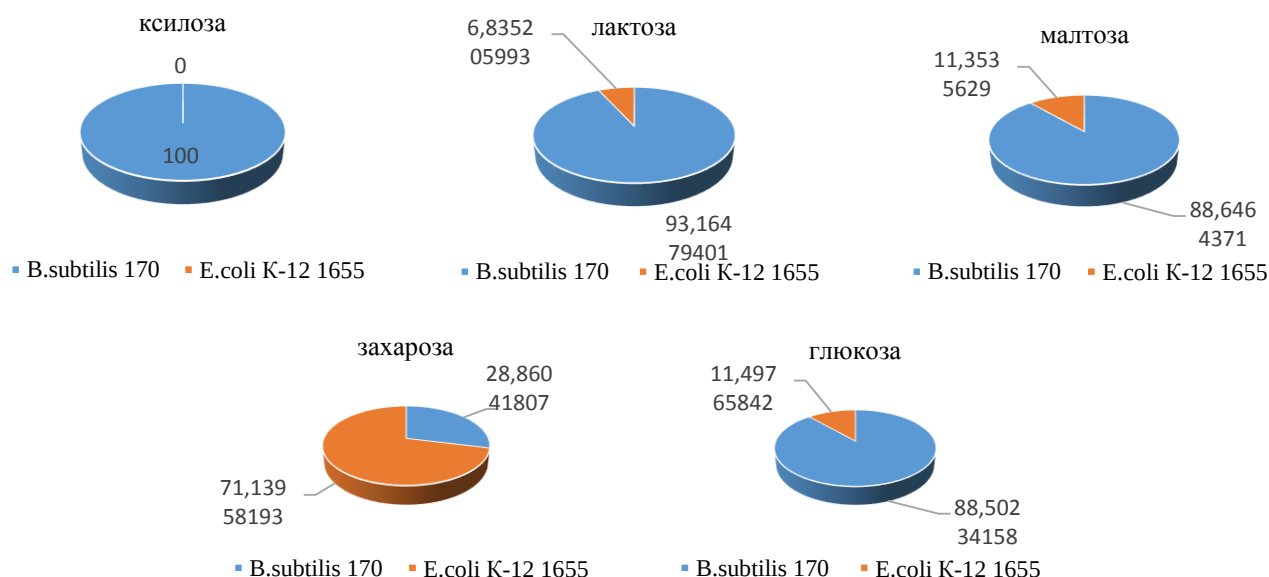
Взаимоотношения на антагонизъм и конкуренция между шамовите *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 (фиг.4 и 5) се установяват в структурата на биофилмите при наличие в средата на ксилоза, лактоза, малтоза, захароза и глюкоза. При това най-висока стойност в оптичната плътност при 540 nm от $0,194 \pm 0,001$ се постига при съвместното култивиране на шамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 в среда, съдържаща като единствен въглехидратен източник глюкоза в концентрация от 0,04 M (фиг. 3). Стойността ѝ за двойката шамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при същите условия на култивиране е $0,192 \pm 0,002$, която превишава размера им при съответните моновидови биофилми.

Култивирането на изследваната двойка шамове в среда, съдържаща ксилоза като единствен въглехидратен източник, създава условия за появата на биофилми, чиято структура се формира само от популации на шам *B. subtilis* 170 и шам *B. subtilis* 168 в процеса на тяхното съвместно статично култивиране с шам *E. coli* K-12 1655. Присъствието на лактоза, глюкоза и малтоза обуславя доминатната роля на шамовите *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 при образуването на биофилмите, което се потвърждава от по-високия относителен дял на тяхната популация в сравнение с шамове *E. coli* K-

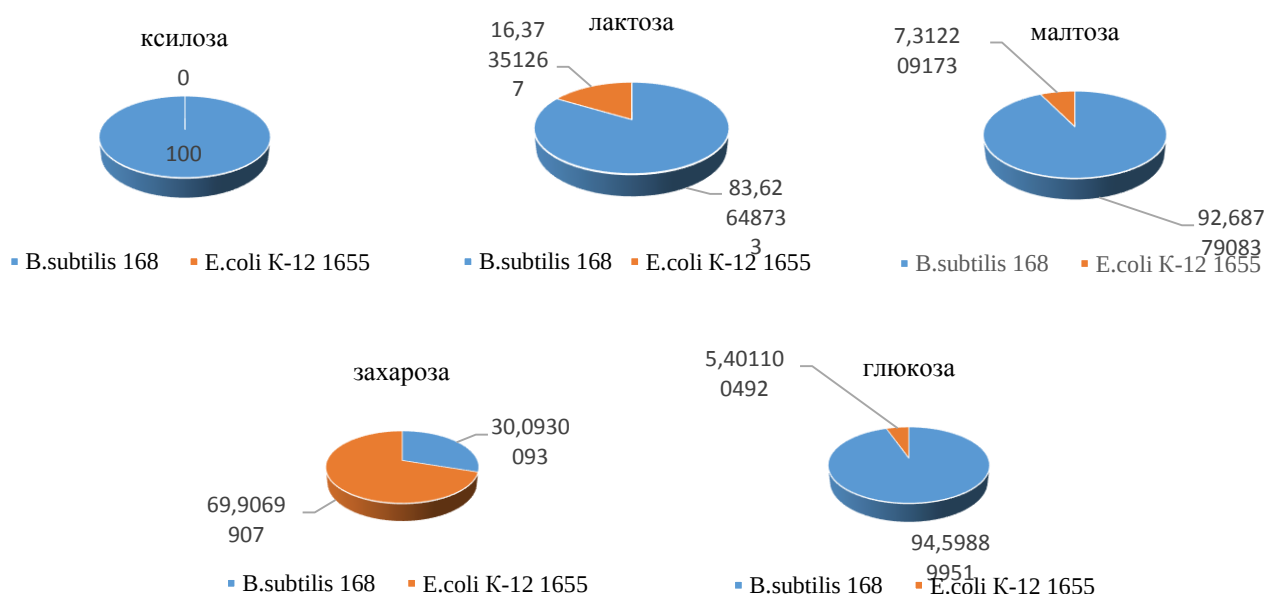
12 1655 в образуваните структури при проведеното проучване. Числеността на колонии образуващите единици в структурата на смесените биофилми съставлява 88, 50 % от общия им брой за щам *B. subtilis* 170 и 94,60 % за щам *B. subtilis* 168, които превишават стойностите при щам *E. coli* K-12 1655 ($p < 0,05$), представляващи 5,4 % и 11,49 % от общата микробна популация. Относителният дял на популацията на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 се доближава по своята величина до показателите им при наличие малтоза и лактоза ($p > 0,05$), докато за щам *E. coli* K-12 1655 тези стойности са съответно 11,35 % и 6,83 % в процеса на асоциацията му с щам *B. subtilis* 170. При съвместното статично култивиране на двойките щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 също се наблюдава нисък относителен дял на популацията на щам *E. coli* K-12 1655 от общата ѝ численост в структурата на смесените биофилми при замяната на глюкоза с малтоза и лактоза в средата за култивиране на биофилмите. Популацията на щамове *E. coli* K-12 1655 доминира в структурата на биофилмите при включването на захароза в концентрация от 0,04 М в средата за култивиране, като превишава приблизително два пъти стойностите на относителния дял на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 (фиг. 4 и 5).



Фигура 3. Влияние на съдържанието на различни въглехидрати в средата в прираста на биомасата на биофилмите от щамове *B. subtilis* 170, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655. Растежът на биофилмите е осъществен в среда М63, съдържаща различни въглехидратни източници в концентрация от 0,04 М, в 96-ямкови плаки за време от 24 h при температура от 20 °C. Оптичната плътност е измерена при 540 nm след оцветяване на биофилмите с 0,1 % кристал виолет. ■ *B. subtilis* 170; ■ *B. subtilis* 168; ■ *E. coli* 1655; ■ *B. subtilis* 170 + *E. coli* 1655



Фигура 4. Структура на микробното съобщество в смесените биофилми на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 в зависимост от вида на въглехидратния източник в средата за култивиране



Фигура 5. Структура на микробното съобщество в смесените биофилми на двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 в зависимост от вида на въглехидратния източник в средата за култивиране

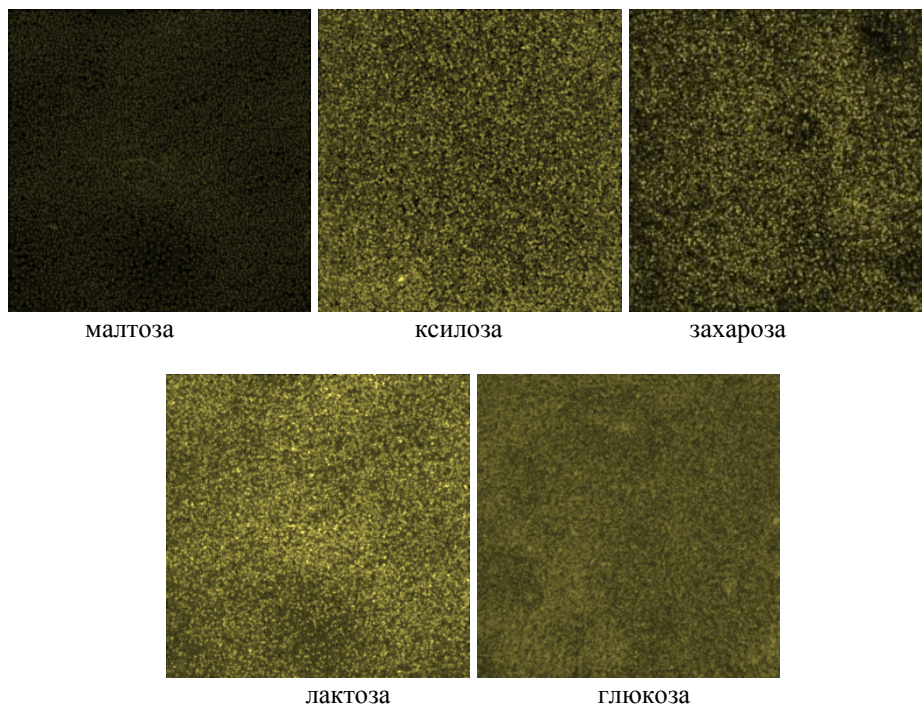
С най-силно индуциращ ефект върху процеса на образуването на спори в структурата на биофилмите, образувани при съвместното развитие на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* 1655, се отличава глюкозата, като числеността на спорите достига съответно до $(6,0 \pm 0,57) \cdot 10^3$ cfu/ml и $(5,0 \pm 0,00) \cdot 10^3$ cfu/ml и трикратно е по-ниска спрямо стойността им при моновидовите биофилми, образувани от щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 ($p < 0,05$). Сходна зависимост се наблюдава при замяната ѝ със захароза, но като цяло числеността на спорите при тези условия на култивиране статистически не се отличава при съдържание на глюкоза в средата за култивиране на биофилмите ($p < 0,05$). Присъствието на малтоза в средата за култивиране не индуцира спорообразуване в структурата на биофилмите при щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* 1655, докато числеността им при биофилмите на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* 1655 достига до стойност от $(2,66 \pm 0,5) \cdot 10^3$ cfu/ml, която нараства до численост от $(10 \pm 0,1) \cdot 10^3$ cfu/ml при моновидовите биофилми на щам *B. subtilis* 168 ($p < 0,05$). Липса на статистически значими разлики в числеността на спорите в структурата на биофилмите от съвместното развитие на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 и броя им в моновидовите биофилми се забелязва при наличието на ксилоза и лактоза в средата в концентрация от 0,04 M ($p > 0,05$) (табл. 12).

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

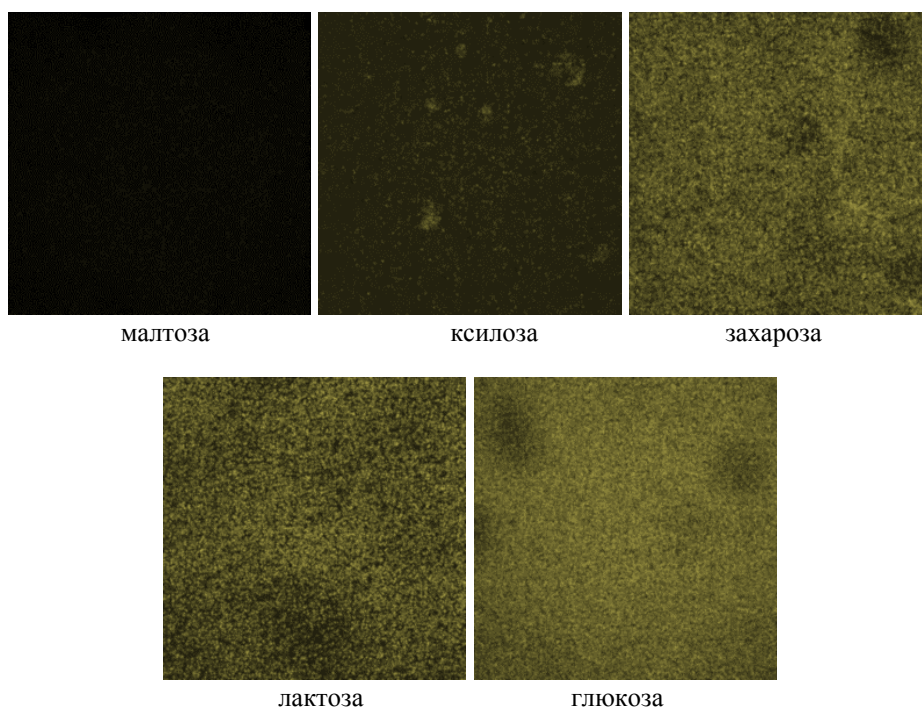
№	Вид на въглехидратния източник /100 mM/	Численост в биофилмите на <i>B.subtilis</i> 170 cfu/ml	Численост в биофилмите на <i>B.subtilis</i> 168 cfu/ml	Численост в смесените биофилми cfu/ml	
				<i>B.subtilis</i> 170 + <i>E.coli</i> 1655	<i>B.subtilis</i> 168 + <i>E.coli</i> 1655
1.	Малтоза	$(6,66 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(10 \pm 0,1) \cdot 10^3$	0	$(2,66 \pm 0,5) \cdot 10^3$
2.	Ксилоза	$(2 \pm 0,05) \cdot 10^3$	$(4 \pm 0,02) \cdot 10^3$	$(1 \pm 0,57) \cdot 10^3$	$(3 \pm 0,30) \cdot 10^3$
3.	Захароза	$(10,3 \pm 0,58) \cdot 10^3$	$(10 \pm 0,06) \cdot 10^3$	$(5,6 \pm 0,57) \cdot 10^3$	$(6,0 \pm 0,07) \cdot 10^3$
4.	Лактоза	$(5,0 \pm 0,07) \cdot 10^3$	$(4,0 \pm 0,06) \cdot 10^3$	0	$(3,66 \pm 0,5) \cdot 10^3$
5.	Глюкоза	$(28,33 \pm 0,11) \cdot 10^3$	$(26,33 \pm 0,57) \cdot 10^3$	$(6,0 \pm 0,57) \cdot 10^3$	$(5,0 \pm 0,00) \cdot 10^3$

Относителната площ на разпространение варира в широк интервал при биофилмите, образувани в резултат от взаимодействието на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 в зависимост от природата на захарите, влизащи в състава на средата за култивиране при проведеното проучване ($p < 0,05$). Максимална стойност се установява при наличие на глюкоза, която съставлява $0,99 \mu\text{m}^2$ при щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 (фиг. 6 и 7) и $0,99 \mu\text{m}^2$ за

двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* К-12 1655 (фиг.6 и 7) и значително се снижава при замяната ѝ с малтоза, ксилоза, захароза и лактоза ($p < 0,05$). Стойността ѝ при останалите въглехидрати при концентрация от 0,04 М в средата за култивиране се колебае в тесен предел ($p > 0,05$) и статистически не се отличава от глюкозата ($p > 0,05$) (фиг.6 и 7).



Фигура 6. Микроскопско изследване на биофилмите на шамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни въглехидратни източници на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C



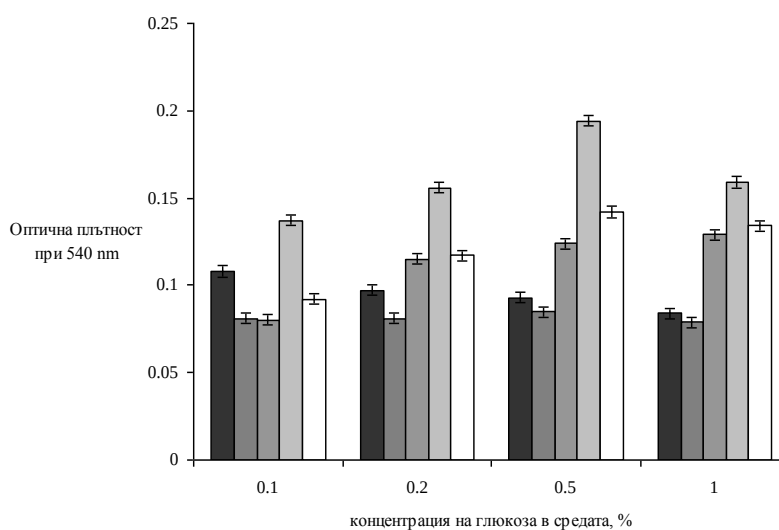
Фигура 7. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни въглехидратни източници на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.

2.1.2. Влияние на концентрацията на глюкоза в средата за култивиране върху биофилмобразуването от щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

Промяната в съдържанието на глюкоза в диапазона от 0,1 до 0,5 % в средата за култивиране на биофилма води до повишаването на стойността на оптичната плътност до $0,194 \pm 0,001$ за двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* 1655 и $0,142 \pm 0,002$ при двойката *B. subtilis* 168 и *E. coli* 1655, което превишава статистически значимо величината ѝ при моновидовите биофилми от щамове *B. subtilis* 170 ($p < 0,05$) и *B. subtilis* 168 ($p < 0,05$) и не се отличава значително от моновидовите биофилми на *E. coli* K-12 1655 ($p > 0,05$) (фиг. 8).

Нарастването на съдържанието в диапазона от 0,5 до 1,0 % се съпътства в настоящето проучване със статистически незначимо намаляване на прираста на биомасата на биофилмите, формирани при съвместното култивиране на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 от 0,194 до 0,159 ($p > 0,05$), така и при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 ($p > 0,05$). При това зависимостта между концентрацията на глюкоза и прираста на биомасата на биофилма при изследваната двойка щамове има линеен характер ($r^2 = 0,96$), който се отличава по своя характер при моновидовите биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168, чиято биомаса на биофилмите се снижава правопропорционално на нарастването на концентрацията на глюкозата в границата от 0,1 до 1,0 % ($r^2 = 0,97$), докато при същите условия на култивиране се установява статистически незначимо нарастване в стойността на оптичната плътност при 540 nm за моновидовите биофилми на щам *E. coli* K-12 1655 ($r^2 = 0,96$) (фиг. 8).

В хода на проучването се установява преобладаващата численост на популациите от щамове *B. subtilis* 170 от 82,01 % от общата численост на колонии образувачите единици и на щамове *B. subtilis* 168 от 86,17 % от общата численост на колонии образувачите единици в структурата на биофилмите при асоциацията им с щамове *E. coli* K-12 1655 при съдържание на глюкоза в средата до 0,2 %. Нарастването на стойността ѝ до 1,0 % се съпътства със значително снижаване на относителния дял на щам *B. subtilis* 170 в структурата на микробното съобщество на биофилмите за сметка на нарастването на числеността на популациите на щам *E. coli* K-12 1655, които достигат до стойност от 63,97 % от общата численост на колонии образувачите единици в структурата на биофилмите. Взаимодействието на щам *E. coli* K-12 1655 с щам *B. subtilis* 168 в процеса на формиране на биофилми води до нарастване на относителния им дял от общата численост на микробната популация на образувачите биофилми от 17,98 % до 63,97 % при промяна на съдържанието на глюкоза в границата от 0,1 % до 1,0 % в средата за култивиране. Сходна закономерност се установява при проведеното проучване по взаимодействието на другата двойка щамове, като числеността на колонии образувачите единици на щам *E. coli* K-12 1655 съставлява 86,94 % от общата популация на смесените биофилми при достигане на концентрацията на глюкоза от 1,0 % при асоциацията му с щам *B. subtilis* 168, чийто относителен дял в микробната популация представлява 13,05 % (фиг. 9 и 10).



Фигура 8. Влияние на концентрацията на глюкоза 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 глюкоза. Оптичната плътност е измерена при 540 nm след оцветяване на биофилмите с 0,1 % кристал виолет.

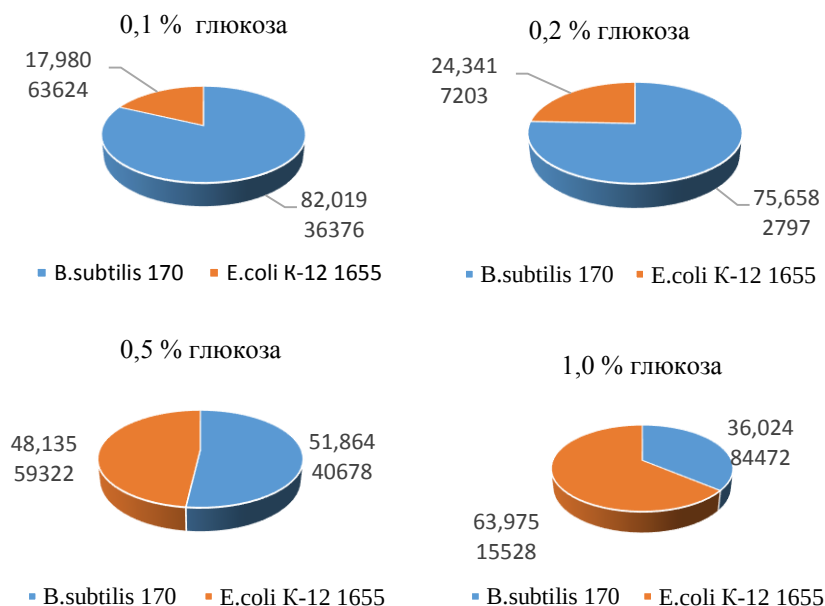
$y = -0,0076.x + 0,1142$, $r^2 = 0,972$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 170

$y = -0,0078.x + 0,2412$, $r^2 = 0,951$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 168

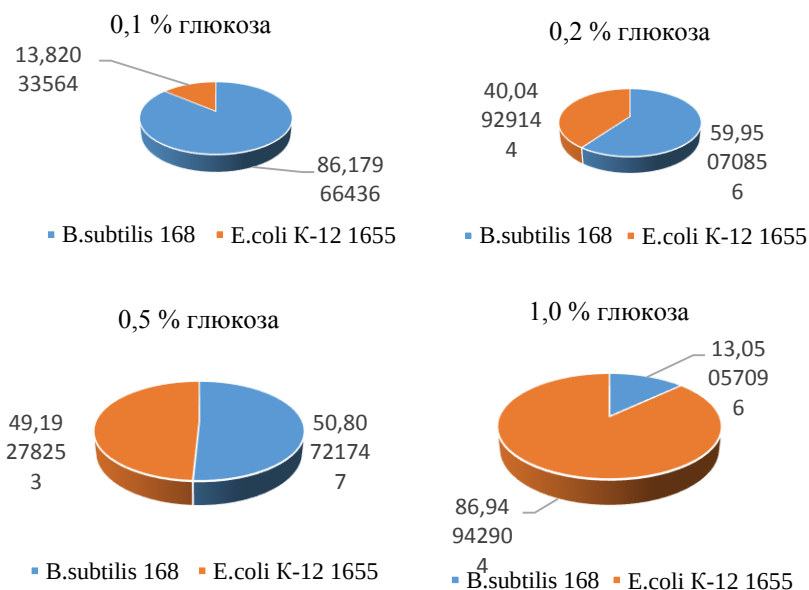
$y = -0,0016.x + 0,0730$, $r^2 = 0,930$, $p < 0,05$ - *E.coli* K-12 1655

$y = -0,1134.x + 0,1739$, $r^2 = 0,979$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 170-*E.coli* K-12 1655

$y = -0,0746.x + 0,2179$, $r^2 = 0,962$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 168-*E.coli* K-12 1655



Фигура 9. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 при различно съдържание на глюкоза в средата за култивиране.



Фигура 10. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при различно съдържание на глюкоза в средата за култивиране.

Развитието на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 при концентрация на глюкоза в средата в границата от 0,1 % до 0,2 % създава условия за появата на спори в структурата на биофилмите, като съответната максимална стойност от $0,6 \cdot 10^3 \text{ cfu/ml}$ и $0,3 \cdot 10^3 \text{ cfu/ml}$ се установява при ниско съдържание на глюкоза от 0,1 %, докато при концентрацията от 0,5 % не се забелязва наличие на спори в образуваните структури (табл. 13). Съвместното им развитие с щамове *E.coli* K-121655 благоприятства спорообразователния процес в биофилмите при съдържание на глюкоза от 0,5 %, като зависимостта на съдържанието на спори от концентрацията на глюкоза в предела от 0,1 до 0,5 % има експоненциален

характер за изследваната двойка щамове, нарастването на стойността ѝ до 1,0 % не създава условия за спорообразуване както в структурата на биофилмите от *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, така и при съвместното култивиране на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 до образуване на биофилми в настоящето проучване. Числеността на спорите при проведеното изследване достига до $2,7 \cdot 10^3$ cfu/ml в структурите на биофилмите, образувани от съвместното култивиране на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, и $2,9 \cdot 10^3$ cfu/ml в биофилмите от щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 (табл.13).

Таблица 13. Влияние на концентрацията на глюкоза в средата върху числеността на спорите в структурата на смесените биофилми на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655

№	Концентрация на глюкозата, % /	Численост в биофилмите на <i>B.subtilis</i> 170 cfu/ml	Численост в биофилмите на <i>B.subtilis</i> 168 cfu/ml	Численост в смесените биофилми cfu/ml	
				<i>B.subtilis</i> 170 + <i>E.coli</i> 1655	<i>B.subtilis</i> 168 + <i>E.coli</i> 1655
1.	0,1	$(6,66 \pm 0,5) \cdot 10^3$	$(10 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(2,54 \pm 0,47) \cdot 10^3$	$(2,66 \pm 0,5) \cdot 10^3$
2.	0,2	$(2 \pm 0,05) \cdot 10^2$	$(4 \pm 0,02) \cdot 10^2$	$(3,1 \pm 0,57) \cdot 10^3$	$(3 \pm 0,30) \cdot 10^3$
3.	0,5	0	0	$(5,6 \pm 0,57) \cdot 10^3$	$(6,0 \pm 0,07) \cdot 10^3$
4.	1,0	0	0	0	0

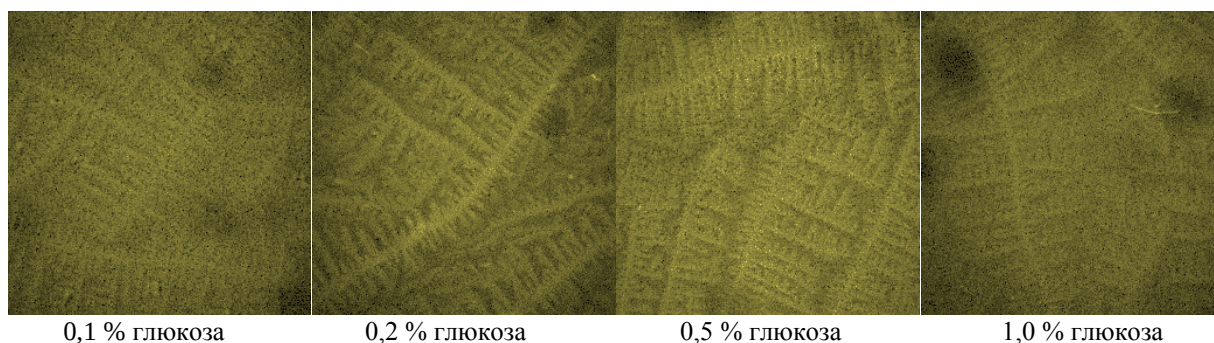
$y = -3,3 \cdot x + 9,4467$, $r^2 = 0,9508$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 170

$y = -5 \cdot x + 14,667$, $r^2 = 0,9868$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 168

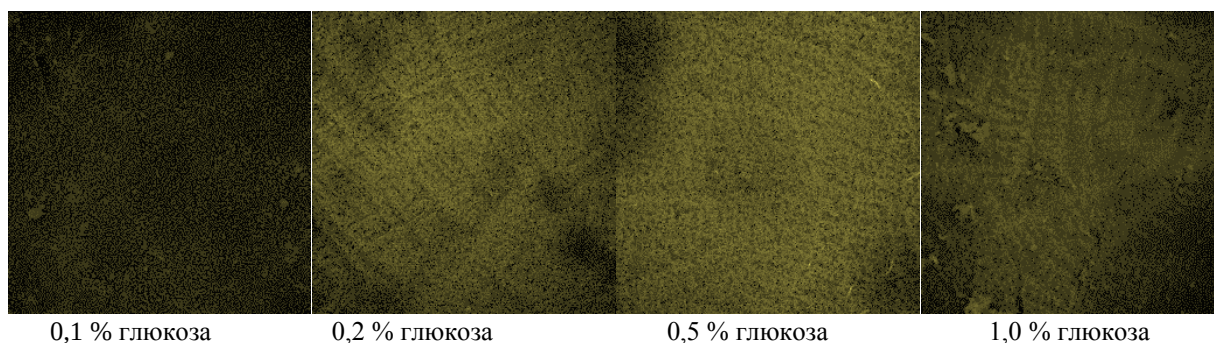
$y = -1,79 \cdot x^2 + 8,338 \cdot x - 4,36$, $r^2 = 0,9557$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 170-*E.coli* K-12 1655

$y = -2,085 \cdot x^2 + 9,727 \cdot x - 5,526$, $r^2 = 0,9252$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 168-*E.coli* K-12 1655

Относителната площ на разпространение на биофилмите достига максимална стойност от $0,99 \mu\text{m}^2$ за двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и $0,99 \mu\text{m}^2$ в резултат на съвместното култивиране на двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при концентрация на глюкоза в средата култивиране от 0,5 %, която значително превишава стойността им при снижаване на стойността ѝ до 0,1 % ($p < 0,05$) и статистически не се изменя при нарастването ѝ до 1,0 % ($p > 0,05$) (фиг 11 и 12).



Фигура 11. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различно съдържание на глюкоза в средата за култивиране. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



Фигура 12. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различно съдържание на глюкоза в средата за култивиране. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.

2.1.3. Влияние на вида на азотните източници в средата за култивиране върху биофилмобразуването от щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

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.

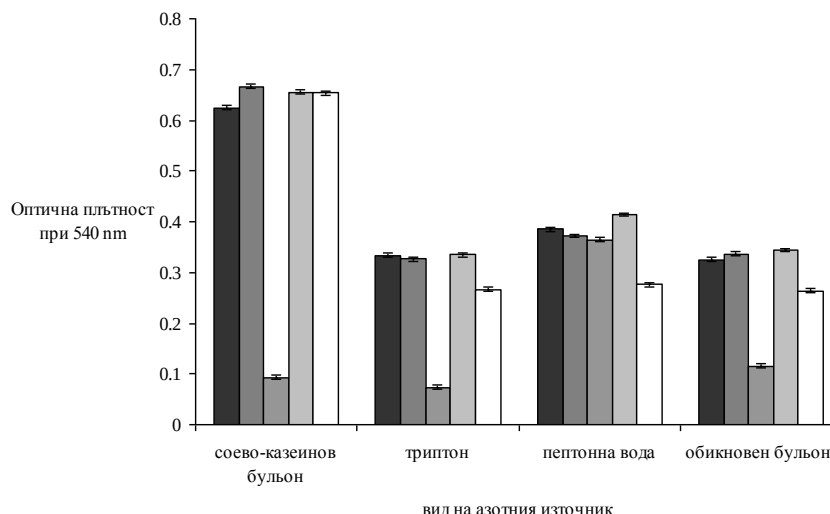
Най-голям относителен прираст в биомасата на биофилмите от $0,655 \pm 0,004$ за двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* 1655 и $0,654 \pm 0,003$ при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* 1655 се постига при култивирането им в среда, съдържаща в качеството на азотен източник соево-казеинов хидролизат (соево-казеинов булн) (Фиг.13). 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 среда, съдържаща като азотен източник триптон (триптон) и пептон (пептонна вода). 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 пептон 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 превишават 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 ($p < 0,05$).

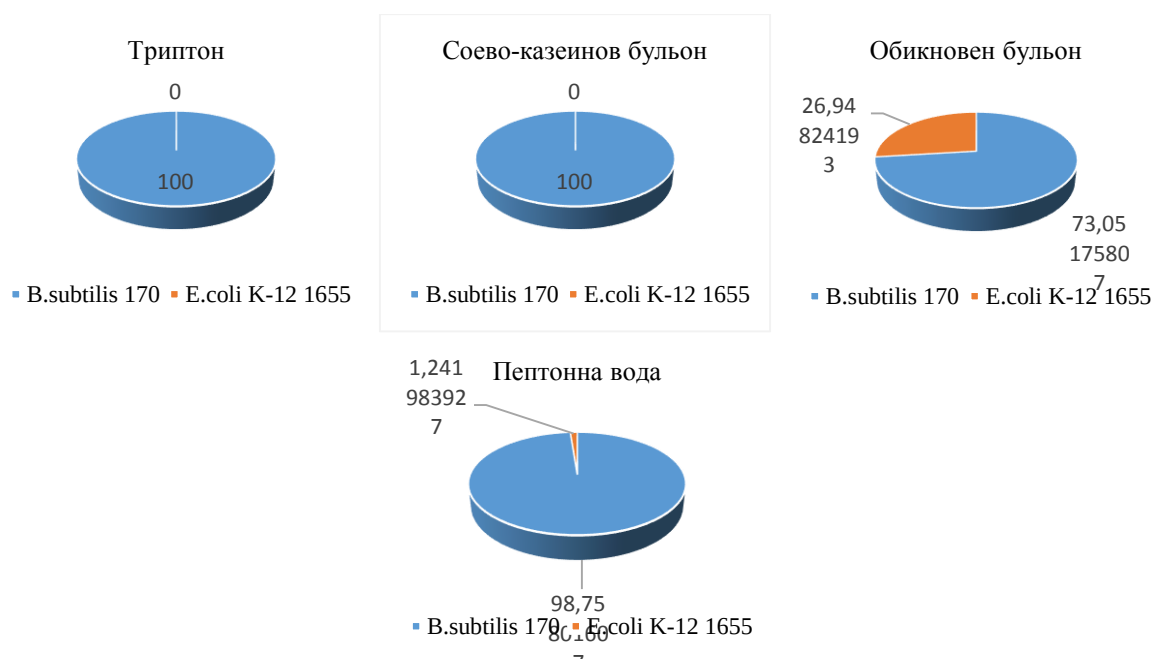
Съдържанието на соево-казеинов хидролизат, пептон и триптон обезпечава антагонистичната активност на щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168 при взаимодействието им с щам *E.coli* K-12 1655 по време на образуването на биофилми. Статичното култивиране на изследваните двойки щамове в среда на основата на соево-казеинов бульон води до формиране на биофилми, чиято популация се съставлява само от клетки на щам *B.subtilis* 170 и щам *B.subtilis* 168 при проведеното проучване. Култивирането в обикновен бульон (казеин) 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 относителен дял от общата численост на популациите съответно от 82,20 % 73,05 % в структурата на биофилмите при асоциацията им с щам *E.coli* K-12 1655, което значително превишава числеността им при моновидовите биофилми ($p < 0,05$) (фиг.14 и 15).

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 $4,96 \pm 0,15$ $\cdot 10^3$ cfu/ml при наличие на пептон като азотен източник се изменя до стойност от $(7,03 \pm 0,17) \cdot 10^3$ cfu/ml при замяната му със соево-казеинов хидролизат. Асоциацията им с щам *E.coli* K-12 1655 не води до появата на спори в структурата на биофилмите. Присъствието на казеин (обикновен бульон) и пептон (пептонна вода) 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 спорите съставлява $(6,8 \pm 0,10) \cdot 10^3$ cfu/ml при щам *B.subtilis* 170 и $(7,13 \pm 0,15) \cdot 10^3$ cfu/ml при *B.subtilis* 168 в присъствието на казеин (обикновен бульон), докато замяната му с пептон (пептонна вода) води до значително по-малък брой спори от $(2,5 \pm 0,17) \cdot 10^3$ cfu/ml за щам *B.subtilis* 170 и $(3,36 \pm 0,20) \cdot 10^3$ cfu/ml за щам *B.subtilis* 168. Стойностите им са близки до броя на спорите в биофилмите от смесени микробни съобщества при замяната с пептон (пептонна вода) ($p > 0,05$) 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 (табл. 14).

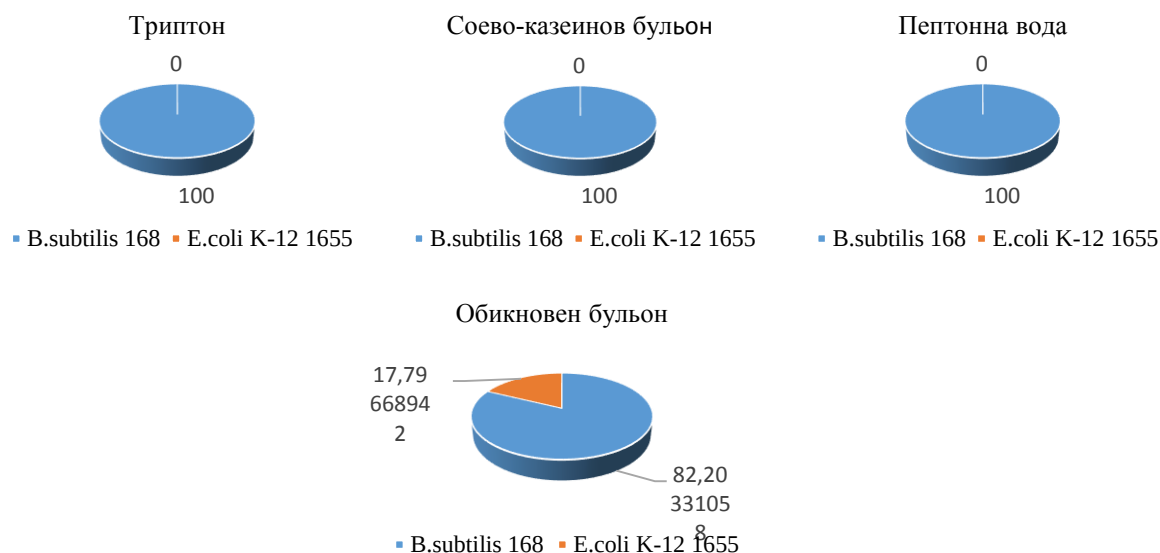


Фигура 13. Влияние на вида на азотния източник в средата за култивиране върху прираста на биофилмите на: ■ *B.subtilis* 170; ■ *B.subtilis* 168; ■ *E.coli* 1655; ■ *B.subtilis* 170+ *E.coli* 1655; □ *B.subtilis* 168+ *E.coli* 1655.



Фиг 14. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 в зависимост от растежната среда за култивиране.

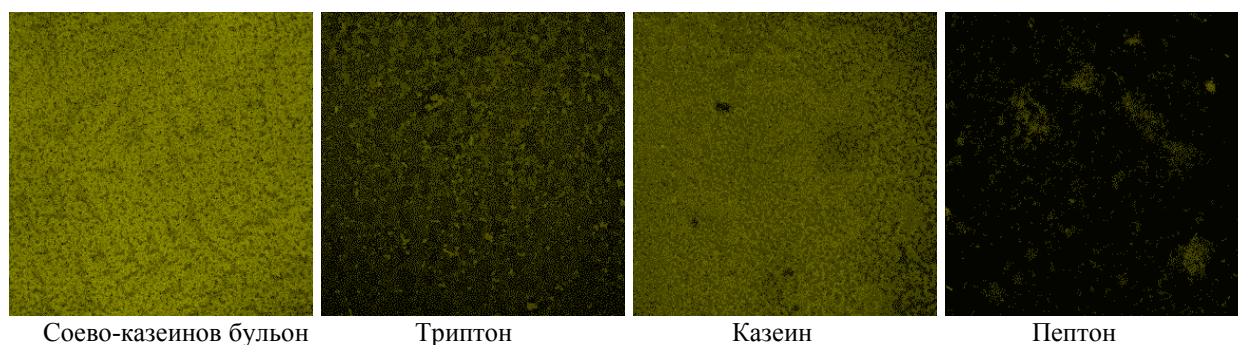
Отделните среди, отличаващи се по вида на съдържащия се в тях азотен източник, имат различно отражение върху морфологичните характеристики на биофилмите, образувани в резултат на съвместното развитие на двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655. Относителната площ на разпространение на образуваните структури при статичното им култивиране върху покривни стъкла се движи в тесен интервал от $0,97 \mu\text{m}^2$ до $0,99 \mu\text{m}^2$ при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, както и в границата от $0,96 \mu\text{m}^2$ до $0,99 \mu\text{m}^2$ при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 в присъствието на соево-казеинов хидролизат (соево-казеинов бульон), пептон (пептонна вода) и казеин (обикновен бульон) като азотни източници в средата за култивиране. Стойността ѝ се снижава до $0,84 \mu\text{m}^2$ за биофилмите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и до $0,81 \mu\text{m}^2$ при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при култивирането им среда, включваща триптон (триптон) (фиг.16 и 17).



Фиг. 15. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 в зависимост от растежната среда за култивиране.

Таблица 14. 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* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655

№	Вид на азотния източник /2 %/	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 170 cfu/ml	Численост в биофилмите на <i>B. subtilis</i> 168 cfu/ml	Численост в смесените биофилми cfu/ml	
				<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.	Триптон	$(4,96 \pm 0.15) \cdot 10^3$	$(5,73 \pm 0.16) \cdot 10^3$	0	0
2.	Казеин	$(6,8 \pm 0.10) \cdot 10^3$	$(7,13 \pm 0.15) \cdot 10^3$	$(0,1 \pm 0.57) \cdot 10^3$	$(0,1 \pm 0.30) \cdot 10^3$
3.	Соев екстракт	$(6,26 \pm 0.05) \cdot 10^3$	$(7,03 \pm 0.17) \cdot 10^3$	0	0
4.	Пептон	$(2,5 \pm 0.17) \cdot 10^3$	$(3,36 \pm 0.20) \cdot 10^3$	$(0,1 \pm 0.07) \cdot 10^3$	$(0,2 \pm 0.06) \cdot 10^3$

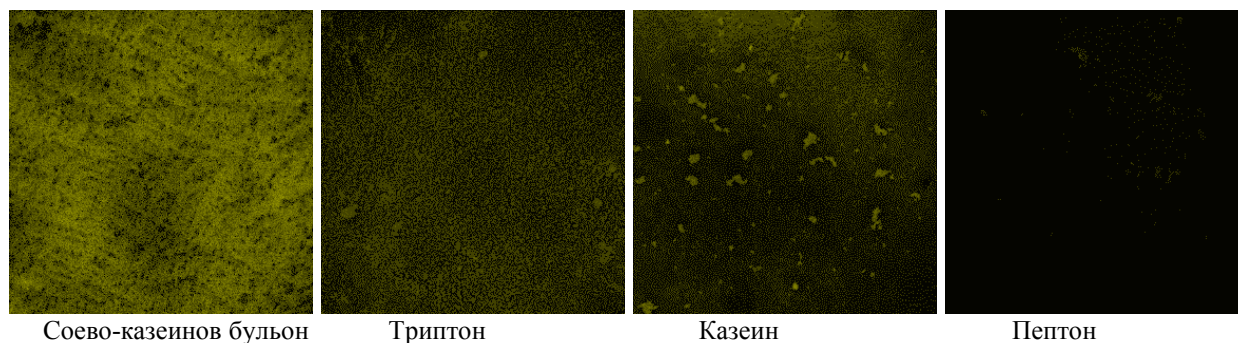


Фигура 16. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни растежни среди. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.

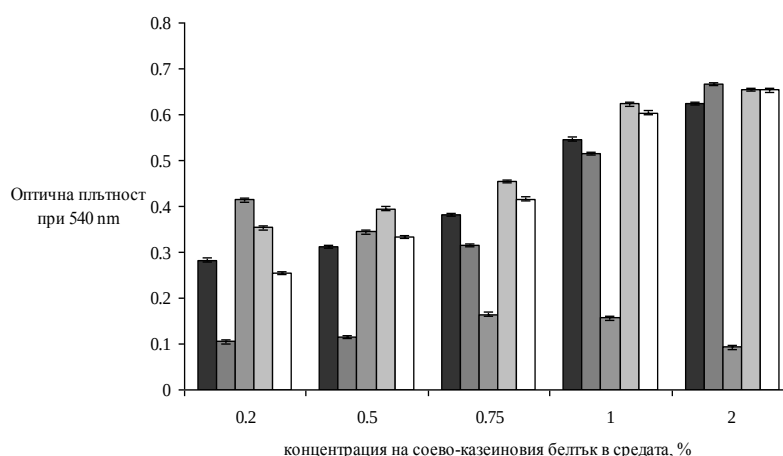
2.1.2. Влияние на концентрацията на соево-казеинов хидролизат в средата за култивиране върху биофилмобразуването от щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

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* K-12 1655, така и при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 (фигура 18). При съдържание на соево-казеинов хидролизат в средата от 2,0 % оптичната плътност при 540 nm достига до стойност от 0.655 ± 0.004 за двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* 1655 и 0.654 ± 0.003 при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 (фиг. 18). 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 %.



Фигура 17. 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.



Фигура 18. 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 измернена 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

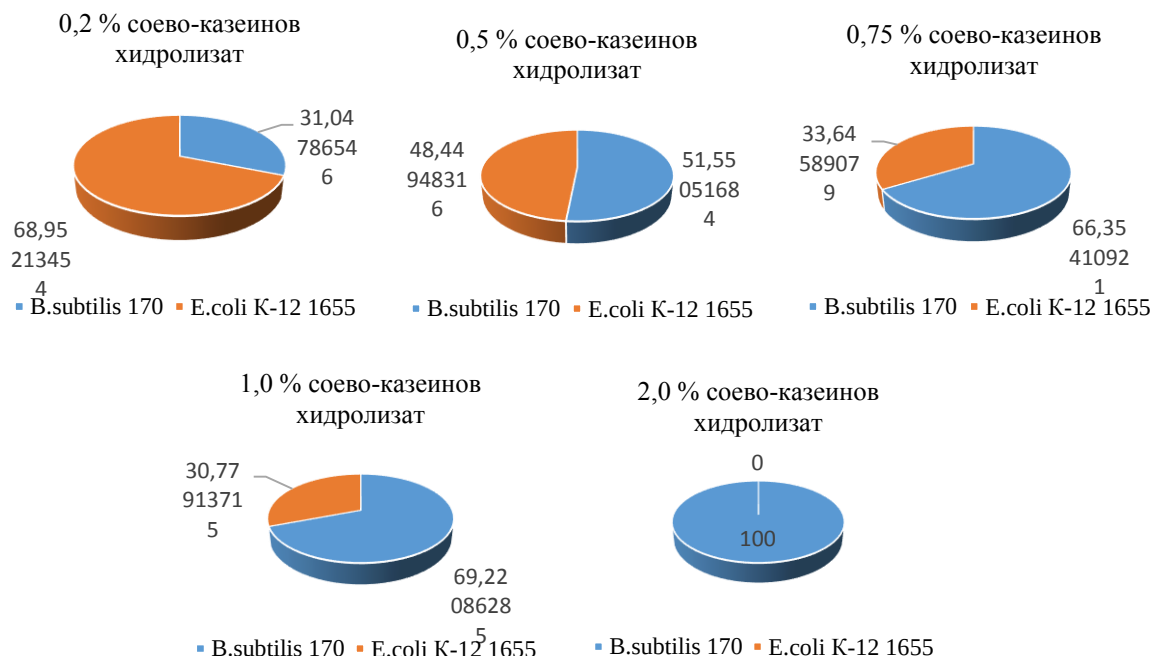
$y=0,1524.x+0,1138$, $r^2=0,9520$, $p<0,05$ - *B.subtilis* 168

$y=-0,0829.x+0,4833$, $r^2=0,9155$, $p<0,05$ - *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

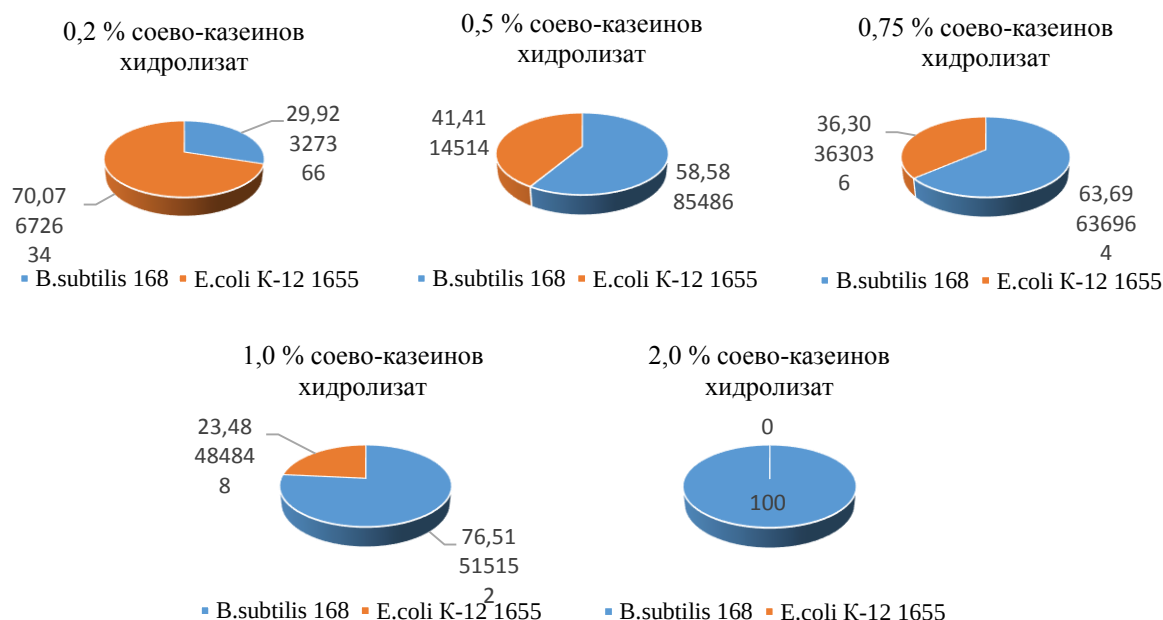
$y=0,1069.x+0,1317$, $r^2=0,9672$, $p<0,05$ - *B.subtilis* 168-*E.coli* K-12 1655

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 относителен дял на щам *E.coli* K-12 1655 от 68,95 % и 70,07 % от популациите в структурата на смесените биофилми, която двукратно превишава стойността на щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168 ($p<0,05$) (фиг.19 и 20). Промяната на съдържанието на соев хидролизат в интервала от 0,75 % до 1,0 % води до нарастване на относителния дял на популацията на щам *B.subtilis* 170 от 69,22 % и 76,51 %, която надвишава приблизително два пъти числеността на популацията на щам *E.coli* K-12 1655 в структурата на биофилмите. Получените данни свидетелстват за конкурентни взаимоотношения между двата щам по време на формирането на биофилми при съдържание на соев хидролизат от 0,1 % до 1,0 % (фиг.19 и 20).



Фиг. 19. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 при различно съдържание на соево-казеинов хидролизат в средата за култивиране.

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 $(0,26 \pm 0,05) \cdot 10^3$ cfu/ml до $(6,26 \pm 0,05) \cdot 10^3$ cfu/ml, докато при щам *B.subtilis* 168 измененията настъпват в границата от $(0,73 \pm 0,06) \cdot 10^3$ cfu/ml до $(7,03 \pm 0,17) \cdot 10^3$ cfu/ml. 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* K-12 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 $(20,6 \pm 0,10) \cdot 10^3$ cfu/ml при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $(21,4 \pm 0,25) \cdot 10^3$ cfu/ml при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 и значително превишава стойността им при монотиповите 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 $(6,16 \pm 0,15) \cdot 10^3$ cfu/ml при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $(6,66 \pm 0,56) \cdot 10^3$ cfu/ml при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655, което не се отличава статистически значимо при монотиповите биофилми (табл. 15).



Фиг. 20. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при различно съдържание на соево-казеинов хидролизат в средата за култивиране.

Таблица 15. 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* K-12 1655, *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655

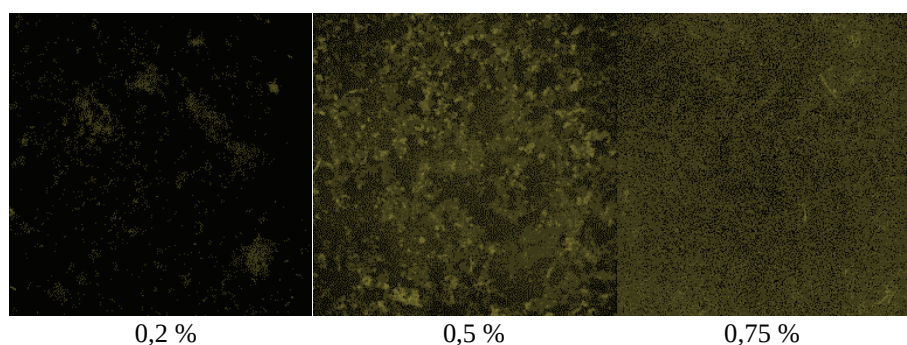
№	Концентрация на соевия екстракт, %	Численост в биофилмите на <i>B.subtilis</i> 170 cfu/ml	Численост в биофилмите на <i>B.subtilis</i> 168 cfu/ml	Численост в смесените биофилми cfu/ml	
				<i>B.subtilis</i> 170 + <i>E.coli</i> K-12 1655	<i>B.subtilis</i> 168 + <i>E.coli</i> K-12 1655
1.	0.2	$(0,26 \pm 0,05) \cdot 10^3$	$(0,73 \pm 0,06) \cdot 10^3$	$(20,6 \pm 0,10) \cdot 10^3$	$(21,4 \pm 0,25) \cdot 10^3$
2.	0.5	$(1,06 \pm 0,06) \cdot 10^3$	$(1,23 \pm 0,08) \cdot 10^3$	$(14,4 \pm 0,17) \cdot 10^3$	$(15,3 \pm 0,13) \cdot 10^3$
3.	0.75	$(2,16 \pm 0,17) \cdot 10^3$	$(3,66 \pm 0,57) \cdot 10^3$	$(10,3 \pm 0,20) \cdot 10^3$	$(12,1 \pm 0,76) \cdot 10^3$
4.	1.0	$(3,53 \pm 0,57) \cdot 10^3$	$(4,30 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(6,16 \pm 0,15) \cdot 10^3$	$(6,66 \pm 0,56) \cdot 10^3$
5.	2.0	$(6,26 \pm 0,05) \cdot 10^3$	$(7,03 \pm 0,17) \cdot 10^3$	0	0

$y=1,447 \cdot x - 1,687$, $r^2=0,9395$, $p<0,05$ - *B.subtilis* 170

$y=1,565 \cdot x - 1,307$, $r^2=0,9486$, $p<0,05$ - *B.subtilis* 168

$y=-4,944 \cdot x + 25,124$, $r^2=0,9931$, $p<0,05$ - *B.subtilis* 170-*E.coli* K-12 1655

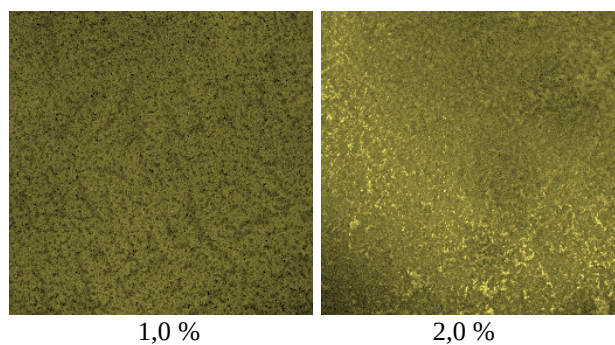
$y=-5,144 \cdot x + 26,524$, $r^2=0,9886$, $p<0,05$ - *B.subtilis* 168-*E.coli* K-12 1655



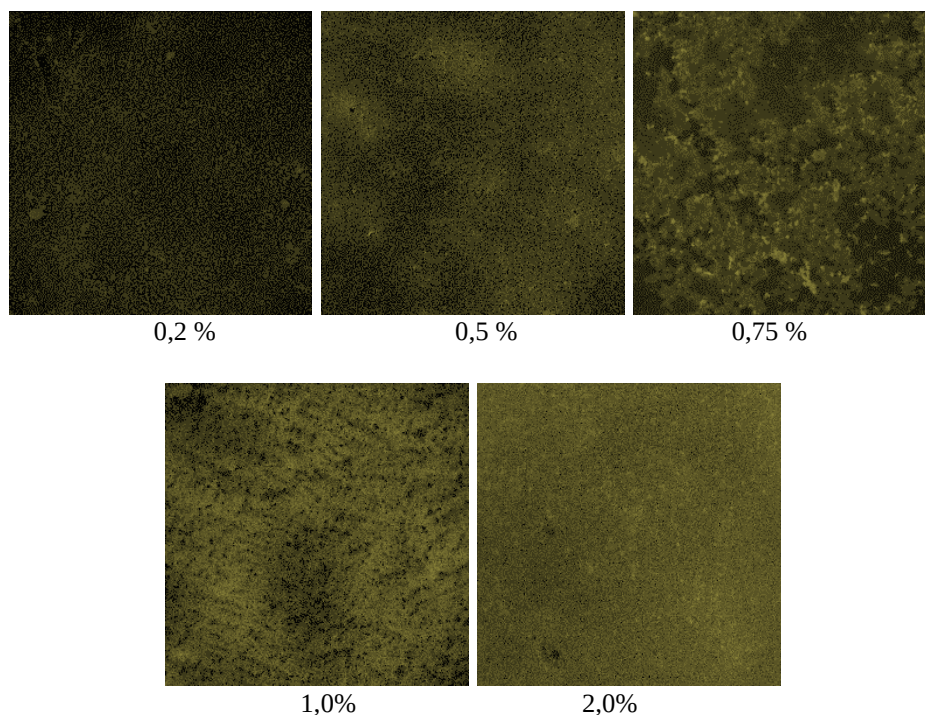
0,2 %

0,5 %

0,75 %



Фигура 21. 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.



Фигура 22. 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 °C.

Протичането на механизъм на регулация на активността на опероните за биосинтезата на екзоцелуларните полизахариди и белтъци от състава на матрикса 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 $0,50 \mu\text{m}^2$ до $0,99 \mu\text{m}^2$ 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 $0,77 \mu\text{m}^2$ при концентрация на белтък от 0,2 % и достига стойност от $0,99 \mu\text{m}^2$ при нарастване на белтъчното съдържание до 2,0 % (фиг. 21 и 22).

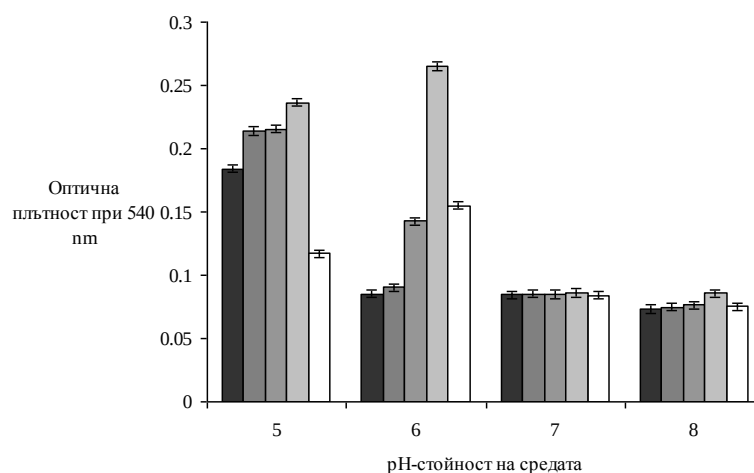
2.1.3. Влияние на неблагоприятните фактори на средата за култивиране върху биофилмообразуването от щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

Неблагоприятните условия на околната среда като високата температура, осмотичност и киселинност на средата, наличие на йони на тежки метали (Fe^{2+} или Fe^{3+} или Cu^{+}) създава условия за образуване и акумулиране на вътреклетъчни свободни радикали като супероксиден анион, водороден пероксид, синглетен кислород, хидроксилни радикали (окислителен стрес), които във високи (летални) концентрации оказват цитотоксичен ефект и възпрепятстват процеса на биофилмообразуване.

Основните механизми на защита на микробните видове срещу тяхното въздействие по време на образуването на биофилми се заключават в наличието на сложна в генетично отношение регулаторна мрежа, отговорна за прехода на клетките от планктонно състояние към прикрепен начин на съществуване, и образуването на извънклетъчен матрикс, чийто състав се доминира от екзоцелуларни полизахариди [Gambino and Cappitelli, 2016].

2.1.3.1. Влияние на рН-стойността на средата за култивиране върху биофилмообразуването от щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

Нарастването на рН-стойността на средата в границата между рН 5,0 и рН 6,0 при проведеното проучване не създава условия за статистически значимо нарастване на оптичната плътност при 540 nm ($p > 0,05$) при съвместното култивиране на щамове *B. subtilis* и *E. coli*. Нарастването на стойността ѝ до рН 8,0 води до статистически значимо снижаване на биомасата на смесените биофилми ($p < 0,05$). Максимална стойност на оптичната плътност от $0,236 \pm 0,11$ при двойката щамове *B. subtilis* и *E. coli* и $0,155 \pm 0,63$ при съвместното култивиране на щамове *B. subtilis* и *E. coli* се достига при рН-стойността на средата от рН 6,0, което значително ($p < 0,05$) превишава показателите им при моновидовите биофилми на щамове *B. subtilis* и *E. coli* (фиг. 23).



Фигура 23. Влияние на рН на средата върху прираста на биофилмите: ■ *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 рН. Оптичната плътност е измерена при 540 nm след оцветяване на биофилмите с 0,1 % кристал виолет.

$y = 0,0219 \cdot x^2 - 0,1428 \cdot x + 0,2994$, $r^2 = 0,9253$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 170

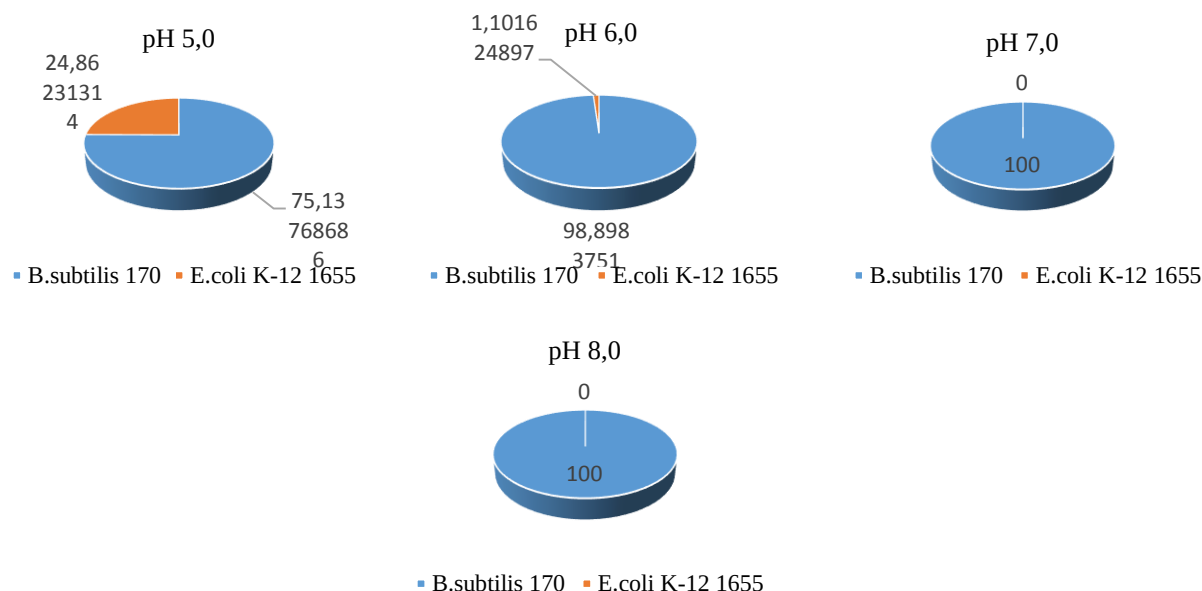
$y = 0,0284 \cdot x^2 - 0,1842 \cdot x + 0,3686$, $r^2 = 0,9408$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 168

$y = 0,016 \cdot x^2 - 0,1278 \cdot x + 0,329$, $r^2 = 0,9951$, $p < 0,05$ - *E. coli* K-12 1655

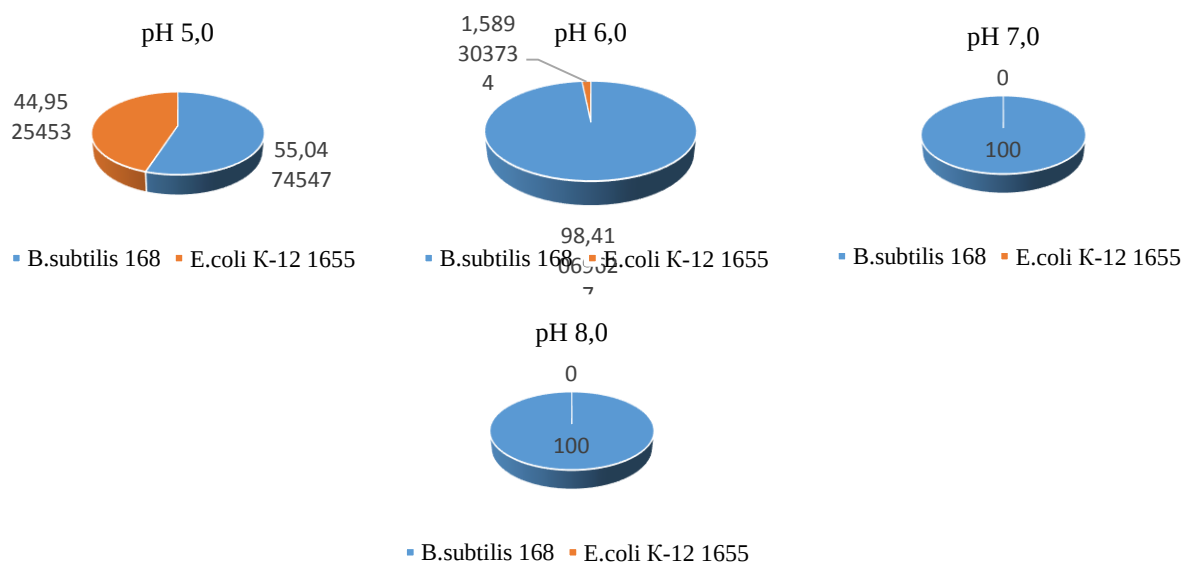
$y = -0,1041 \cdot x^2 + 0,3413 \cdot x - 0,001$, $r^2 = 1$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655

$y = -0,0544 \cdot x^2 + 0,2009 \cdot x - 0,0292$, $r^2 = 1$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 168-*E. coli* K-12 1655

рН-стойността на средата за култивиране повлиява на характера на взаимоотношенията между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 в процеса на съвместното им развитие до биофилми при проведеното проучване. При рН 5,0 микробната популация от структурата на смесените биофилми се доминира от щамове *B. subtilis* 170 при достигнат относителен дял от 75,13 % от общата численост на популацията, докато за щам *B. subtilis* 168 стойността е 55,04 % и се доближава до величината им при щам *E. coli* K-12 1655 в структурата на смесените биофилми ($p > 0,05$). Относителният дял на популацията на щам *E. coli* K-12 1655 е значително по-малък при асоциацията му с щам *B. subtilis* 170 при рН 5,0. рН-стойността на средата в границите от рН 5,0 до рН 6,0 обезпечава присъствието на клетките на щамове *E. coli* 1655 в популационната структура на биофилмите, като стойността на относителния им дял се снижава значително до 1,10 % при асоциацията им с щам *B. subtilis* 170 и 1,58 % при взаимодействието им с щам *B. subtilis* 168 ($p < 0,05$). Нарастването на рН-стойността на средата за култивиране при проведеното проучване се съпътства с формиране на биофилми, състоящи се само от популации на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 (фиг. 24 и 25).



Фиг. 24. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 при различно рН на средата за култивиране.

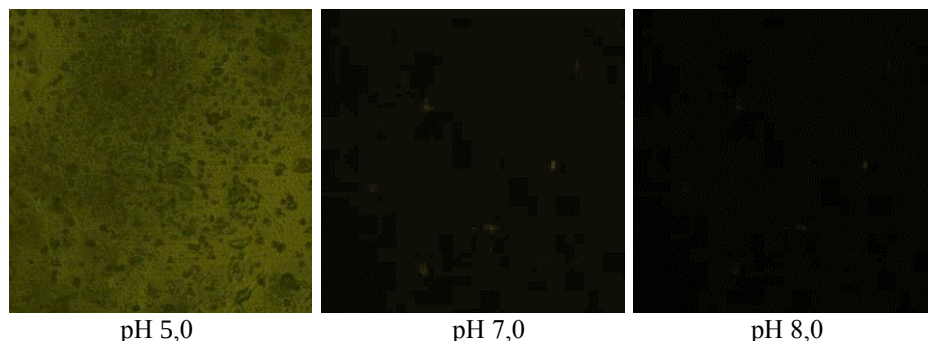


Фиг. 25. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при различно съдържание на соево-казеинов хидролизат в средата за култивиране.

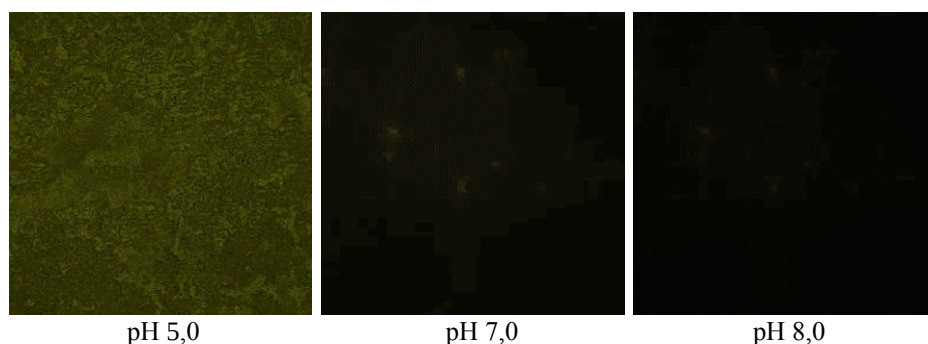
Относителната площ на разпространение на смесените биофилми, образувани от съвместното култивиране на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, нараства при промяна на рН-стойността на средата за култивиране от рН 5,0 до рН 6,0, непосредствено след което настъпва силното ѝ снижаване при достигане на рН 7,0 ($p < 0,05$). Стойността ѝ при рН 6,0 съставлява $0,99 \mu\text{m}^2$ за биофилмите на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и $0,99 \mu\text{m}^2$ при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 и е приблизително четири пъти по-висока при нарастване на рН на средата до рН 7,0. Достигането на стойността ѝ до рН 8,0 се съпътства със статистически незначимо намаляване на размера на относителна площ на разпространение на образуваните структури от $0,15 \mu\text{m}^2$ при двоката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, докато при щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 запазва постоянна стойност (фиг. 26 и 27).

Получените резултати за морфологичните характеристики на биофилмите при промяната на рН-стойността на средата за култивиране не корелират с числеността на спорите в структурата им. Броят на спорите в структурата на смесените биофилми от щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 остава относително постоянен при промяна на рН в границите от рН 5,0 до рН 6,0 , докато при същите условия на култивиране се забелязва статически незначимо нарастване на числеността им от $0,2 \cdot 10^3 \text{ cfu/ml}$ до

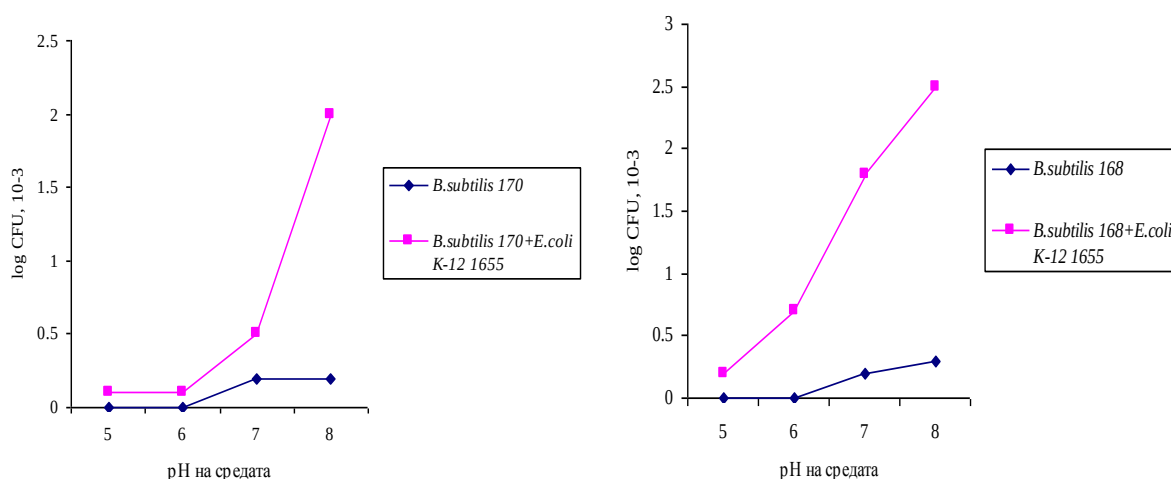
0,7.10³ cfu/ml при двойката *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655. Нарастването на стойността ѝ се съпътства със значително увеличаване на числеността на спорите в структурата на смесените биофилми в хода на проведеното проучване ($p < 0,05$), която при рН на средата от рН 8,0 достига до стойност от 2,0.10³ cfu/ml при биофилмите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и 2,5.10³ cfu/ml при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 (фиг.29). Числеността на спорите се променя обратно пропорционално на биомасата на образуваните структури при проведеното проучване, като се установяват статистически значими разлики в броя на спорите в структурата на моновидовите и смесените биофилми в настоящето изследване ($p < 0,05$) (фиг.28).



Фигура 26. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни стойности на рН на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



Фигура 27. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни стойности на рН на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



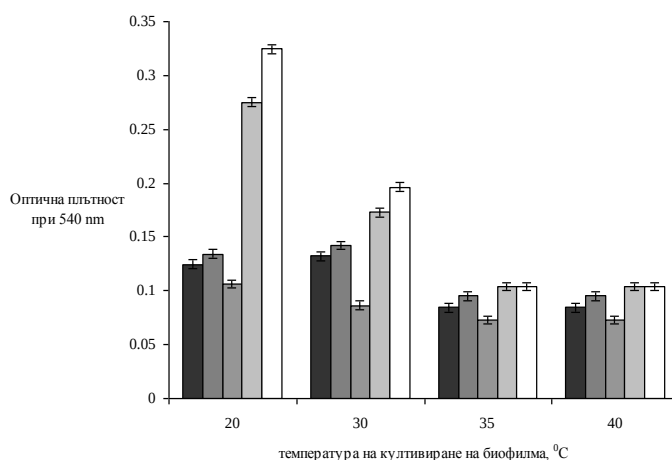
Фигура 28. Влияние на рН-средата за култивиране върху числеността на спорите в структурирана биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* K-12 1655

$y = 0,022 \cdot e^{1,0597 \cdot x}$, $r^2 = 0,89$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655

$y = 0,106 \cdot e^{0,852 \cdot x}$, $r^2 = 0,95$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655

2.1.3.2. Влияние на температурата култивиране върху биофилмобразуването от щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

Температурата на култивиране повлиява прираста на биомасата на биофилмите, образувани с участието на щамове на вида *B. subtilis* и *E. coli*, като най-високи стойности на оптичната плътност при 540 nm след оцветяване с кристал виолет от $0,275 \pm 0,31$ при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и $0,324 \pm 0,66$ при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 се отчитат при температура от 20 °C, които двукратно превишават показателите при моновидовите биофилми ($p < 0,05$) (фиг. 29). Повишаването на температурата на култивиране до 40 °C се съпровожда със статистически значимо намаляване на оптичната плътност при моновидовите и смесените биофилми ($p < 0,05$), вследствие на което стойността се установява до $0,103 \pm 0,53$ за двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и $0,104 \pm 0,77$ при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655. Сnižаването на общата биомаса при повишаването на температурата в диапазона от 30 °C до 40 °C вероятно е свързано с изчерпването на основните енергетични и хранителни източници от състава на средата в процеса на култивиране на биофилмите (фиг. 29).



Фигура 29. Влияние на температурата на култивиране върху прираста на биофилмите: ■ *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, 30 °C, 35 °C и 40 °C в среда M63. Оптичната плътност е измернена при 540 nm след оцветяване на биофилмите с 0,1 % кристал виолет.

$y = -0,0238 \cdot x + 0,1614$, $r^2 = 0,967$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 170

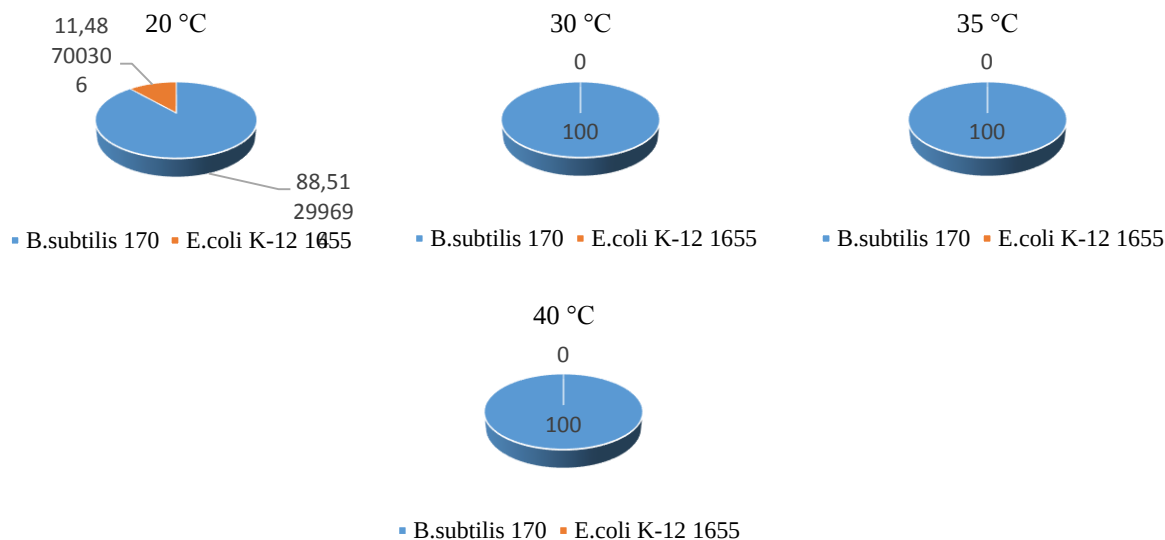
$y = -0,0235 \cdot x + 0,1704$, $r^2 = 0,9757$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 168

$y = -0,0167 \cdot x + 0,1218$, $r^2 = 0,9881$, $p < 0,05$ - *E. coli* K-12 1655

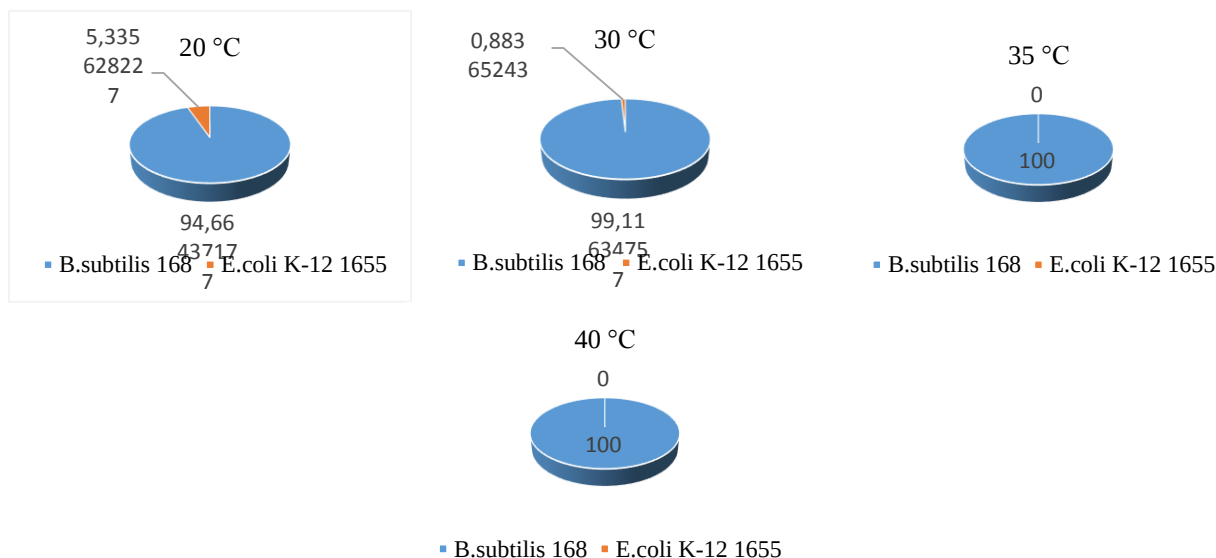
$y = -0,0857 \cdot x + 0,3553$, $r^2 = 0,9878$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 170-*E. coli* K-12 1655

$y = -0,1102 \cdot x + 0,4286$, $r^2 = 0,9915$, $p < 0,05$ - *B. subtilis* 168-*E. coli* K-12 1655

В структурата на образуваните биофилми се установяват конкуретни взаимоотношения между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при температура на култивиране от 20 °C, докато нарастването на стойността ѝ в границата от 20 до 40 °C създава условия за развитието на антагонистични взаимоотношения, вследствие на което структурата на биофилмите се доминира от клетки на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168, но като цяло се забелязва намаляване на числеността им от $(6,65 \pm 0,1) \cdot 10^6$ cfu/ml до $(0,56 \pm 0,08) \cdot 10^6$ cfu/ml в структурата на биофилмите при щам *B. subtilis* 170, както и от $(5,76 \pm 0,23) \cdot 10^6$ cfu/ml до $(0,16 \pm 0,07) \cdot 10^6$ cfu/ml при щам *B. subtilis* 168 (фиг. 30 и 31).



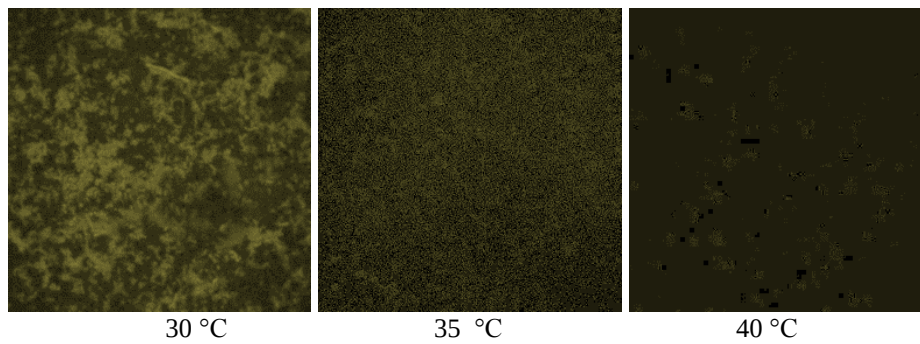
Фиг. 30. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 при различна температура на култивиране.



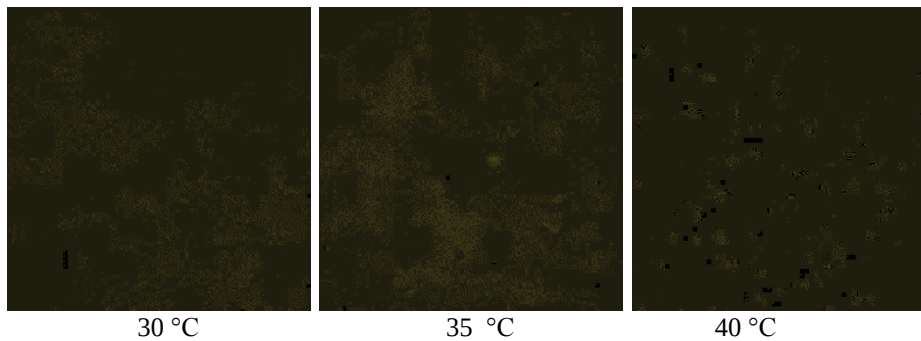
Фиг. 31. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при различна температура на култивиране.

Относителната площ на разпространение на образуваните структури намалява експоненциално с увеличаването на температурата на култивиране при проведеното проучване ($y=1,3.e^{-0,259.x}$, $r^2=0,99$, $p<0,05$; $y=1,8.e^{-0,521.x}$, $r^2=0,92$, $p<0,05$) (фиг.32 и 33).

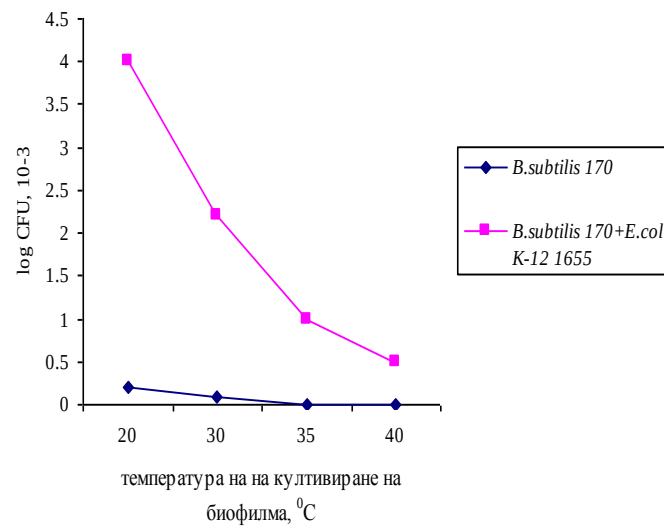
Високата температура на култивиране не създава условия за инициране на процеса на спорообразуване в структурата на моновидовите биофилми, нарастването на стойността ѝ до 35 °C води до статистически значимо снижаване на числеността на спорите в структурата на смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и при съвместното култивиране на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 ($p<0,05$). Последващото увеличаване на стойността ѝ до 40 °C не се съпровожда със статистически значимо снижаване на числеността на спорите както в структурата на биофилмите на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, така и при двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 ($p>0,05$). Установената зависимост между броя на спорите в структурата на смесените биофилми при нарастването на температурата на култивиране в диапазона от 20 °C до 40 °C има експоненциален характер (фиг. 34 и 35) при изследваната двойка щамове в настоящето изследване.



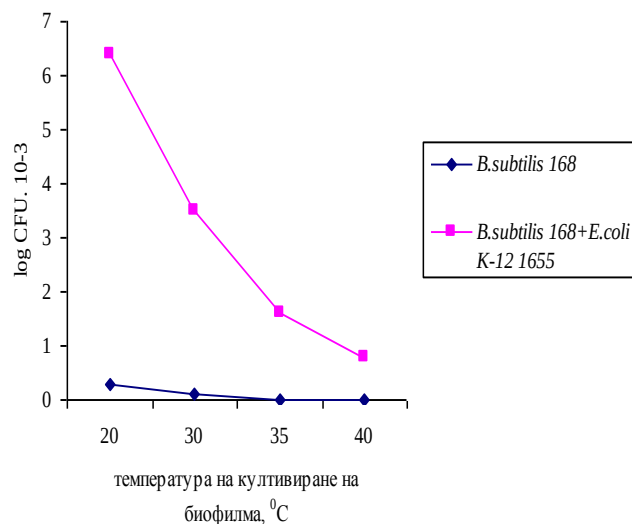
Фигура 32. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни стойности на температурата на култивиране. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h.



Фигура 33. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни стойности на температурата на култивиране. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h.



Фигура 34. Численост на спорите в структурата на моновидовите биофилми на щам *B. subtilis* 170 и смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655
 $y = 8,3905 \cdot e^{-0,7027 \cdot x}$, $r^2 = 0,99$



Фигура 35. Численост на спорите в структурата на моновидовите биофилми на щам *B. subtilis* 170 и смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655
 $y = 13,387 \cdot e^{-0,7021 \cdot x}$, $r^2 = 0,99$

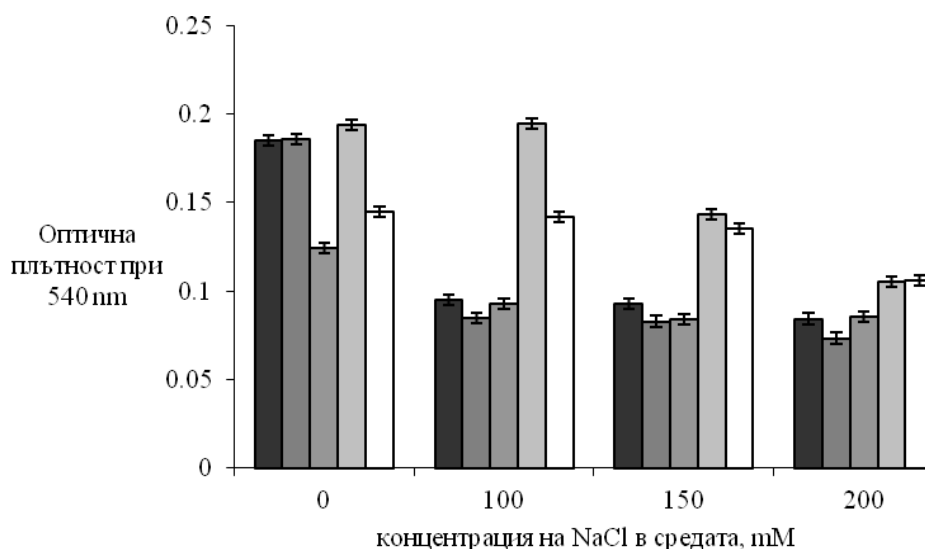
2.1.3.3. Влияние на съдържанието на NaCl в средата за култивиране върху биофилмобразуването от щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

Осмотичността на средата регулира биофилмобразуването при голям брой бактериални видове (фиг. 36). Нарастването на съдържанието на натриев хлорид от 100 mM до 200 mM води до снижаване на прираста на биомасата на биофилма от щам *B. subtilis* 170, докато при щам *B. subtilis* 168 запазва относително постоянна стойност. Стойностите на оптичната плътност при 570 nm след оцветяване с 0,1 % разтвор на кристал виолет намалява линейно при промяна на осмотичността на средата в границата от 100 до 200 mM NaCl при смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 ($r^2 = 0,9922$), *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 ($r^2 = 0,9774$).

Увеличаване на относителния дял от общата численост на клетъчната популация в структурата на биофилма на щам *E. coli* K-12 1655 от 21,32 % и 24,73 % до 34,87 % и 34,88 % при концентрация на NaCl от 100 до 150 mM се свързва вероятно с активирането на транскрипцията на *pga* оперона, който е отговорен за биосинтезата на протените, необходими за образуването на полиацетилглюкозамина, влизащ в състава на матрикса. Въпреки това съвместното му развитие с щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 не определя доминантната му роля в процеса на формирането на структурите на биофилмите. Относителният дял на популациите на щамове *B. subtilis* в структурата на биофилмите запазва относително постоянна стойност при съдържание на NaCl в границата от 150 mM до 200 mM при взаимодействието му с щам *E. coli* K-12 1655, но като цяло са по-високи спрямо контролната проба ($p < 0,05$). При съдържание на натриев хлорид в средата от 200 mM не се установява наличие на клетки на щам *E. coli* K-12 1655 в биофилмите при асоциацията му с щамове на вида *B. subtilis*, което е индикация за извършване на преход от конкурентни взаимоотношения към антогонизъм при условията на повишаваща се осмотичност на средата (фиг. 37 и 38).

Инхибирането на биосинтезата на екзоцелуларните полизахариди, които се включват в състава на матрикса на биофилмите и осигуряват тяхното разпространение по повърхността на субстрата, обясняват намаляването на стойностите на относителната площ на разпространение, което следва линейна зависимост и за двете двойки щамове при промяна на осмотичността на средата в настоящето проучване (фиг. 39 и 40). При концентрация на натриев хлорид от 200 mM стойностите му е $0,19 \mu\text{m}^2$ при биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655, докато биофилмите, образуваните от съвместното култивиране на двойката щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 се характеризират с относителна площ от $0,21 \pm 0,02 \mu\text{m}^2$ и при достигане на концентрация на NaCl на средата от 200 mM (фиг. 39 и 40). При щамове *E. coli* K-12 този ефект се обяснява с негативното влияние на регулаторния протеин RpoS върху транскрипцията *yjb* и *wca* опероните при

условията на променящо се съдържание на натриев хлорид до 0,7 М в средата за култивиране, които са отговорни за биосинтезата на екзоцелуларните полизахариди.



Фигура 36. Влияние на осмотичността на средата върху прираста на биофилмите: ■ *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 със съдържание на NaCl от 0 mM, 100 mM, 150 mM и 200 mM. Оптичната плътност е измерена при 540 nm след оцветяване на биофилмите с 0,1 % кристал виолет.

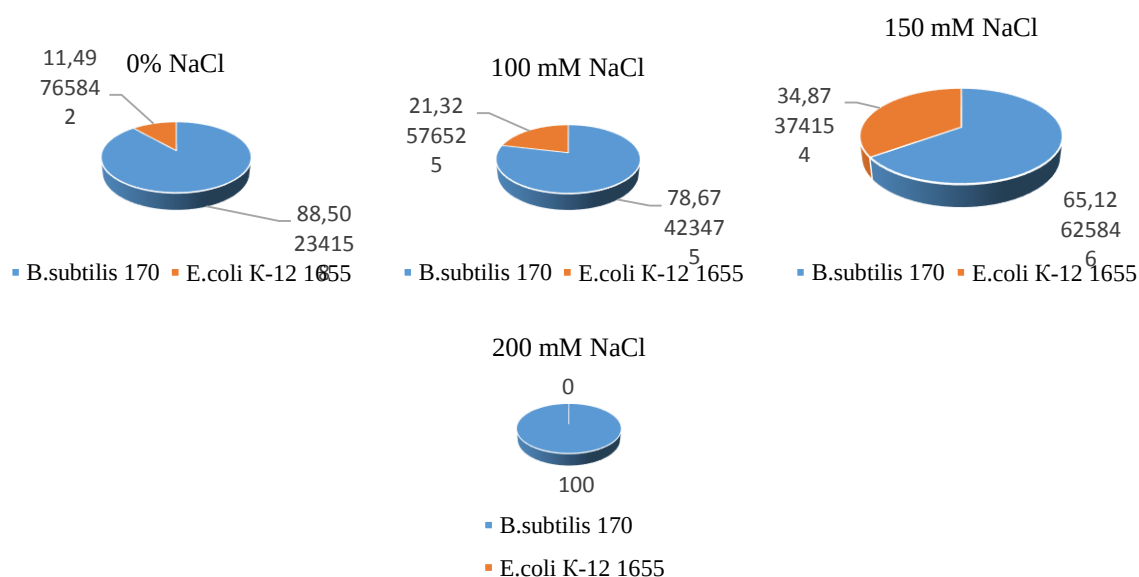
$$y = -0,0061 \cdot x + 0,1041, r^2 = 0,951, p < 0,05 - B. subtilis 170$$

$$y = -0,0112 \cdot x + 0,1065, r^2 = 0,992, p < 0,05 - B. subtilis 168$$

$$y = 0,0792 \cdot e^{0,0481 \cdot x}, r^2 = 0,9405, p < 0,05 - E. coli K-12 1655$$

$$y = -0,0445 \cdot x + 0,2367, r^2 = 0,992, p < 0,05 - B. subtilis 170-E. coli K-12 1655$$

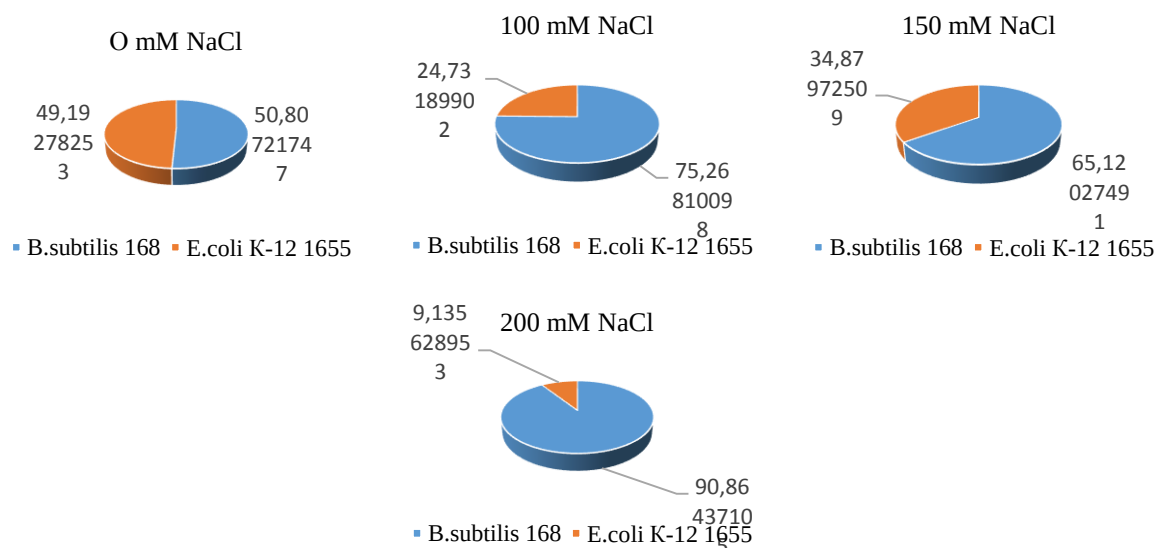
$$y = -0,0396 \cdot x + 0,2211, r^2 = 0,977, p < 0,05 - B. subtilis 168-E. coli K-12 1655$$



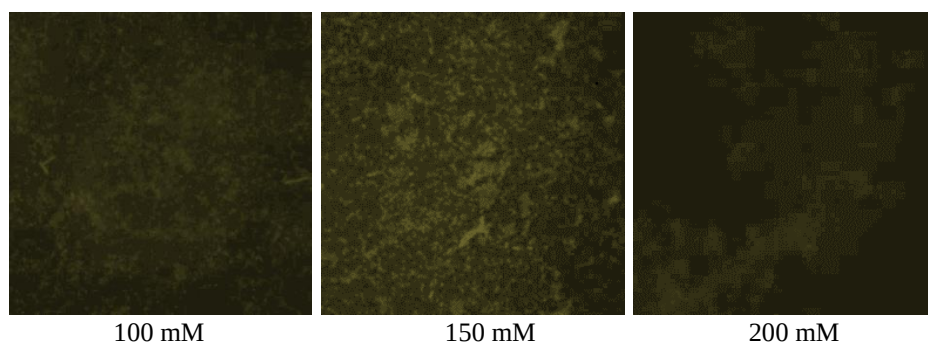
Фигура 37. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 при различна концентрация на NaCl в средата на култивиране.

Числеността на спорите в структурата на смесените биофилми, образувани от асоциацията на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655, нараства експоненциално при промяна на осмотичността на средата от 100 до 200 mM, докато в структурата на моновидовите биофилми се установява тяхното намаляване при същите условия на култивиране. Броят на спорите в структурата на смесените биофилми се движи в границата от $1,89 \cdot 10^2$ cfu/ml при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и $1,7 \cdot 10^2$ cfu/ml при съвместното култивиране на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при концентрацията на натриев хлорид от 100 mM, като изменението на стойността

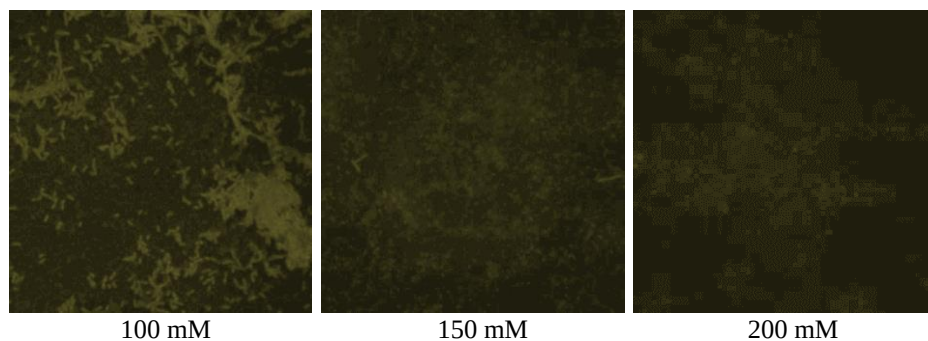
й до 200 mM се съпровожда със статистическо значимо увеличаване на спорите в обраваните биофилми до $4,5 \cdot 10^2$ cfu/ml при щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $4,62 \cdot 10^2$ cfu/ml при щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655. Величината им е значително по-голяма в сравнение в моновидовите биофилми, в чиято структура се установяват стойности от $0,4 \cdot 10^2$ cfu/ml при щам *B.subtilis* 170 и $0,46 \cdot 10^2$ cfu/ml при щам *B.subtilis* 168 (фиг. 41 и 42).



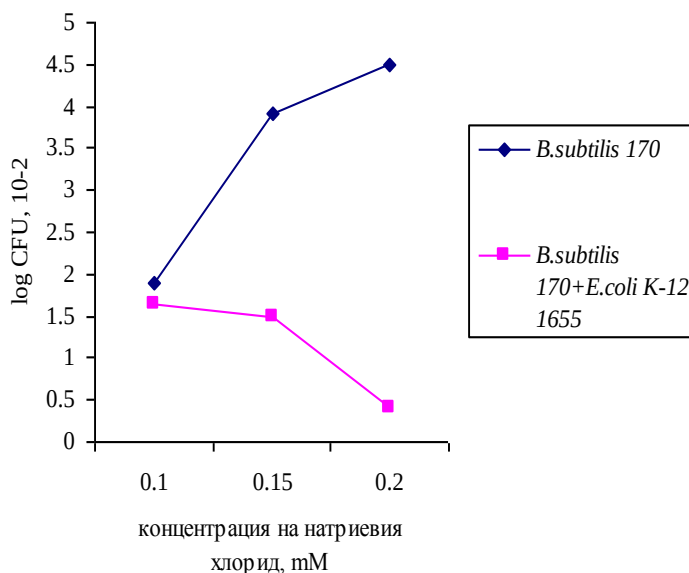
Фигура 38. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при различна концентрация на NaCl в средата на култивиране.



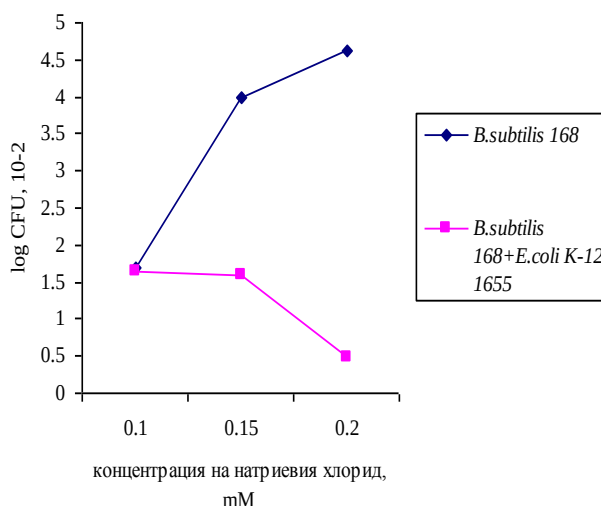
Фигура 39. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различна концентрация на NaCl. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



Фигура 40. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни стойности на различна концентрация на NaCl. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



Фигура 41. Численост на спорите в структурата на моновидовите биофилми на щам *B. subtilis* 170 и смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655
 $-y=2,435.\ln(x)+1,982$, $r^2=0,974$, $p<0,05$

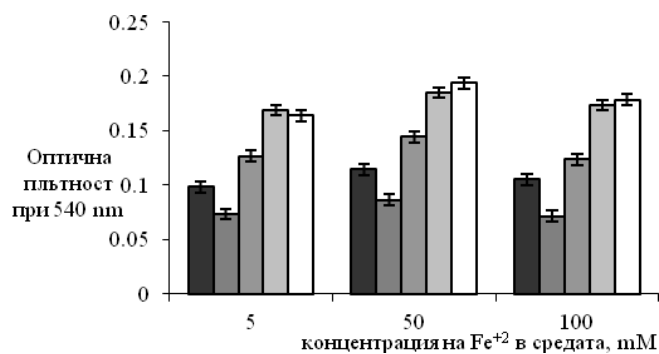


Фигура 42. Численост на спорите в структурата на моновидовите биофилми на щам *B. subtilis* 170 и смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655
 $-y=2,729.\ln(x)+1,810$, $r^2=0,971$, $p<0,05$

2.1.3.3. Влияние на съдържанието на фери-йони в средата за култивиране върху биофилмобразуването от щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*

От друга страна, желязото принадлежи към микроелементите, чието съдържание повлиява върху характера на взаимоотношенията между щамове на вида *B. subtilis* и *E. coli* в процеса на формиране на биофилми (фиг. 43). Промяната в съдържанието на фери йони в средата в диапазона от 5 μM до 50 μM се съпътства с нарастването на биомасата на смесените биофилми, като оптичната плътност при 540 nm след оцветяване с 0,1 % разтвор на кристал виолет се изменя в границата от $0,163 \pm 0,21$ до $0,184 \pm 0,57$ като резултат от взаимодействието между щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и от $0,145 \pm 0,96$ до $0,198 \pm 0,78$ за двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655. Стойностите им се доближават до биомасата при биофилмите на щамове *B. subtilis* 170, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 и са значително по-ниски при отсъствието им в среда, съдържаща като единствен въглероден източник

глюкоза ($p < 0,05$). Нарастването на величината ѝ до $100 \mu\text{M}$ се съпровожда с намаляване на стойността на оптичната плътност на образуваните смесени биофилми.



Фигура 43. Влияние на съдържанието на Fe^{+2} в средата върху прираста на биофилмите: ■ *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 със съдържание на Fe^{+2} от $5 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ и $100 \mu\text{M}$. Оптичната плътност е измерена при 540 nm след оцветяване на биофилмите с 0,1 % кристал виолет.

$y = -0,0128.x^2 + 0,0548.x + 0,0562$, $r^2 = 1$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 170

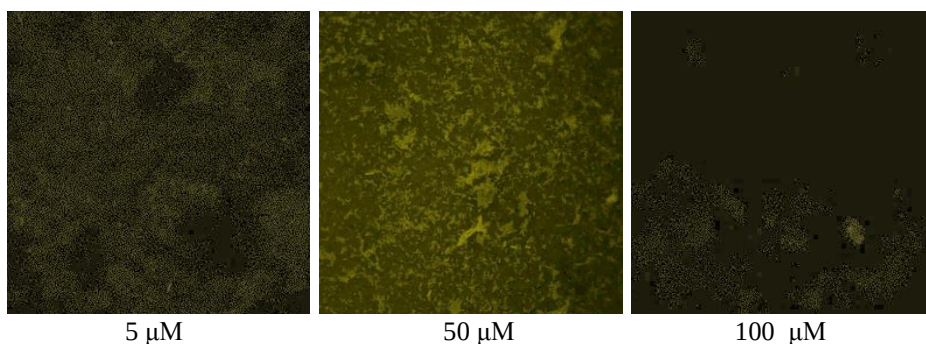
$y = -0,0139.x^2 + 0,0547.x + 0,327$, $r^2 = 1$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 168

$y = -0,0192.x^2 + 0,0752.x + 0,0707$, $r^2 = 1$, $p < 0,05$ - *E.coli* K-12 1655

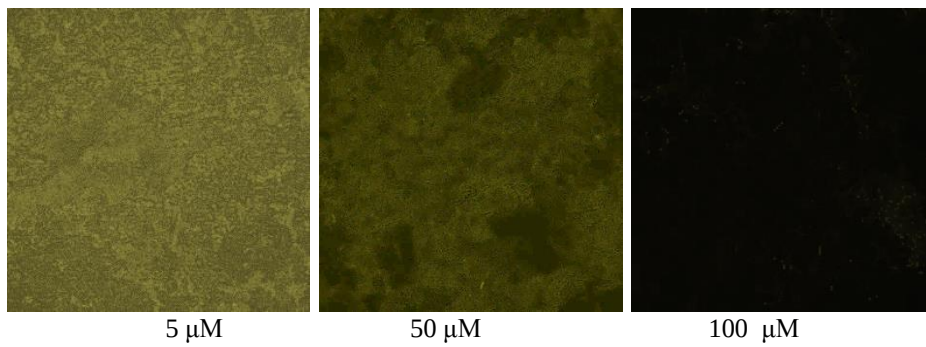
$y = -0,014.x^2 + 0,0582.x + 0,1248$, $r^2 = 1$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 170-*E.coli* K-12 1655

$y = -0,0229.x^2 + 0,0986.x + 0,0883$, $r^2 = 1$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 168-*E.coli* K-12 1655

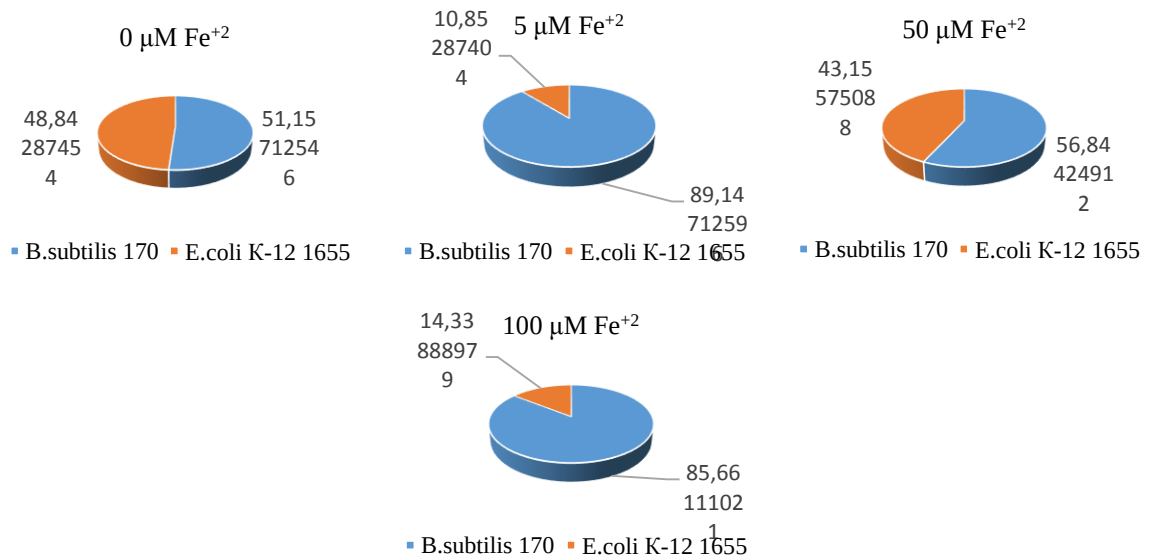
Структурата на микробната популация в процеса на култивирането на смесените биофилми в средата, съдържаща в качество на въглероден източник глюкоза, при проведеното проучване се съставява от щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168 при относителен дял от общата численост на популациите от 51,15 % и 50,80 %, която се доближава до показателя на щам *E.coli* K-12 1655 ($p > 0,05$). Включването на феро йони в състава на хранителната среда променя хода на развитието на бактериалните щамове от структурата на смесените биофилми, относителният дял на популациите на щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168 достига до стойности от 89,14 % и 86,65 %, които превишават значително величината им при *E.coli* K-12 1655 при съдържание на Fe^{+2} от $5 \mu\text{M}$ ($p < 0,05$) (фиг 46 и 47). Съотношението в числеността на популациите на изследвана двойка щамове в образуваните структури е приблизително еднакво при концентрация на Fe^{+2} до стойност от $50 \mu\text{M}$ в процеса на съвместното им статично култивиране (фиг 46 и 47). Популационната структура включва еднакъв брой колонии както на щамове *B.subtilis* 170 и щам *E.coli* K-12 1655, така и на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655, които намаляват при достигане на съдържанието на Fe^{+2} от $100 \mu\text{M}$ в структурата на моновидовите биофилми. Степента на редукция на относителния дял е най-силно изразена при щам *E.coli* K-12 1655 в структурата на смесените биофилми при взаимодействието им с щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168, чиято стойност се снижава статистически значимо от 43,15 % до 14,33 % при асоциацията му с щам *B.subtilis* 170 и от 46,42 % до 20,39 % при взаимодействието му с щам *B.subtilis* 168.



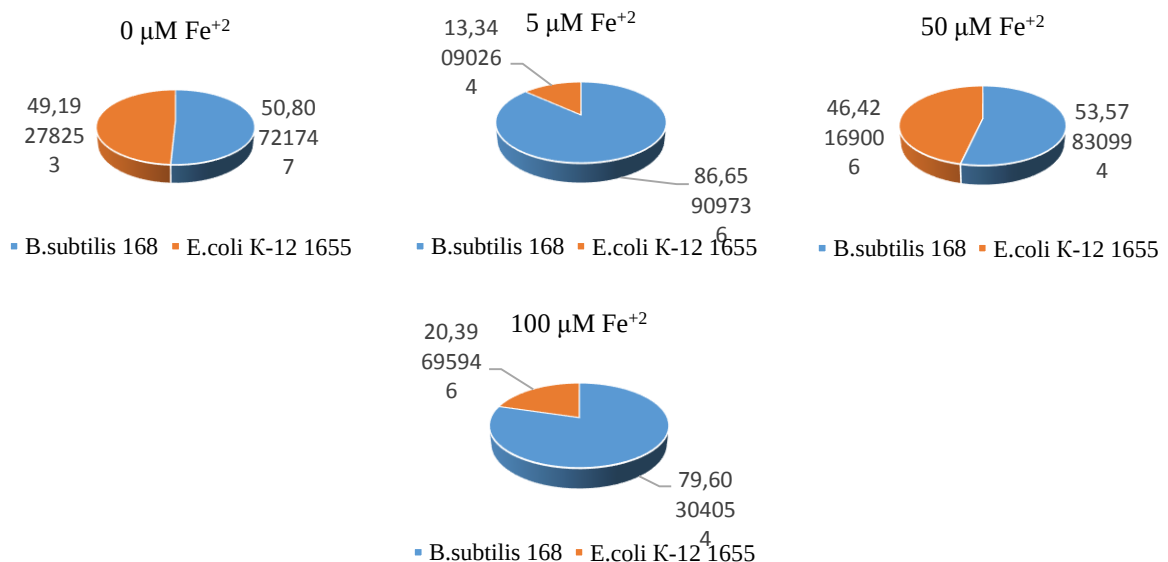
Фигура 44. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различна концентрация на Fe^{+2} на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20°C .



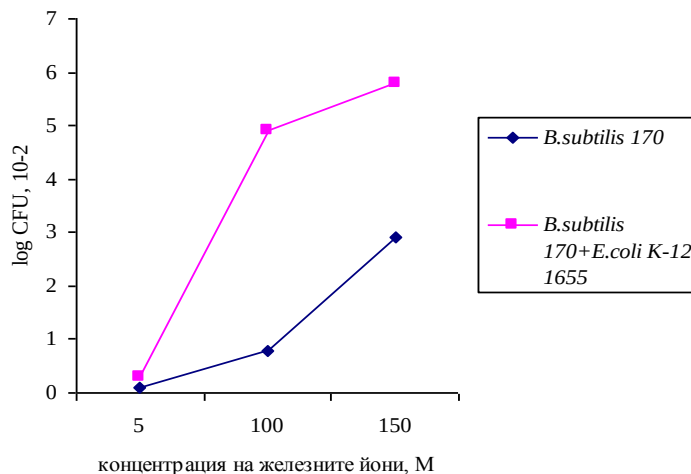
Фигура 45. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различна концентрация на Fe^{+2} на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



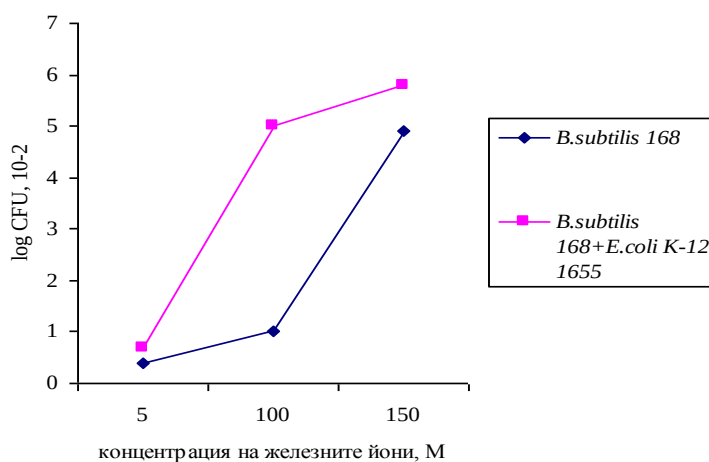
Фигура 46. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 при различна концентрация на Fe^{+2} в средата на култивиране.



Фигура 47. Структура на микробното съобщество в смесните биофилми на двойката щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при различна концентрация на Fe^{+2} в средата на култивиране.



Фигура 48. Численост на спорите в структурата на моновидовите биофилми на щам *B. subtilis* 170 и смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655
 $y=5,181.\ln(x)+0572$, $r^2=0,952$, $p<0,05$



Фигура 49. Численост на спорите в структурата на моновидовите биофилми на щам *B. subtilis* 168 и смесените биофилми на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655
 $y=4,810.\ln(x)+0,960$, $r^2=0,949$, $p<0,05$

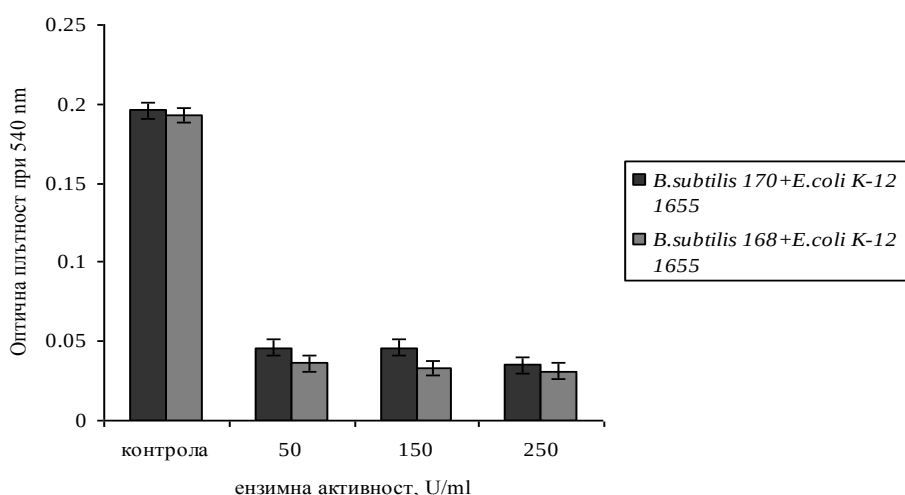
3. Проучване върху механизмите на подтискане на растежа биофилмите под влияние на секреторни метаболити на щамове *B. subtilis* 170, *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655

3.1. Влияние на извънклетъчната протеаза върху биофилмобазуването

Съдържанието на безклетъчни супернатанти на щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 с протеолитична активност в диапазона от 50 µg/ml до 250 µg/ml води до статистически значимо намаляване на оптичната плътност при 540 nm след оцветяване с 0,1 % разтвор на кристал виолет в процеса на култивирането на смесените биофилми ($p<0,05$), като стойността ѝ се установява в тесен интервал от 0,046 до 0,035 при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 ($p>0,05$) и от 0,036 до 0,031 при щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 ($p>0,05$), която значително по-ниска от контролните проби (в отсъствието на протеазна активност) ($p<0,05$). Стойностите на оптичната плътност при оцветяването на с 0,1 % разтвор на кристал виолет на биофилмите, образувани от взаимодействието на двете двойки щамове, не се отличават съществено ($p>0,05$), което се явява резултат от сходния механизъм на действие на протеиназите, секретирани от щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 (фиг. 50).

Въздействието на протеолитично-активните супернатанти, секретирани от щамове *B. subtilis* 170 и *B. subtilis* 168 след култивирането им в среда, съдържаща като азотен източник пептон и глюкоза като въглероден източник, оказва влияние върху популационната структура на смесените биофилми, като с най-висока чувствителност се отличава щам *E. coli* K-12 1655, чиято численост намалява значително

от $(14,2 \pm 0,10) \cdot 10^6$ cfu/ml до $(0,12 \pm 0,00) \cdot 10^4$ cfu/ml при асоциацията му с щам *B.subtilis* 170 и до $(0,02 \pm 0,00) \cdot 10^4$ cfu/ml при взаимодействието им с щам *B.subtilis* 168 вследствие на нарастването на съдържанието на протеолитично-активните супернатанти до 250 µg/ml (табл. 16 и 17). Степента на намаляване на популацията на щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168 е значително по-малка при достигане на съдържанието на протеолитично-активните супернатанти до 150 µg/ml, което е в тясна зависимост от числеността на спорите в структурата на смесените биофилми. Техният брой съставлява $(0,6 \pm 0,00) \cdot 10^2$ cfu/ml в структурата на смесените биофилми на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и представлява 0,32 % от общата численост на микробната популация в образуваната структура при съдържание на протеолитично-активните супернатанти от 150 µg/ml. Числеността на спорите достига до стойност от $(4,2 \pm 0,30) \cdot 10^2$ cfu/ml при биофилмите на двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при същите условия на култивиране в хода на проведеното проучване. Нарастването на относителния дял на протеолитично-активните супернатанти в средата при проведеното проучване възпрепятства образуването на спори в структурата на смесените биофилми (табл. 16 и 17).



Фигура 50. Влияние на съдържанието на протеолитично-активните супернатанти от щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168 след култивирането в среда, съдържаща пептон, при температура от 37 °C за време от 48 h , върху оптичната плътност на смесените биофилми при 540 nm след оцветяване с кристалвиолет (легенда: U/ml - µg супернатант на 1 ml среда M63).

$-y = -0,0059 \cdot x + 0,0523$, $r^2 = 0,9927$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655

$-y = -0,0021 \cdot x + 0,0379$, $r^2 = 0,9720$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655

Таблица 16. Влияние на съдържанието на протеолитично-активни супернатанти на щам *B. subtilis* 170, култивиран в среда на основата на пептон, стимулиращ синтеза на екзопроотеаза, върху числеността на колонии на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и броя на спорите в структурата на смесените биофилми

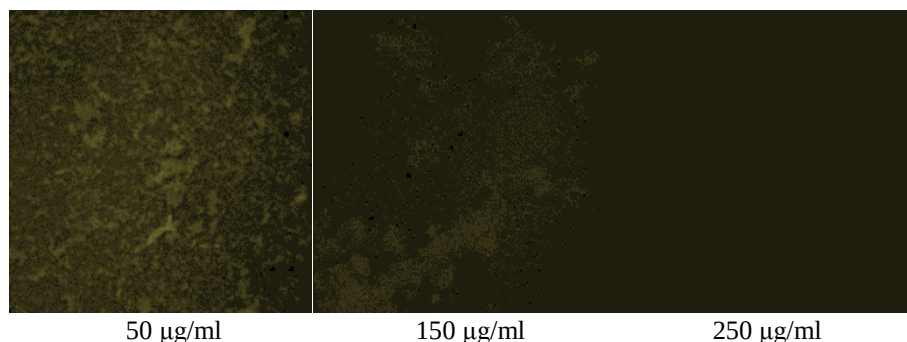
№	Съдържание на супернатант, µg/ml	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 170	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	0	$(15,3 \pm 0,16) \cdot 10^6$	$(14,2 \pm 0,10) \cdot 10^6$	$(5,8 \pm 0,2) \cdot 10^2$
2.	50	$(2,17 \pm 0,02) \cdot 10^4$	$(0,72 \pm 0,03) \cdot 10^4$	$(0,8 \pm 0,00) \cdot 10^2$
3.	150	$(1,57 \pm 0,01) \cdot 10^4$	$(0,27 \pm 0,03) \cdot 10^4$	$(0,6 \pm 0,00) \cdot 10^2$
4.	250	$(0,52 \pm 0,02) \cdot 10^4$	$(0,12 \pm 0,00) \cdot 10^4$	0

Площта на разпространение на биофилмите, образувани от смесени микробни съобщества, се равнява на стойност от $0,34 \mu\text{m}^2$ при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $0,30 \mu\text{m}^2$ при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при съдържание на безклетъчни супернатанти от 50 µg/ml и съставлява приблизително 30 % от контролната проба при отсъствие на инхибиращ агент (фиг. 51 и 52). Стойностите им се снижават пропорционално на нарастването на активността на протеиназата, изолирана от щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168, достигат съответно до $0,16 \mu\text{m}^2$ и $0,13 \mu\text{m}^2$ при нарастването на съдържанието на безклетъчни супернатанти от 250 µg/ml, която е значително

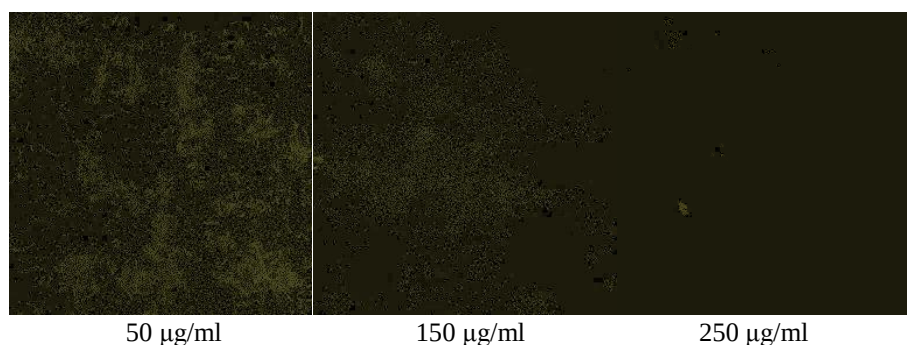
по-ниска спрямо стойностите им при култивирането на смесените биофилми в среда, съдържаща като въглехидратен източник глюкоза и отличаваща се с отсъствие на ензимна активност ($p < 0,05$).

Таблица 17. Влияние на съдържанието на протеолитично-активни супернатанти на щам *B. subtilis* 168, култивиран в среда на основатата на пептон, стимулиращ синтеза на екзопротеаза, върху числеността на колонии на щамове *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 и броя на спорите в структурата на смесените биофилми

№	Съдържание на супернатант, μg/ml	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B. subtilis</i> 168	<i>E. coli</i> K-12 1655	
1.	0	$(10,7 \pm 0,25) \cdot 10^6$	$(10,36 \pm 0,32) \cdot 10^6$	$(15,4 \pm 0,6) \cdot 10^2$
2.	50	$(2,38 \pm 0,05) \cdot 10^4$	$(0,42 \pm 0,02) \cdot 10^4$	$(4,6 \pm 0,4) \cdot 10^2$
3.	150	$(1,66 \pm 0,02) \cdot 10^4$	$(0,06 \pm 0,00) \cdot 10^4$	$(4,2 \pm 0,30) \cdot 10^2$
4.	250	$(0,6 \pm 0,03) \cdot 10^4$	$(0,02 \pm 0,00) \cdot 10^4$	0



Фигура 51. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различно съдържание на протеолитично-активни супернатанти на щамове *B. subtilis* 170, култивиран в среда на основатата на пептон, стимулиращ синтеза на екзопротеаза. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



Фигура 52. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различно съдържание на протеолитично-активни супернатанти на щам *B. subtilis* 168, култивиран в среда на основатата на пептон, стимулиращ синтеза на екзопротеаза. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.

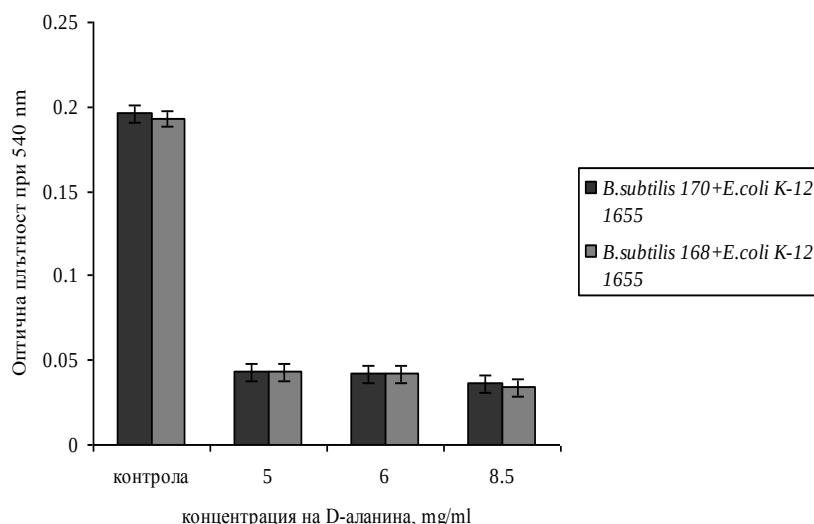
3.2. Влияние на съдържанието на D-аланин върху биофилмобразуването

Внасянето на D-аланин в средата за култивиране в концентрация от 5 mg/ml при проведеното проучване води до значително снижаване на биомасата на биофилмите, като оптичната плътност при 570 nm след оцветяване с кристал виолет се установява до стойност от 0,0432 при двойката щамове *B. subtilis* 170 и *E. coli* K-12 1655 и 0,043 при двойката *B. subtilis* 168 и *E. coli* K-12 1655 при съдържание на D-аланин в средата от 5 mg/ml. Стойността е значително по-ниска в сравнение с култивирането на биофилмите в среда, която не съдържа D-аминокиселини в настоящето проучване ($p < 0,05$). Нарастването на стойността им в границата от 5 mM до 6 mM се съпътства със статистически незначително снижаване на стойността на оптичната плътност при 540 nm при изследваната двойка щамове ($p > 0,05$), докато достигането на концентрацията на D-аланин до 8,5 mM води до установяване

на величината ѝ до 0,036 при биофилмите от двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и 0,034 при биофилмите, образувани от съвместното култивиране на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655, като се забелязва статистически значима разлика спрямо контролната проба ($p < 0,05$) (фиг.53).

Присъствието на D-аланина в средата за култивиране на биофилмите създава условия за изменение на структурата на микробната популация в образуваните биофилми, като се установява в настоящето проучване пропорционално намаляване на числеността на популациите на щамове *B.subtilis* и *E.coli*. Степента на редукция е най-ясно изразена при щам *E.coli* K-12 1655 в структурата на образуваните биофилми в процеса на взаимодействието му с щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168, като при достигане на съдържание на D-аланина от 8,5 mM числеността на популациите му е съответно $(0,20 \pm 0,05) \cdot 10^4$ cfu/ml и $(0,28 \pm 0,02) \cdot 10^4$ cfu/ml и статистически значимо е по-ниска спрямо контролната проба (табл. 18 и 19).

При съдържание на D-аланин в границата от 5 mM до 6 mM се установяват статистически незначими различия в числеността на популациите на щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168 в структурата на образуваните смесени биофилми, които превишават стойностите за щам *E.coli* K-12 1655 и съставляват съответно 0,2 % и 0,3 % от контролните проби. Нарастването на концентрацията на D-аланин до 8,5 mM в средата за култивиране води до численост на популациите от $(2,05 \pm 0,03) \cdot 10^4$ cfu/ml за щам *B.subtilis* 170 и $(2,02 \pm 0,03) \cdot 10^4$ cfu/ml за щам *B.subtilis* 168 в структурата на биофилмите при асоциацията им с щам *E.coli* K-12 1655. По-ниската им скорост на редукция се свързва със способността им към спорообразуване при наличие на D-аминокиселини в средата, като се установява корелация между числеността на спорите и броя на колонии в образуваните биофилми в настоящето изследване. Скоростта на редукция на спорите е значителна в структурата на смесения биофилм на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, като числеността им се изменя от $(5,8 \pm 0,2) \cdot 10^2$ cfu/ml до $(1,0 \pm 0,00) \cdot 10^2$ cfu/ml при промяна на концентрацията на D-аланин в границата от 0 mM до 8,5 mM.



Фигура 53. Влияние на концентрацията на D-аланин върху оптичната плътност на смесените биофилми при 570 nm след оцветяване с кристалвиолет. Култивирането на биофилмите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 в среда M63, към която е добавен D-аланин в концентрация от 5 mM, 6 mM и 8,5 mM, е извършено в 96-ямкови плаки, непосредствено след което беше извършено оцветяване с кристал виолет и отчетена оптичната плътност при 540 nm. Като контрола е използвана среда, несъдържаща D-аланин.

$-y = -0,0034 \cdot x + 0,0472$, $r^2 = 0,9283$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655

$-y = 0,0044 \cdot x + 0,0478$, $r^2 = 0,9681$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655

Формирането на агрегати по време на съвместното развитие на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 се възпрепятства при внасяне на D-аланин в средата за култивиране, всъщност на което се установява силно снижаване на относителната площ на разпространение на образуваните структури (фиг. 54 и 55). Развитието на двойките щамове при внасянето на D-аланин в средата за култивиране се съпътства със снижаване на относителната площ на разпространение на биофилмите, която достига до стойност от $0,19 \mu m^2$ при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и от $0,18 \mu m^2$ при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при

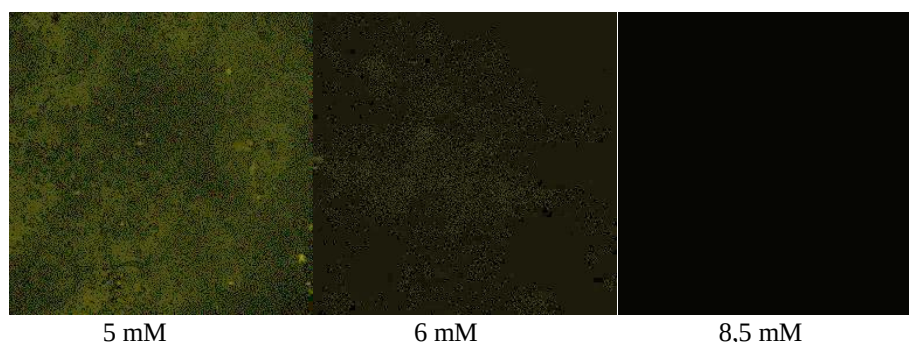
достигане на съдържанието на D-аланин в средата за култивиране от 8,5 mM. Тези величини са значително по-ниски спрямо контролната проба, характеризираща се с отсъствие на инхибитор ($p<0,05$). Стойностите им са значително по-малки спрямо контролните проби ($p<0,05$), а получените резултати се дължат на блокирането на адхезията на клетките върху повърхностния слой на субстрата от D-аланина.

Таблица 18. Влияние на концентрацията на D-аланин в средата за култивиране върху числеността на колонии на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и броя на спорите в структурата на смесените биофилми

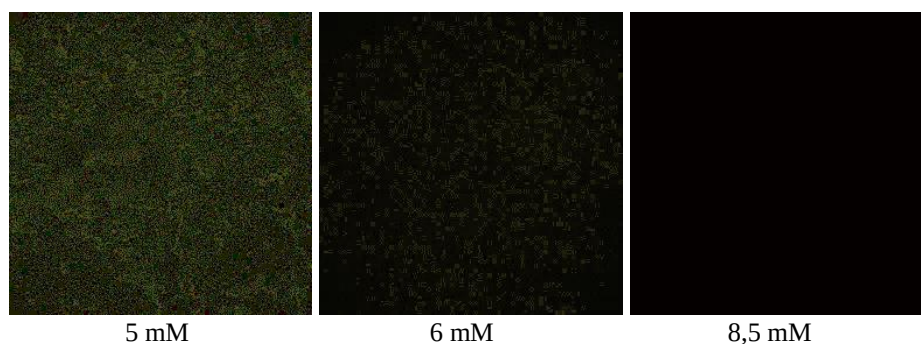
№	Концентрация на D-аланин, mM	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 170	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	0	$(15,3\pm0,16).10^6$	$(14,2\pm0,10).10^6$	$(5,8\pm0,2). 10^2$
2.	5	$(4,1\pm0,26).10^4$	$(1,54\pm0,03). 10^4$	$(3,3\pm0,11). 10^2$
3.	6	$(4,06\pm0,07).10^4$	$(0,22\pm0,03). 10^4$	$(3,13\pm0,11). 10^2$
4.	8,5	$(2,05\pm0,03).10^4$	$(0,20\pm0,05). 10^4$	$(1,0\pm0,00). 10^2$

Таблица 19. Влияние на концентрацията на D-аланин в средата за култивиране върху числеността на колонии на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 и броя на спорите в структурата на смесените биофилми

№	Концентрация на D-аланин, mM	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 168	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	0	$(10,7\pm0,25).10^6$	$(10,36\pm0,32).10^6$	$(15,4\pm0,6). 10^2$
2.	5	$(4,07\pm0,04).10^4$	$(1,47\pm0,04). 10^4$	$(14,5\pm0,5). 10^2$
3.	6	$(3,61\pm0,05).10^4$	$(0,35\pm0,52). 10^4$	$(14,2\pm0,35). 10^2$
4.	8,5	$(2,02\pm0,03).10^4$	$(0,28\pm0,02). 10^4$	$(7,8\pm0,20). 10^2$



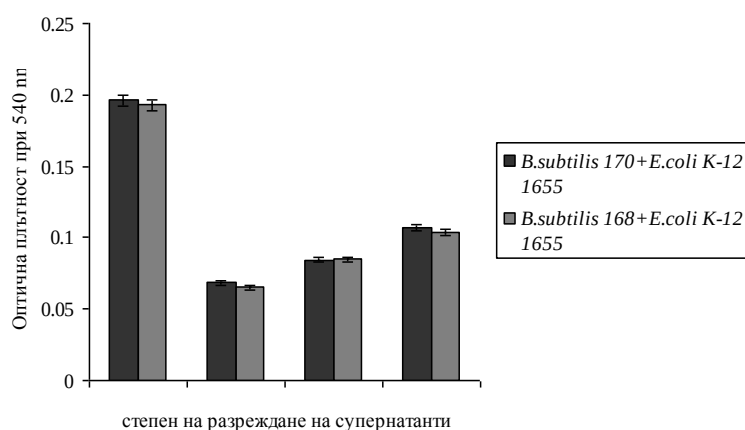
Фигура 54. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни концентрации на D-аланин на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



Фигура 55. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни концентрации на D-аланин на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.

3.3. Влияние на супернатанти на щам *Escherichia coli* K-12 1655 върху подтискането на растежа биофилмите

Наличието на продукти на жизнената дейност при степен на разреждане 1:10 на супернатанти на щам *Escherichia coli* K-12 1655 сред култивирането им в среда триптон-глюкозов бульон за време от 24 h при температура от 37 °C създава условия за чувствително снижаване на биомасата на биофилмите, образувани от смесена микробна популация, като стойността на оптичната плътност се изменя в границата от $0,196 \pm 0,003$ до $0,0685 \pm 0,002$ при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и в диапазона от $0,193 \pm 0,001$ до $0,065 \pm 0,008$ при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655. Намаляването на концентрацията на крайните продукти на метаболизма при щам *Escherichia coli* K-12 1655, което в настоящето проучване се постигна посредством увеличаване на степента на разреждане на супернатантите на основата на триптон-глюкозов бульон до ниво от 1:1000, се съпровожда със статистическо значимо нарастване на стойността на оптичната плътност при 570 nm след оцветяване с 0,1 % разтвор на кристал виолет до $0,107 \pm 0,003$ при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и до $0,104 \pm 0,003$ при щамовете *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 ($p < 0,05$), но като цяло стойностите им са по-ниски в сравнение с контролната проба, при която стойността на оптичната плътност е получена при култивирането на двойката щамове в среда в отсъствие на инхибитор (фиг. 56).



Фигура 56. Влияние на степента на разреждане на супернатанти на щам *E.coli* K-12 1655 върху оптичната плътност на смесените биофилми при 570 nm след оцветяване с кристал виолет. Супернатантите са получени след култивиране на щам *E.coli* K-12 1655 в триптон-глюкозов бульон при 37 °C за 24 h. Култивирането на биофилмите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при различни нива на разреждане на безклетъчните супернатанти на щам *E.coli* K-12 1655 е извършено в 96-ямкови плаки, непосредствено след което беше извършено оцветяване с кристал виолет и отчетена оптичната плътност при 540 nm.

- $y = 0,0193.x + 0,0481$, $r^2 = 0,9891$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655

- $y = 0,0196.x + 0,0457$, $r^2 = 0,9932$, $p < 0,05$ - *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655

Структурата на популациите в образуваните смесени биофилми се доминира от щам *B.subtilis* 170 при степен на разреждане на супернатанти на щам *E.coli* K-12 1655 в границата от 1:10 до 1:100 и от щам *B.subtilis* 168 при ниво на разреждане 1:10, но като цяло числеността им е значително по-ниска спрямо контролните проби (в отсъствието на метаболити, секретирани от щам *E.coli* K-12 1655). Нарастването на порядъка й до 1:1000 води до достигане на численост на популацията на щам *B.subtilis* 170 от $(5,4 \pm 0,52) \cdot 10^4$ cfu/ml в структурата на смесените биофилми, която двукратно превишава стойността за щам *E.coli* K-12 1655 от $(3,0 \pm 0,0) \cdot 10^4$ cfu/ml, което се явява резултат от нарастването на числеността на спорите до $(4,6 \pm 0,26) \cdot 10^2$ cfu/ml, която е статистически неразличима от контролната проба ($p > 0,05$). Числеността на популациите на щам *B.subtilis* 168 нараства до стойност от $(10,2 \pm 0,20) \cdot 10^4$ cfu/ml при промяна на степента на разреждане в диапазона от 1:10 до 1:100 на супернатантите на щам *E.coli* K-12 1655 в структурата на биофилмите. Устойчивостта им към въздействието на метаболитните продукти при проведеното проучване се свързва със значително нарастване на броя на спорите, която достига до стойност от $(8,6 \pm 0,14) \cdot 10^2$ cfu/ml при степен на

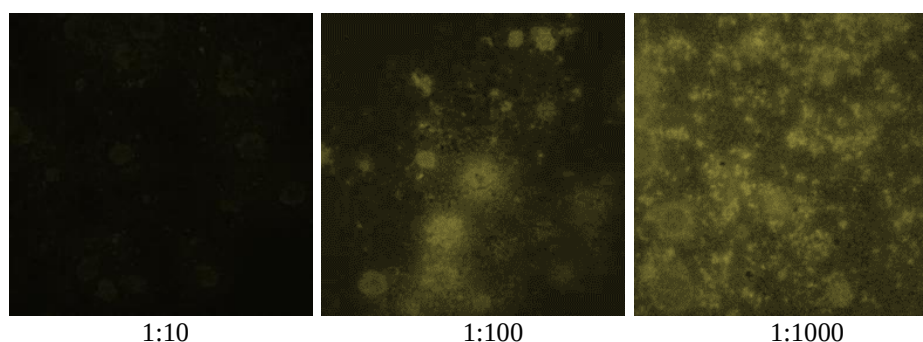
разреждане от 1:1000 и двукратно превишава броя им при биофилмите, образувани от съвместното култивиране на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 ($p<0,05$) (табл. 20 и 21).

Таблица 20. Влияние на степента на разреждане на безклетъчни супернатанти на щам *E.coli* K-12 1655 върху числеността на колонииите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и броя на спорите в структурата на смесените биофилми

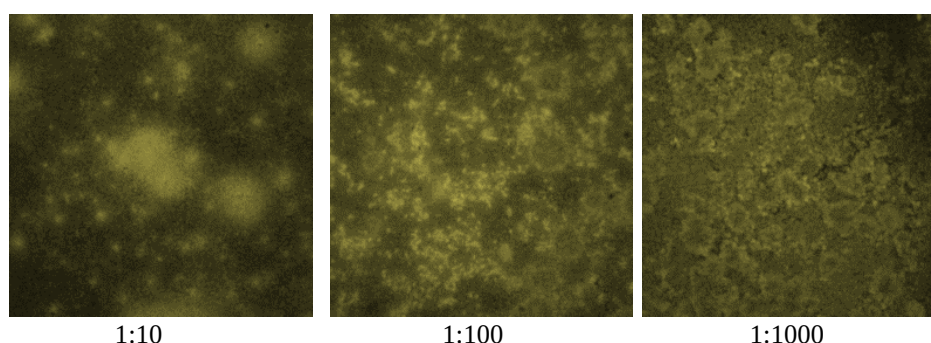
№	Степен на разреждане	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 170	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	Контрола	$(15,3\pm0,16).10^6$	$(14,2\pm0,10).10^6$	$(5,8\pm0,2). 10^2$
2.	10^{-1}	$(1,8\pm0,11).10^4$	0	0
3.	10^{-2}	$(2,8\pm0,06).10^4$	0	$(0,1\pm0,17). 10^2$
4.	10^{-3}	$(5,4\pm0,52).10^4$	$(3,0\pm0,0). 10^4$	$(4,6\pm0,26). 10^2$

Таблица 21. Влияние на степента на разреждане на безклетъчни супернатанти на щам *E.coli* K-12 1655 върху числеността на колонииите на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 и броя на спорите в структурата на смесените биофилми

№	Степен на разреждане	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 168	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	Контрола	$(10,7\pm0,25).10^6$	$(10,36\pm0,32).10^6$	$(15,4\pm0,6). 10^2$
2.	10^{-1}	$(7,36\pm0,40).10^4$	0	0
3.	10^{-2}	$(9,66\pm0,55).10^4$	$(4,4\pm0,52). 10^4$	$(1,13\pm0,05). 10^2$
4.	10^{-3}	$(14,2\pm0,20).10^4$	$(4,7\pm0,61). 10^4$	$(8,6\pm0,14). 10^2$



Фигура 57. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни стойности на pH на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



Фигура 58. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни стойности на pH на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.

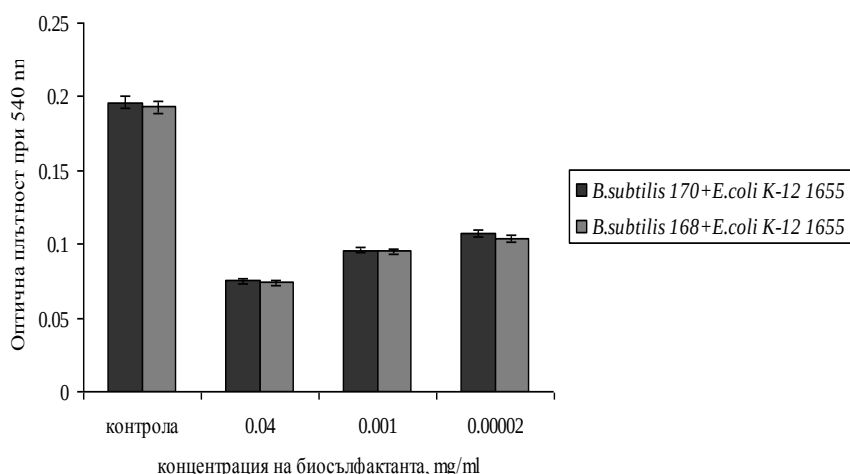
Относителната площ на разпространение на биофилмите, формирани в настоящето проучване в резултат на съвместното култивиране на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, се изменя линейно при степента на разреждане на средата за култивиране със супернатанти на щам *E.coli* K-12 1655 в

границата от 1:10 до 1:1000, получени от развитието му в среда триптон-глюкозав бульон. Зависимостта има същия характер и при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655. Достигането на степента на разреждане от 1:1000 се съпровожда с формирането на структури, отличаващи се с относителна площ на разпространение от $0,53 \mu\text{m}^2$ за двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $0,54 \mu\text{m}^2$ при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655, която е по-висока спрямо степента на разреждане на безклетъчните супернатанти от 1:10 ($p < 0,05$) (фиг.57 и 58).

3.4. Влияние на биосърфактанта, изолиран от щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Bacillus subtilis* 168 върху дисперсията на биофилмите

Нарастването на концентрацията на биосърфактанта в средата от 0,0002 до 0,04 mg/ml води до пропорционално снижаване на биомасата на образуваните биофилми, като се установява линейна зависимост между двете величини в резултат на проведеното проучване ($r^2=0,9685$). Оптичната плътност при 570 nm след оцветяване с кристал виолет се отличава със стойност от $0,107 \pm 0,003$ при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 при съдържание на биосърфактант от 0,0002 mg/ml, която незначително намалява до стойност от $0,075 \pm 0,002$ вследствие на увеличаването на концентрацията до 0,04 mg/ml ($p > 0,05$). Аналогична закономерност се установява при образуването на биофилми от съвместното култивиране на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при промяна на съдържанието на биосърфактант в средата за култивиране в границата от 0,0002 до 0,04 mg/ml, като оптичната плътност се снижава до $0,074 \pm 0,003$ при внасянето на биосърфактант в концентрация от 0,04 mg/ml (фиг. 59).

С най-голяма чувствителност на действието на биосърфактантите се отличава щам *E.coli* K-12 1655, като числеността на популациите му намалява до $(0,12 \pm 0,00) \cdot 10^4$ cfu/ml при асоциацията му с щам *B.subtilis* 170 и $(0,02 \pm 0,00) \cdot 10^4$ cfu/ml в процеса на взаимодействието му с щам *B.subtilis* 168 в структурата на образуваните смесени биофилми при съдържание на биосърфактант от 0,04 mg/ml. Броят на колонии на щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168 не отличава значително при концентрация на биосърфактанта в интервала от 0,0002 mg/ml до 0,01 mg/ml ($p > 0,05$) и чувствително се понижава с увеличаване на стойността му до 0,04 mg/ml ($p < 0,05$) (табл. 41 и 42). Установената зависимост се явява резултат от наличието на спори в структурата на биофилмите, чиято численост достига до $(0,6 \pm 0,00) \cdot 10^2$ cfu/ml при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $(4,2 \pm 0,30) \cdot 10^2$ cfu/ml при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при съдържание на биосърфактант от 0,01 mg/ml, което значително се отличава от контролната проба, при отсъствие на биосърфактант. При концентрация на биосърфактанта в диапазона от 0,0002 до 0,01 mg/ml между стойностите им не се установяват статистически значими разлики, докато нарастването на съдържанието му до 0,04 mg/ml се съпровожда с възпрепятстването на спорообразуването в структурата на смесените биофилми (табл. 22 и 23).



Фигура 59. Влияние на биосърфактантите, изолирани от щам *B.subtilis* 170, върху оптичната плътност на смесените биофилми при 540 nm след оцветяване с кристалвиолет. Сърфактантът е изолиран от щам *B.subtilis* 170 след култивирането в среда, съдържаща пептон. Култивирането на биофилмите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при различни нива на разреждане на супернатанти на щам *B.subtilis* 170, при което съдържанието на

биосърфактант е 0,04; 0,001 и 0,0002 µg/ml, определено тегловно, е извършено в 96-ямкови плаки, непосредствено след което беше извършено оцветяване с кристал виолет и отчетена оптичната плътност при 540 nm.

-y=0,016.x+0,0607, r²=0,96851, p<0,05 - *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655

- y=0,015.x+0,0608, r²=0,9521, p<0,05 -*B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655

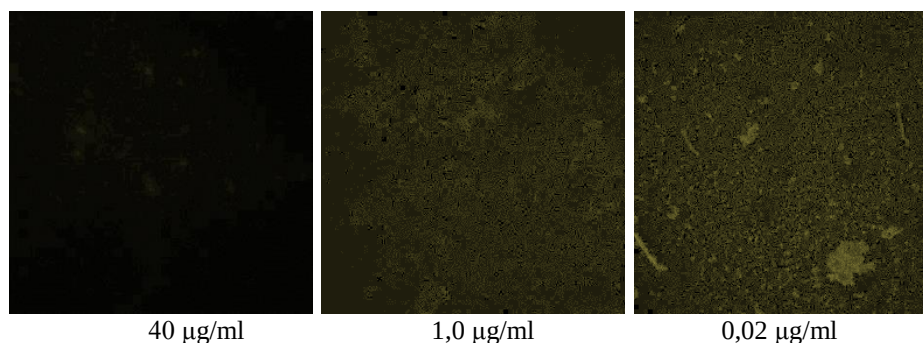
Таблица 22. Влияние на концентрацията на сърфактанта върху числеността на колонииите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и броя на спорите в структурата на смесените биофилми

№	Концентрация на сърфактанта, mg/ml	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 170	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	0	(15,3±0,16).10 ⁶	(14,2±0,10).10 ⁶	(5,8±0,2). 10 ²
2.	0,00002	(2,17±0,02).10 ⁴	(0,72±0,03). 10 ⁴	(0,8±0,00). 10 ²
3.	0,001	(1,57±0,01).10 ⁴	(0,27±0,03). 10 ⁴	(0,6±0,00). 10 ²
4.	0,04	(0,52±0,02).10 ⁴	(0,12±0,00). 10 ⁴	0

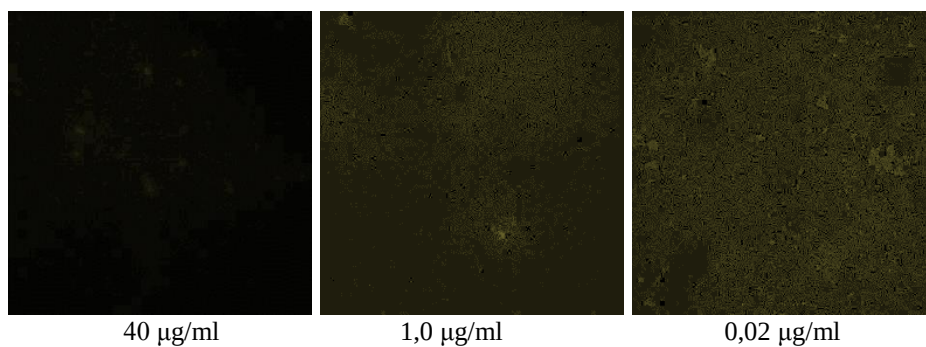
Таблица 23. Влияние на концентрацията на сърфактанта върху числеността на колонииите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и броя на спорите в структурата на смесените биофилми

№	Концентрация на сърфактанта, mg/ml	Численост в смесените биофилми, cfu/ ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 168	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	0	(10,7±0,25).10 ⁶	(10,36±0,32).10 ⁶	(15,4±0,6). 10 ²
2.	0,00002	(2,38±0,05).10 ⁴	(0,42±0,02). 10 ⁴	(4,6±0,4). 10 ²
3.	0,001	(1,66±0,02).10 ⁴	(0,06±0,00). 10 ⁴	(4,2±0,30). 10 ²
4.	0,04	(0,6±0,03).10 ⁴	(0,02±0,00). 10 ⁴	0

Относителната площ на разпространение на смесените биофилми се равнява на 0,99 µm² при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, която се понижава до стойност от 0,39 µm² при внасянето на биосърфактант в концентрация от 40 µg/ml в средата за култивиране. Стойността й нараства линейно при промяна на концентрацията му в границата от 40 µg/ml до 0,02 µg/ml. Сходна закономерност се установява при съвместното култивиране на двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 под влиянието на променящата се концентрация на биосърфактанта, изолиран от щам *B.subtilis* 170 (фиг.60 и 61).



Фигура 60. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни концентрации на сърфактант на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



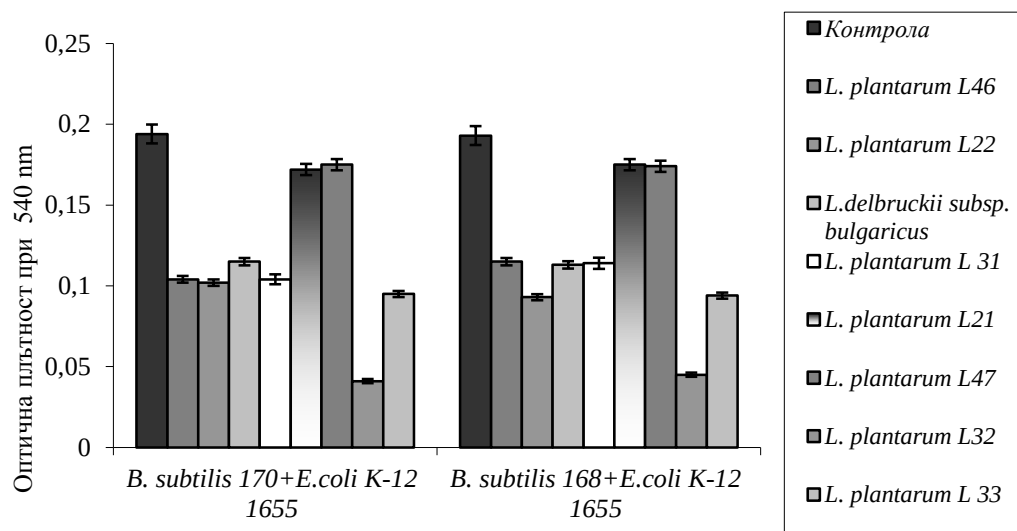
Фигура 61. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 при различни концентрации на сърфактант на средата. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.

5. Влияние на активността на щамове *Lactobacillus* върху дисперсията на биофилми от смесени популации на щамове

Способността на щамове *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus bulgaricus* да инхибират процеса на биофилмообразуване, за които са установени свойствата им на пробиотици в предходни проучвания [Дисертация за дбн, Св.Данова, 2015, БАН], е проучена. Най-висока чувствителност на биофилмите от смесените популации на щамове се установява в присъствието на метаболити, секретирани от щам *Lactobacillus plantarum* L32. Стойността на оптичната плътност при налчието на метаболити, секретирани от щамове *Lactobacillus* след култивирането им в среда MRS бульон, съставлява $0,041 \pm 0,002$ при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $0,045 \pm 0,003$ в резултат на съвместното култивиране на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655, което представлява 4,36 % и 4,83 % спрямо контролните проби при проведеното проучване (фиг.62).

С най-слаба антибиофилмообразуваща способност се отличават метаболитните продукти, образувани от щамове *Lactobacillus plantarum* L21 и *Lactobacillus plantarum* L47, като стойностите на оптичната плътност след оцветяване с кристал виолет със съответно $0,175 \pm 0,028$ и $0,172 \pm 0,032$ при биофилмите на двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и съставляват 88,7-90,05 % от контролната проба. Процентът на намаление на биомасата на биофилмите при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 достига до стойност от 90,44 % под влияние на секреторните метаболити на щам *Lactobacillus plantarum* L21 и 90,27 % при внасяне на безклетъчни супернатанти на щам *Lactobacillus plantarum* L47 при проведено проучване. Щам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* също се отличава с висока антибиофилм образувача способност както при смесената популация на *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, така и при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655. В сравнение с щам *Lactobacillus plantarum* L32 тя е по-слабо изразена (фиг.62).

Наличието на метаболити от щам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* обуславят относително еднакво разпространение на популации от щамове на вида *B.subtilis* и *E.coli* в структурата на биофилмите, които съставляват 0,45 % от контролната проба (табл.24, табл.25). Силно снижаване на числеността на популациите на щамове *B.subtilis* 170 и *B.subtilis* 168 при асоциацията им с щам *E.coli* K-12 1655 се наблюдава в присъствието на метаболити от щамове *Lactobacillus plantarum* L33, *Lactobacillus plantarum* L22, *Lactobacillus plantarum* L31, *Lactobacillus plantarum* L46, докато щам *E.coli* K-12 1655 проявява най-висока чувствителност при въздействието на метаболитите на всички щамове на вида *Lactobacillus plantarum*. Отсъствието на спорообразуващи клетки в биофилмите при изследваните двойки щамове се установява при наличието на метаболити от щам *Lactobacillus plantarum* L32.



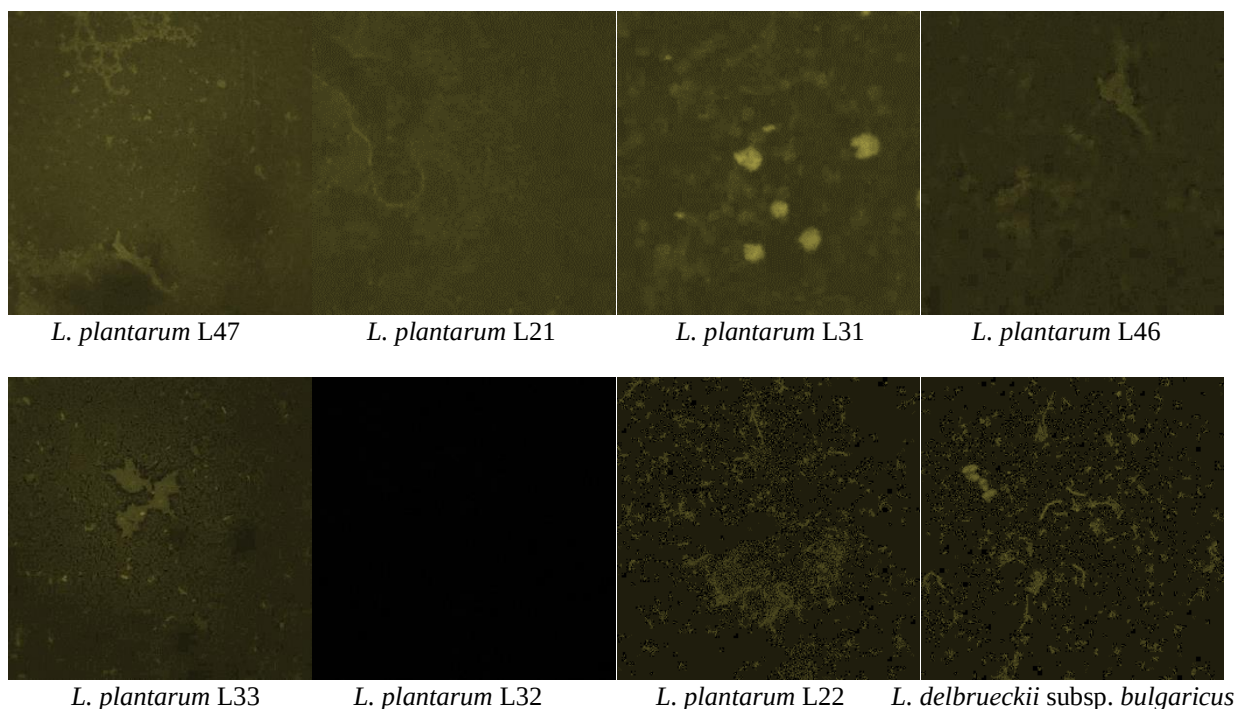
Фигура 62. Влияние на супернатанти на млечноисели бактерии върху биомасата на биофилмите. Биофилмите са култивирани в среда М63 при температура от 20 °С за време от 24 h, съдържаща сурпенанти на щамове *Lactobacillus* при ниво на разреждане от 1:10, получени след култивирането им в течна хранителна среда MRS бульон при температура от 37 °С.

Табл. 24. Влияние на супернатантите от щамове *Lactobacillus* върху структурата на съобществото на биофилмите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655

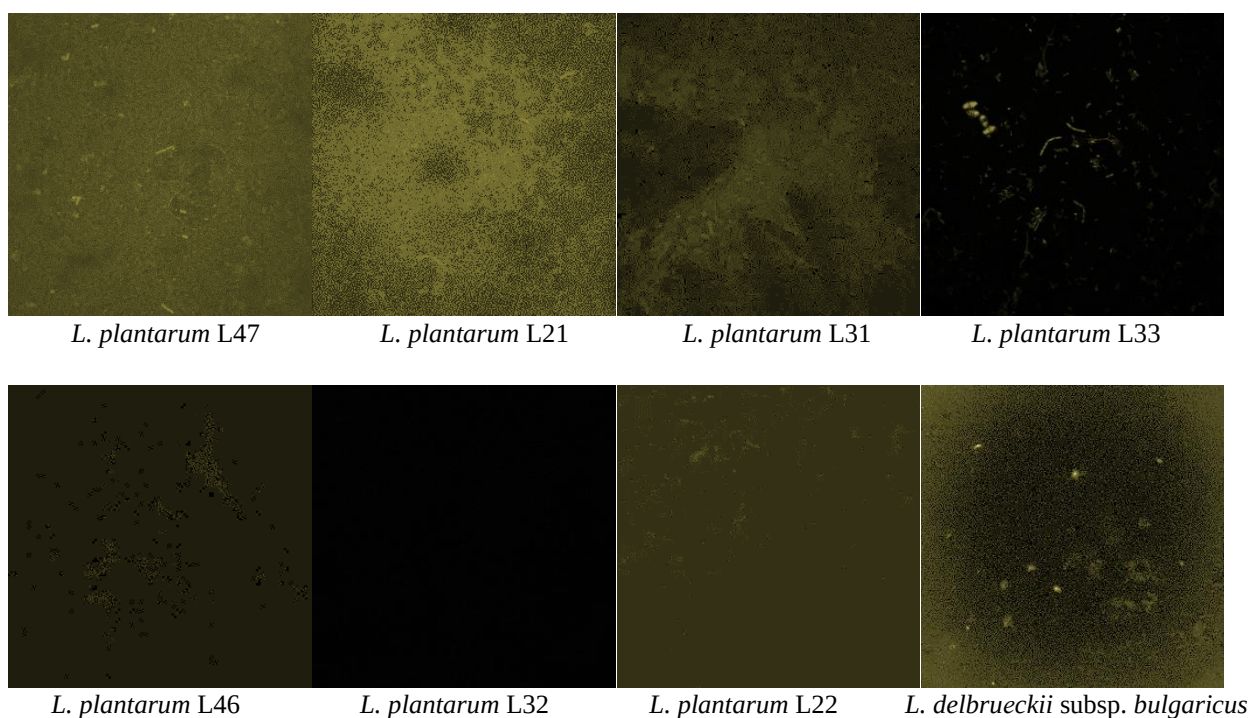
№	Щам	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 170	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	Контрола	$(15,3 \pm 0,16) \cdot 10^6$	$(14,2 \pm 0,10) \cdot 10^6$	$(5,8 \pm 0,2) \cdot 10^2$
2.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L46	$(4,66 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(0,8 \pm 0,0) \cdot 10^2$
3.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L22	$(4,2 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,86 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(0,3 \pm 0,0) \cdot 10^2$
4.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	$(4,53 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(4,8 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(2,6 \pm 0,0) \cdot 10^2$
5.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L31	$(4,8 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(0,4 \pm 0,0) \cdot 10^2$
6.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L21	$(15,26 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(0,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$	0
7.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L47	$(22,6 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(3,0 \pm 0,2) \cdot 10^4$	0
8.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L32	0	0	0
9.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L33	$(6,26 \pm 0,3) \cdot 10^4$	0	0

Табл. 25. Влияние на супернатантите от щамове *Lactobacillus* върху структурата на съобществото на биофилмите на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655

№	Щам	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 168	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	Контрола	$(10,7 \pm 0,25) \cdot 10^6$	$(10,36 \pm 0,32) \cdot 10^6$	$(5,4 \pm 0,6) \cdot 10^2$
2.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L 46	$(4,3 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(1,33 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(0,7 \pm 0,0) \cdot 10^2$
3.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L22	$(4,66 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(1,26 \pm 0,5) \cdot 10^4$	$(0,2 \pm 0,0) \cdot 10^2$
4.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	$(4,8 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(4,4 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(2,8 \pm 0,0) \cdot 10^2$
5.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L31	$(4,06 \pm 0,11) \cdot 10^4$	$(1,27 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(0,4 \pm 0,0) \cdot 10^2$
6.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L21	$(11,2 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(0,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(1,2 \pm 0,0) \cdot 10^2$
7.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L47	$(21,2 \pm 0,4) \cdot 10^4$	$(3,6 \pm 0,2) \cdot 10^4$	0
8.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L32	0	0	0
9.	<i>Lactobacillus plantarum</i> L33	$(6,86 \pm 0,4) \cdot 10^4$	0	0



Фигура 63. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 в присъствие на супернатанти на щамове *Lactobacillus* при степен на разреждане от 1:10. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



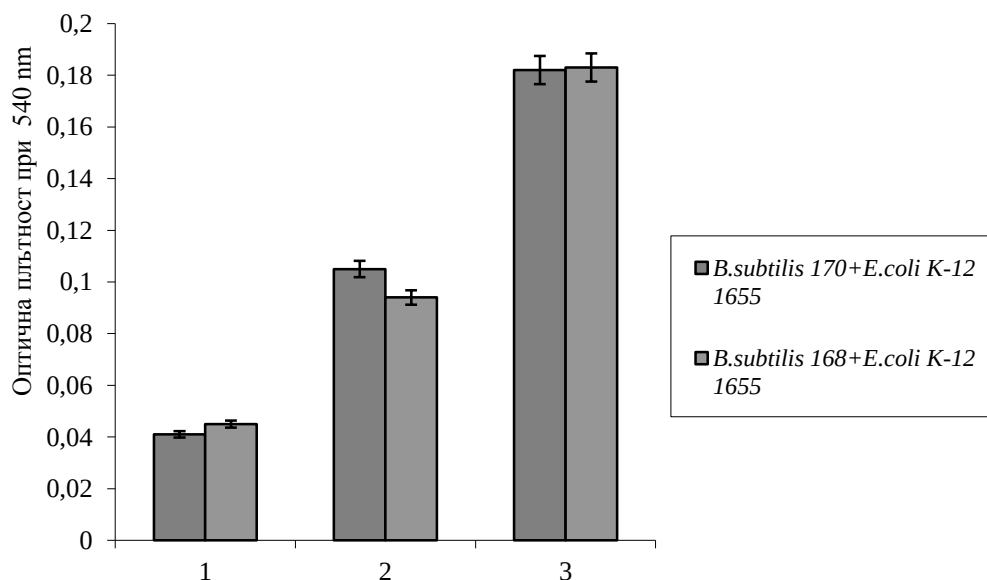
Фигура 64. Микроскопско изследване на биофилмите на щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655 в присъствие на супернатанти на щамове *Lactobacillus* при степен на разреждане от 1:10. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.

От получените данни става ясно, че щам *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* стимулира процеса на спорообразуване в структурата на биофилмите от щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 в сравнение с щамове на вида *Lactobacillus plantarum*. Числеността на спорите в образуваните структури при тези условия на култивиране при проведеното проучване се движи в диапазона от $(2,6 \pm 0,0) \cdot 10^2$ cfu/ml до $(2,8 \pm 0,0) \cdot 10^2$ cfu/ml и силно се снижава при замяната със супернатанти на щамове *Lactobacillus plantarum* L 46, *Lactobacillus plantarum* L22,

Lactobacillus plantarum L31 ($p<0,05$), при които стойностите им се установяват в тесен интервал ($p>0,05$). Присъствието на метаболити, секретирани от щамове *Lactobacillus plantarum* L21, *Lactobacillus plantarum* L47, *Lactobacillus plantarum* L32, *Lactobacillus plantarum* L33 не води до появата на спори в структурата на образуваните биофилми от изследваните щамове (табл. 24 и 25).

Най-силно понижаване на стойността на относителната площ на разпространение на образуваните структури при проведеното проучване се наблюдава при наличие на секреторни метаболити в средата, внесени със супернатантите на щам *Lactobacillus plantarum* L32 ($p<0,05$), докато отношението на площта на разпространение към обема им нараства до $0,45 \mu\text{m}^2$ за двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $0,39 \mu\text{m}^2$ при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655, като значително надхвърля размера ѝ при контролната проба ($p<0,05$). Стойностите им значително се отличават спрямо контролната проба при щамове *L. plantarum* L46, L22, L31, L33 и *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ($p<0,05$), докато относителната площ на разпространение не се различава значително при отсъствие на инхибиторни съединения при щамове *L. plantarum* L21 и *L. plantarum* L47 както при биофилмите на двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, така и на структурите, образувани в резултат на съвместното култивиране на двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 върху повърхността на предметни стъкла при настоящето изследване ($p>0,05$) (фиг.63 и 64).

Снижаването на активността на супернатантите от млечнокиселите бактерии се съпровожда с нарастването на биомасата на биофилмите при статичното им култивиране в настоящето проучване, като оптичната плътност се изменя от 0 до $0,182 \pm 0,003$ за двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $0,183 \pm 0,002$ при *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при нарастване на разреждането на супернатанта от щам *Lactobacillus plantarum* L32 в границата 10^{-1} - 10^{-3} (фиг. 65).



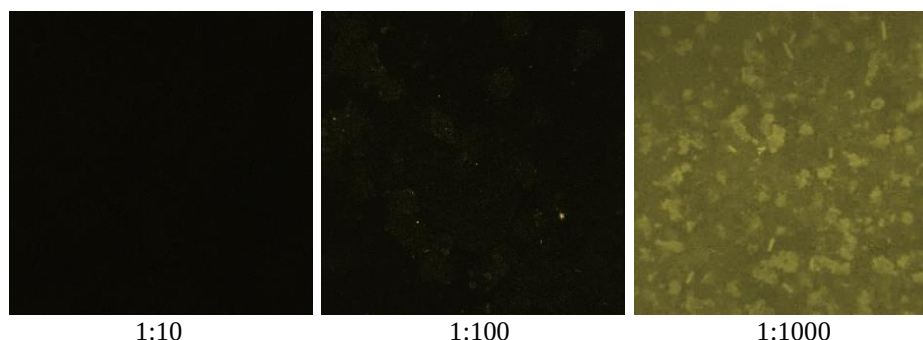
Фигура 65. Влияние на степента на разреждане на супернатанти на щам *Lactobacillus plantarum* L32 върху биомасата на биофилмите: 1. 1:10; 2. 1:100; 3. 1:1000

$y=0,0705 \cdot x-0,0317$, $r^2=0,9972$ - *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655

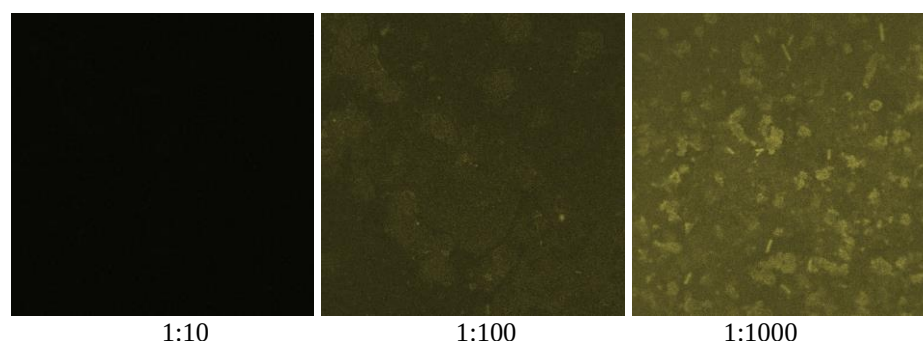
$y=0,069 \cdot x-0,0303$, $r^2=0,9753$ - *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655

Относителната площ на разпространение на биофилмите при проведеното проучване съставлява $0,89 \mu\text{m}^2$ за двойката щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655 и $0,87 \mu\text{m}^2$ при култивирането на двойката щамове *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 1655. Стойността ѝ се изменя също линейно в зависимост от степента на разреждане на безклетъчните супернатанти на щам *Lactobacillus plantarum* L32 в диапазона от 1:10 до 1:1000. Високото равнище на разреждане на безклетъчните супернатанти на щам *Lactobacillus plantarum* L32 от 1:1000 води до формиране на биофилми при двойката щамове *Bacillus subtilis* 170 и *Escherichia coli* K-12 1655, чиято площ на разпространение е $0,79 \mu\text{m}^2$ и се доближава до контролната проба ($p>0,05$). Същите условия на култивиране водят до формиране на структура от асоциацията на щамове *Bacillus subtilis* 168 и

Escherichia coli K-12 1655, отличаваща се с площ на разпространение от $0,75 \mu\text{m}^2$, която статистически не се различава от контролната проба ($p>0,05$) (фиг. 66 и 67).



Фигура 66. Влияние на степента на разреждане на супернатанти на *Lactobacillus plantarum* L32 върху морфологичните характеристики на биофилмите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C.



Фигура 67. Влияние на степента на разреждане на супернатанти на *Lactobacillus plantarum* L32 върху морфологичните характеристики на биофилмите на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655. Растежът на биофилмите е осъществен върху предметни стъкла за време от 24 h при температура от 20 °C

Намаляването на съдържанието на метаболитните продукти, което в настоящето проучване е постигнато чрез увеличаване на степента на разреждане, се съпровожда с пропорционално увеличаване на числеността на популациите в смесените биофилми на изследваната двойка щамове, при които ролята на доминантен вид се изпълнява от щамове на вида *B.subtilis* (табл. 26, табл.27). Числеността на колонии им в структурата на биофилмите достига до стойности от $(8,3 \pm 0,30) \cdot 10^4$ cfu/ml за двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и $(5,6 \pm 0,52) \cdot 10^4$ cfu/ml за двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 при степен на разреждане от 10^{-3} , което многократно превишава числеността на щамове *E.coli* K-12 1655 ($p<0,05$). Получените стойности са в тясна връзка с индуцирането на процеса на спорообразуване, като общият брой спори в смесените биофилми достига до стойност от $(0,4 \pm 0,0) \cdot 10^2$ cfu/ml при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12, което е приблизително два пъти по-малко от стойността им при щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655. Процентът на спорите в структурата на биофилмите съставлява от 0,02 % при двойката щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 до 0,2 % при двойката щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655, което потвърждава извода в проучването на Hamon и Lazazzera [2001], че спорообразуването не се явява важно условие за осъществяване на развитието на биофилмите при щамове на вида *B.subtilis*. Сходна закономерност се установява при асоциацията му с щам *E.coli* K-12 1655 при наличието на метаболити, образувани от щам *Lactobacillus plantarum* L32 в настоящето изследване.

Табл. 26. Влияние на степента на разреждане на супурантант от щам *Lactobacillus plantarum* L32 върху числеността на колонииите в структурата на биофилмите на щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655 и спорите

№	Степен на разреждане	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 170	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	Контрола	$(15,3 \pm 0,16) \cdot 10^6$	$(14,2 \pm 0,10) \cdot 10^6$	$(5,8 \pm 0,2) \cdot 10^2$
2.	10^{-1}	0	0	0
3.	10^{-2}	$(1,66 \pm 0,11) \cdot 10^4$	$(0,2 \pm 0,0) \cdot 10^4$	$(0,2 \pm 0,0) \cdot 10^2$
4.	10^{-3}	$(8,3 \pm 0,30) \cdot 10^4$	$(0,2 \pm 0,0) \cdot 10^4$	$(0,4 \pm 0,0) \cdot 10^2$

Табл. 27. Влияние на степента на разреждане на супурантант от щам *Lactobacillus plantarum* L32 върху числеността на колонииите в структурата на биофилмите на щамове *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 и спорите

№	Степен на разреждане	Численост в смесените биофилми, cfu/ml		Спори cfu/ml
		<i>B.subtilis</i> 168	<i>E.coli</i> K-12 1655	
1.	Контрола	$(10,7 \pm 0,25) \cdot 10^6$	$(10,36 \pm 0,32) \cdot 10^6$	$(5,4 \pm 0,6) \cdot 10^2$
2.	10^{-1}	0	0	0
3.	10^{-2}	$(0,6 \pm 0,00) \cdot 10^4$	$(0,4 \pm 0,0) \cdot 10^4$	$(0,8 \pm 0,0) \cdot 10^2$
4.	10^{-3}	$(5,6 \pm 0,52) \cdot 10^4$	$(0,6 \pm 0,0) \cdot 10^4$	$(1,8 \pm 0,0) \cdot 10^2$

V.ИЗВОДИ

1. Стойностите на температурата и рН на средата дават отражение върху степента на ко-агрегация щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12, като максимална стойност в индекса на ко-агрегация се постига в кисела (рН 5,0) и алкална (рН 8,0) среда, а процесът се инхибира при наличие на Tween, Triton и N-ацетилглюкозамин.
2. С най-висок индекс на ко-агрегация се отличават двойките щамове *B.subtilis* 170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655, което се явява резултат от тяхната автоагрегационна способност. Стойността му корелира с оптичната плътност на биофилмите, формирани с тяхно участие, която също показва най-висока стойност при проведено проучване.
3. Снай-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 отличават глюкозата и соевият хидролизат
4. Температурата на култивиране над 30 °С, нарастването на рН-стойността на средата над рН 6,0, внасянето на Fe^{+2} и NaCl в концентрация над 100 mM се отразяват неблагоприятно върху процеса на формиране на биофилми с участието на щамове *B.subtilis*170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis*168 и *E.coli* K-12 1655.
5. Съдържанието на глюкоза, лактоза, захароза, малтоза и казеин в средата за култивиране обуславя доминантната роля на щамове *B.subtilis*170 и *B.subtilis*168 при взаимодействието им с щам *E.coli* K-12 1655 в структурата на смесените биофилми, докато популацията им при култивирането в среда, съдържаща лактоза, соево-казеинов хидролизат в концентрация от 2,0 %, нарастването на температурата на култивиране над 30 °С, рН на средата над 6,0 , се съставлява само от щамове *B.subtilis*170 и *B.subtilis*168, а съдържанието на Fe^{+2} от 100 μM обуславя еднаквото съотношение на популациите на двата щам в структурата на биофилмите.

6. Отделните въглехидратни и 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.
7. 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 от нарастването на рН-стойността и съдържанието на Fe^{+2} , докато концентрацията на глюкоза от 0,5 %, високата температура и осмотичност инхибира тяхното формиране.
8. Супернатантата с евентуална протеолитична активност и внасянето на D-аланин в средата за култивиране води до значително снижаване на биомасата 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, като ефектът ѝ е по-слабо изразен спрямо присъствието на супернатанти на щам *E.coli* K-12 1655 и сърфактант на щам *B.subtilis*170.
9. Негативното въздействие на екзопротеазата, D-аланина, супернатантите на щам *E.coli* K-12 1655 и биосърфактанта върху образуването на биофилми на щамове *B.subtilis*170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis* 168 и *E.coli* K-12 1655 се обуславя от тяхната концентрация, като намаляването ѝ се съпровожда с доближаване до контролната проба при отсъствие на инхибитор.
10. Отделните метаболитни продукти, съдържащи се в супернатантите на щамове *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus dedlbrueckii* subsp. *bulgaricus*, имат различно отражение върху процеса на образуването на биофилми от съвместното култивиране на двойките щамове *B.subtilis*170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis*168 и *E.coli* K-12 1655, като с най-силно изразена инхибиторна способност се отличават безклетъчните супернатанти на щам *L. plantarum* L32. Доказано е, че ефектът на тази супернатанта е пропорционален на нейната концентрация.

ПРИНОСИ

1. За първи път е проучен механизмът на ко-агрегация при взаимодействието на щамове *B.subtilis* и *E.coli* K-12.
2. Установено е влиянието на факторите на средата върху биомасата 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, техните структурни характеристики, формите на взаимоотношения между двата щам.
3. Проучено е влиянието на секреторни метаболити на щамове *B.subtilis*170, *B.subtilis*168 и *E.coli* K-12 1655 върху процеса на образуване на смесени биофилми и техните структурно-морфологични характеристики.
4. За първи път е доказано влиянието на секреторни метаболити на щамове *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus dedlbrueckii* subsp. *bulgaricus* с потенциален пробиотичен ефект, изолирани от дамашно приготвени ферментационни млечнокисели продукти, върху процеса на формиране на биофилми с участието на двойките щамове *B.subtilis*170 и *E.coli* K-12 1655, *B.subtilis*168 и *E.coli* K-12 1655 и техните структурни характеристики.

VI. НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

Статии

1. Ganchev I., S. Mihailova (2016). Mechanism of bacterial co-aggregation between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* K-12 strains. *Bulgarian Chemical Communications, Volume 48, Special Issue G* (pp. 136-141)
2. Ganchev I. (2018). Antibiofilm Activity of *Lactobacillus* Strains. *Science Journal of Chemistry*, 6(5):77-82
3. Ganchev I. (2018). Biofilm Formation between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* K-12 Strains at Acidic and Oxidative Stress. *Science Journal of Chemistry* /accepted/

Доклади

1. И. Ганчев Образуване на биофилми между щамове на вида *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* като моделна система за изучаване на процесите в почвата при ниско съдържание на хумусни вещества – Четвърта национална конференция на Българско дружество по хумусни вещества с международно участие, 8-10 септември 2016 г., София
2. I. Ganchev. Effect of medium content on biofilm formation between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* K-12 strains, Advanced Materials and technologies, 10-11 October 2016, Sofia
3. I. Ganchev. Effect of pH and temperature on biofilm formation between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* K-12 strains, Advanced Materials and technologies, 10-11 October 2016, Sofia
4. И. Ганчев. Ефект на глюкозата върху характеристиките на биофилмите, образувани от щамове на вида *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* – XV Национална конференция за студенти и докторанти, 18-20 май 2016 г., София
5. И. Ганчев. Влияние на състава на средата върху формите взаимоотношения между щамове *Bacillus subtilis* 170, *Bacillus subtilis* 168 и *Escherichia coli* K-12 в структурата на биофилмите - XV Национална конференция за студенти и докторанти, 18-20 май 2016 г., София
6. I. Ganchev. Induced by glucose formation of biofilms by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* K-12 strains-Workshop on Food-borne Pathogens and Food Safety, 26-27 May 2016, Sofia
7. I. Ganchev. Interspecies Relationship in the Structure of Biofilms - Workshop on Food-borne Pathogens and Food Safety, 26-27 May 2016, Sofia
8. I. Ganchev. Effect of medium content on biofilm formation between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* K-12 strains, Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 16-18 May 2016, Sofia
9. I. Ganchev. Interspecies Relationship in the Structure of Biofilms, Experimental Models and Methods in Biomedical Research, 16-18 May 2016, Sofia
10. И. Ганчев, С. Михайлова. Ко-агрегация между щамове *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli* K-12 - Екология и Здраве 2016, 9-10 юни 2016, Пловдив
11. I. Ganchev. Mechanism of bacterial co-aggregation, Biological Activity of Metals and Natural Products, 17-19 November 2015, Sofia

12. I. Ganchev. Co-aggregation between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* K-12 strains, Biological Activity of Metals and Natural Products, 17-19 November 2015, Sofia
13. I. Ganchev. Mechanism of co-aggregation between *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* K-12 strains, Interdisciplinary Chemistry, 15-17 April 2016, Sofia