

Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева
Факультет биотехнологии и промышленной экологии
Кафедра биотехнологии

На правах рукописи

ПЛЮТА ВЛАДИМИР АЛЕКСАНДРОВИЧ

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК И QUORUM SENSING
РЕГУЛЯЦИЯ ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ АГЕНТОВ

Специальность 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Специальность 03.02.03 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители (консультанты):
профессор, доктор биологических наук
Хмель Инесса Александровна;
кандидат технических наук,
доцент Кузнецов Александр Евгеньевич

Москва–2014г.

I. ВВЕДЕНИЕ.....	4
II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
Микробные биопленки: общая характеристика и функции.....	9
Внеклеточный биопленочный матрикс, его состав и роль отдельных компонентов.....	15
Мультимерные поверхностные клеточные структуры; роль в образовании биопленок.....	19
Участие катионов металлов в адгезии и образовании биопленок.....	20
Роль циклического димерного гуанозин монофосфата (c-di-GMP) в регуляции формирования биопленок.....	21
Биопленка <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Роль биопленок в инфекционном процессе. Резистентность бактерий, живущих в биопленках, к антибактериальным агентам.....	26
Методы борьбы с микробными биопленками: подходы к профилактике образования или разрушения биопленок.....	33
Преимущества использования биопленок в биотехнологии.....	44
Quorum Sensing системы регуляции экспрессии генов бактерий.....	46
QS системы регулирования и формирование биопленки <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
QS системы <i>P. aeruginosa</i>	52
Ингибиторы QS систем регуляции	58
III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	63
1. Среды и условия культивирования.....	63
2. Штаммы, плазмиды и олигонуклеотиды.....	63
3. Определение продукции АГЛ.....	66
4. Определения действия исследованных веществ на <i>lux</i> -биосенсоры.....	67
5. Экстракция АГЛ из супернатантов культур и анализ экстрактов.....	69
6. Определение образования биопленок	70
7. Методы работы с ДНК.....	71
8. Перенос плазмид.....	72
9. Определение способности клеток бактерий к миграции по поверхности сред.....	72
10. Определение действия летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых бактериями, и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок и зрелые биопленки <i>A. tumefaciens</i> C58.....	73
IV. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	76

4.1. Действие фенольных соединений на формирование биопленок <i>P. aeruginosa</i> PAO1 и <i>A. tumefaciens</i> C58.....	76
4.1.1. Образование биопленок <i>P. aeruginosa</i> PAO1 и <i>A. tumefaciens</i> C58 в присутствии растительных фенолов.....	77
4.1.2. Определение синтеза АГЛ штаммом <i>P. aeruginosa</i> PAO1, при росте культуры на среде с различными концентрациями фенольных соединений.....	80
4.1.3. Действие фенольных соединений на биосенсоры на основе штаммов <i>Escherichia coli</i> , используемых для определения N-ацил-гомосеринлактонов.....	82
4.1.4. Определение способности клеток <i>P. aeruginosa</i> PAO1 к миграции в различных концентраций фенольных соединений.....	83
4.2. Действие фитогормонов на формирование биопленок <i>P. aeruginosa</i> PAO1 и <i>A. tumefaciens</i> C58.....	85
4.3. Действие пероксида водорода и параквата на формирование биопленок <i>P. aeruginosa</i> PAO1 и <i>A. tumefaciens</i> C58.....	88
4.3.1. Образование биопленок <i>P. aeruginosa</i> PAO1 и <i>A. tumefaciens</i> C58 в присутствии пероксида водорода и параквата.....	89
4.3.2. Влияние гена <i>aiiA</i> , кодирующего гомосеринлактоназу, на образование биопленок <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	91
4.4. Действие пероксида водорода на формирование биопленок <i>Burkholderia cenocepacia</i> 370.....	96
4.5. Действие летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых бактериями родов <i>Pseudomonas</i> и <i>Serratia</i> , и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок и зрелые биопленки фитопатогенной бактерии <i>A. tumefaciens</i> C58.....	100
4.5.1. Определение действия ЛОС на функционирование Quorum Sensing систем регуляции.....	109
4.5.2. Определение влияния мутаций в генах, кодирующих порины OmpF и OmpC, на чувствительность клеток <i>E. coli</i> к ЛОС.....	114
V. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	117
VI. ВЫВОДЫ.....	127
VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	128

I. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Исследования последнего десятилетия показали, что большинство бактерий (более 99 %) существуют в природных экосистемах в виде специфически организованных прикрепленных к субстратам биопленок, образование которых представляет сложный, строго регулируемый биологический процесс.

Изучение биопленок вызывает огромный интерес исследователей; он связан, прежде всего, с тем, что способность патогенных бактерий существовать в составе биопленок создает большие трудности для медицинской практики, так как при этом значительно повышается устойчивость бактерий к действию антимикробных препаратов и факторов иммунной защиты организма-хозяина. Образование бактериальных биопленок часто является причиной тяжелых, трудно излечиваемых хронических заболеваний. В пищевой промышленности образование биопленок на продуктах увеличивает риск заражения пищи патогенными микроорганизмами; биообрастание трубопроводов, коммуникаций, оборудования, нефтяных платформ и, как следствие, биокоррозия этих поверхностей вызывают серьезные трудности в микробиологической и нефтеперерабатывающей промышленности.

С другой стороны, образование биопленок может быть полезным, например, при биологической очистке воды. Кроме того, биопленки могут обеспечивать повышенную устойчивость бактерий-продуцентов к действию токсичных веществ, присутствующих в среде. Образование биопленок бактериями-антагонистами фитопатогенов способствуют конкурентной борьбе этих бактерий с микроорганизмами – возбудителями заболеваний растений; этот фактор важен для развития эффективных методов биоконтроля.

Сказанное выше свидетельствует о важности изучения закономерностей образования биопленок и действия различных соединений на биопленки и их формирование. Исследования этой проблемы актуальны в фундаментальном отношении и важны для медицины, биотехнологии и сельского хозяйства.

В настоящей работе изучено действие нескольких групп веществ различной химической природы, которые, по нашему мнению, могли оказывать влияние на образование бактериальных биопленок, но не исследовались ранее в этом отношении. Среди них вещества растительного происхождения – соединения фенольной природы с антимикробной активностью и фитогормоны. Исследовано также действие на образование биопленок и зрелые биопленки летучих органических соединений, синтезируемых бактериями,

подавляющих рост микроорганизмов и модулирующих рост растений. Кроме того, было изучено влияние окислителей - пероксида водорода и параквата.

Quorum Sensing (QS) системы регуляции экспрессии генов, играющие ключевую роль в большом количестве процессов бактериальной клетки, являются важным фактором контроля формирования биопленок у ряда бактерий. Этот тип регуляции включает низкомолекулярные сигнальные молекулы и регуляторные рецепторные белки, с которыми они связываются. В качестве сигнальных молекул QS системы используют большое число химических соединений, наиболее изученными из них являются N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ). Благодаря QS регуляции бактерии получают возможность скоординированно контролировать экспрессию генов во всем сообществе, что способствует быстрой адаптации популяций бактерий к меняющимся условиям среды и их выживанию в природных условиях.

Таким образом, изучение QS систем регуляции, взаимосвязи функционирования QS систем и образования бактериальных биопленок при действии различных соединений относится к числу актуальных направлений современной микробиологии, генетики микроорганизмов и молекулярной биологии, чрезвычайно важным в фундаментальном и прикладном отношении.

Работа выполнялась в рамках гранта РФФИ № 12-04-00636 и Госконтракта Министерства образования и науки Российской Федерации № 8307 от 10 августа 2012 г.

Цель и задачи

Целью настоящей работы являлось изучение закономерностей действия на образование бактериальных биопленок веществ растительного происхождения, окислителей и летучих органических соединений (ЛОС), синтезируемых бактериями, а также исследование взаимосвязи функционирования QS систем и образования бактериальных биопленок при действии этих веществ.

В соответствии с этим в работе были поставлены следующие задачи:

1. выяснение закономерностей влияния веществ растительного происхождения (соединений фенольной природы и фитогормонов) на образование биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 и *Agrobacterium tumefaciens* C58;
2. изучение действия растительных фенолов на синтез сигнальных молекул QS систем и на способность клеток *P. aeruginosa* PAO1 к миграции;
3. исследование влияния окислителей (пероксида водорода и параквата) на формирование биопленок бактериями *A. tumefaciens* C58, *P. aeruginosa* PAO1 и *Burkholderia cephalacia* 370;

4. определение влияния введения гетерологичного гена *aiiA* (кодирует N-ацил-гомосеринлактоназу) в клетки *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cenocepacia* 370 на формирование биопленок при действии различных концентраций H_2O_2 ;

5. выяснение закономерностей действия летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых ризосферными и почвенными бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58;

6. изучение действия ЛОС (кетонс) на функционирование Quorum Sensing систем регуляции.

Научная новизна

Впервые показано, что фенольные соединения, образуемые растениями (ванилин, эпикатехин; 4-гидроксibenзойная, галловая, феруловая, синаповая, хлорогеновая и коричная кислоты) и фитогормоны (салициловая, индолил-3-уксусная, гиббереллиновая и абсцизовая кислоты) в концентрациях, не подавляющих или слабо подавляющих рост бактерий, оказывают стимулирующее действие на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58. При более высоких концентрациях указанные вещества вызывают ингибирование этого процесса.

С помощью биосенсоров на основе *lux*-репортерных плазмид впервые показано, что присутствие в жидкой питательной среде ванилина, 4-гидроксibenзойной или галловой кислоты в концентрациях 40–400 мкг/мл приводит к увеличению синтеза клетками *P. aeruginosa* PAO1 N-3-оксо-додеcanoил-гомосеринлактона (3-охо-C12-HSL), сигнальной молекулы LasR-LasI QS системы *P. aeruginosa* PAO1, что может указывать на возможную связь между стимуляцией образования биопленки и LasR-LasI QS системой этой бактерии.

Установлено, что стимуляция образования биопленки в присутствии низких концентраций растительных фенолов (ванилин, 4-гидроксibenзойная и галловая кислоты) и салициловой кислоты не связана с увеличением способности клеток *P. aeruginosa* к миграции по поверхности агаризованных сред (сворминг, свимминг и твитчинг миграция).

При исследовании влияния пероксида водорода (H_2O_2) на образование биопленок показано, что H_2O_2 в субингибиторных и / или слабо подавляющих рост бактерий концентрациях оказывает стимулирующее действие на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cenocepacia* 370, но не стимулирует образование биопленок *A. tumefaciens* C58. Другой окислитель, паракват, не оказывал стимулирующего действия на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58. При более высоких концентрациях данные вещества вызывали ингибирование образования биопленок. При введении в клетки *P. aeruginosa* PAO1 гетерологичного гена *aiiA* (кодирует N-ацил-

гомосеринлактоназу AiiA, деградирующую АГЛ) стимуляции образования биопленок при действии H_2O_2 не происходило. Эти данные свидетельствуют о том, что стимуляция формирования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 в присутствии H_2O_2 зависит от функционирования QS систем регуляции экспрессии генов бактерии.

Приоритетные данные были получены при исследовании действия газовых смесей летучих веществ, продуцируемых бактериальными штаммами *Serratia proteamaculans* 94, *Pseudomonas chlororaphis* 449, *Pseudomonas fluorescens* 35, *Serratia plymuthica* IC1270, и индивидуальных ЛОС (диметилдисульфид - ДМДС, 2-нонанон, 2-гептанон, 2-ундеканон), продуцируемых этими штаммами, на образование и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Было показано, что общий пул летучих веществ, образуемых *P. fluorescens* B-4117 и *P. chlororaphis* 449, и отдельные ЛОС подавляют образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и убивают бактерии в зрелых биопленках, причем гибель бактерий, живущих в составе биопленок, происходит при более высоких количествах индивидуальных ЛОС, чем их гибель при образовании биопленок.

Используя различные *lux*-репортерные штаммы, применяемые для определения N-ацил-гомосеринлактонов, было показано, что кетоны, синтезируемые бактериями-продуцентами ЛОС, способны подавлять функционирование QS систем бактерий.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты открывают новые аспекты конкурентных отношений между микроорганизмами и взаимоотношений бактерий и растений.

Результаты работы могут найти применение в последующих фундаментальных исследованиях молекулярных механизмов коммуникации бактерий. Полученные в работе данные в дальнейшем могут быть использованы в прикладных целях, в частности, для разработки новых подходов для борьбы с биообрастанием, с бактериальными инфекциями в медицине и сельском хозяйстве, в биотехнологии для получения важных для человека штаммов бактерий на основе конструкций, использующих новые принципы регуляции, а также в тех случаях, когда необходимо использовать полезные свойства биопленок (интенсификация процессов биodeградации различных субстратов, защита штаммов-продуцентов от токсичных веществ).

Положения, выносимые на защиту

1. Субингибирующие или слабо подавляющие бактериальный рост концентрации веществ растительного происхождения стимулируют образование биопленок у бактерий и увеличивают синтез сигнальных молекул QS систем.

2. Индукция образования бактериальных биопленок при действии субингибиторных концентраций пероксида водорода зависит от функционирования QS систем регуляции этих бактерий.

3. Летучие органические вещества, образуемые бактериями, подавляют образование биопленок, вызывают гибель клеток в уже сформированных биопленках и могут ингибировать функционирование QS систем регуляции бактерий.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обсуждается в главе «Материалы и методы».

Основные результаты диссертации были представлены и обсуждены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2012» и «Ломоносов 2013» (Москва, Россия, 2012 и 2013); The 5th Congress of European Microbiologists – FEMS2013 (Leipzig, Germany, 2013); на XXIII, XXIV, XXV и XXVI Международных зимних молодежных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2011, 2012, 2013 и 2014); на научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии «X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва-Пушино, Россия, 2011); на V Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» (Саратов, Россия, 2010); на Всероссийской конференции с международным участием «Физиология и генетика микроорганизмов в природных и экспериментальных системах» (Москва, Россия, 2009).

Диссертационная работа была апробирована на заседании кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева 07 октября 2014 г.

По материалам диссертации опубликовано 16 научных работ, в том числе 2 статьи в международных журналах (APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica; Applied Biochemistry and Microbiology - индексируются в системах Web of Science и PubMed), 4 статьи в научных журналах (Молекулярная генетика, микробиология и вирусология; Биотехнология; Бюллетень Московского общества испытателей природы, Отдел биологический), включенных в Перечень рецензируемых научных изданий, определенных ВАК РФ для публикации результатов научных исследований.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Микробные биопленки: общая характеристика и функции

Более 99% бактериальных популяций существуют в природных экосистемах в виде специфически организованных, прикрепленных к субстратам биопленок. Биопленки образуются также и в разных частях макроорганизмов. Образование биоплёнок представляет сложный, строго регулируемый биологический процесс, зависящий от множества факторов, включающих генетический контроль регуляции, свойства бактериальных клеток в различных условиях выращивания, свойства субстрата, к которому прикрепляются биопленки, а также от факторов окружающей среды (рН, температура, питательные компоненты и др.). Способность формировать биопленки является составной частью жизненного цикла большинства микроорганизмов [19; 31; 82].

Биоплёнка – это микробное сообщество, образующееся на поверхности раздела фаз; клетки этого сообщества прикреплены к поверхности или друг к другу и заключены в матрице синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ. Клетки в биопленках отличаются от планктонно растущих (неприкрепленных) клеток – у них изменены параметры роста и экспрессия специфичных генов. Использование данного определения позволяет отличить микробные сообщества биопленок от похожих на них лишь внешне структур, например, от бактериальных колоний, растущих на поверхности агара, которые не проявляют характеристик, свойственных истинной биопленке [31; 145; 181]. Кроме того, в отличие от колонии бактерий, природные биопленки показывают значительно более сложную структуру и разделение видов деятельности [3; 59; 93].

Биопленки образуются на различных поверхностях, включая: жидкость (водная среда) – твердая поверхность, жидкость – воздух, две несмешивающиеся жидкости и твердая поверхность – воздух, и могут включать популяции, образовавшиеся из одного вида, или сообщества, развивающиеся из разных видов микроорганизмов. Кроме того, в составе биопленок помимо бактерий могут присутствовать в различных сочетаниях грибы и простейшие. Различные виды бактериальной жизнедеятельности, в том числе рост и гибель клеток, накопление продуктов жизнедеятельности, секреция, механизмы подвижности и синтез экзополисахаридов, могут влиять на структуру и характеристики возникающих биопленок. В настоящее время лучше всего исследованы биопленки, развивающиеся на границе жидкой и твердой сред. [22; 145]. Сложная архитектура биопленок обеспечивает возможность метаболической кооперации клеток внутри пространственно организованных систем, создает условия, благоприятствующие установлению симбиотических взаимоотношений между бактериями разных видов [31; 145]. Так как в составе биопленок клетки бактерий объединены сложными межклеточными связями, то популяцию

био пленочных бактерий можно рассматривать как функциональный аналог многоклеточного организма; на уровне биопленок реализуется социальное поведение бактерий [22; 34; 186; 221].

Формирование трехмерных структур биопленки зависит от сложных регуляторных процессов, которые включают экспрессию факторов, важных для образования биопленки в ответ на различные сигналы окружающей среды. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этих генетических процессов, пока недостаточно изучены.

На данный момент выделяют несколько последовательных этапов образования биопленок.

1. Началом развития биопленок является переход бактерий от планктонного способа существования к прикрепленному, связанному с адгезией клеток к биотической или абиотической поверхности. Адгезия возможна только у подвижных бактериальных клеток; мутанты *P. aeruginosa* и *Escherichia coli*, дефектные по подвижности, неспособны прикрепляться к поверхности или формировать нормальные биопленки [30; 75; 132; 171]. Процесс перехода из одного состояния в другое инициируется определенными сигналами, поступающими из окружающей среды, которые могут существенно отличаться у разных бактерий [188; 221]. В качестве сигналов, обуславливающих включение у планктонных бактерий механизмов перехода от свободного состояния к прикрепленному существованию на соответствующей поверхности, выступают изменения в содержании питательных веществ, железа и кислорода, температуры, осмолярности, рН среды и т.д. [139; 185; 186; 277]. Например, наличие хлорида натрия (NaCl) в питательном матриксе, использование спирта как дезинфицирующего агента или присутствие других бактерий на питательном матриксе может повысить адгезию и созревание биопленки [31; 46; 114; 176; 221].

Физико-химические свойства поверхности бактериальных клеток также являются важным фактором адгезии [267]. Первичный контакт планктонного микроорганизма и поверхности происходит либо случайно (например, при пассивной миграции клеток с током жидкости), либо вследствие направленного движения, обусловленного хемотаксисом [181]. Стадия первичной адгезии занимает несколько секунд, является обратимой и зависит от неспецифических физико-химических механизмов взаимодействия (гидрофобные и электростатические силы, стерическое соответствие молекул и т.д.) между поверхностными структурами микроорганизма и самого субстрата [114; 176; 221].

2. Стадия окончательного (необратимого) прикрепления или фиксации. Вторая стадия характеризуется необратимым связыванием бактериальных клеток с поверхностью при помощи специфических молекул – адгезинов. Важную роль на этом этапе играют такие клеточные структуры, как фимбрии (особенно пили 1-типа), жгутики, поверхностные белки

(например, белки связывающие кальций), липополисахариды (ЛПС), экзополисахариды и другие соединения. В результате образуется монослой клеток. При прикреплении к поверхности изменяется экспрессия почти 40 % бактериальных генов, участвующих в процессах мембранного транспорта, секреции, синтеза фосфолипидов и липополисахаридов, регуляции генов. При этом может происходить как активирование экспрессии генов, так и их репрессия [19; 34; 114; 283].

3. Стадия созревания биопленки. На данном этапе клетки, прикрепившиеся ранее к поверхности, облегчают прикрепление последующих клеток из окружающей среды, бактерии теряют подвижность, некоторые из них слипаются друг с другом (происходит агрегация клеток), начинают выделять внеклеточные полимеры, формируя внеклеточный полимерный матрикс, накапливаются питательные вещества, клетки начинают делиться и образуют многоклеточный слой. На этой стадии QS системы ингибирует образование жгутиков и адгезинов, при этом активация генов определяющих возможность синтеза внеклеточных полимеров, часто находится под контролем QS систем регуляции [77; 100; 122; 204]. На этой стадии важны пили IV-го типа [34; 132; 296]. При достижении определенной толщины слоя клеток наступает следующая стадия – стадия роста биопленки (образование зрелой биопленки).

4. Стадия роста биопленки. В результате деления клеток возникают компактные микроколонии, объединенные внеклеточным полимерным матриксом. Микроколонии постепенно увеличиваются в размерах и объединяются с образованием макроколоний. Одновременно с увеличением толщины биопленки формируются ее специфические структуры - полости, выросты, поры и каналы [15; 221; 283]. Эта стадия нарастания зрелой биопленки в благоприятных условиях продолжается достаточно долго, а в неблагоприятных условиях, вступает в завершающую стадию. Процесс заканчивается образованием зрелой биопленки [20; 146; 188].

5. Стадия дисперсии. Потенциал роста любой биопленки ограничен доступностью питательных веществ и кислорода, проницаемостью различных слоев биопленки и эффективностью удаления отходов, содержанием ионов водорода (рН среды), осмолярностью и т.д. [15]. В определенный момент времени биопленка достигает критической массы и возникает динамическое равновесие, при котором от наружных слоев, наиболее удаленных от поверхности, начинают открепляться клетки, способные покидать биопленку и колонизировать другие поверхности, чтобы повторить цикл, расширив биоплёночный процесс. Открепление бактерий от биопленки (анг. detachment cells) может происходить посредством высвобождения индивидуальных клеток или их агрегатов в окружающую среду, а также перемещением биопленки по поверхности и может быть

обусловлено как внешними (движение жидкости), так и внутренними (энзиматическая деградация β -1,6-N-ацетилглюкозамина или поверхностно связанных белков) причинами. [139; 283]. По данным ряда исследований, новые планктонные клетки, потерявшие связь с биопленкой, представляют большую опасность в связи с приобретением новых свойств, включая устойчивость к антибиотикам. Процесс переключения фенотипа, регулируемый QS системами, имеет большое значение (приводит к распространению инфекции по всему организму при заболеваниях или к биозагрязнению/биообрастанию промышленного оборудования); он остается до конца не изученным [8; 31; 94; 182; 191; 257]. Известно, что в разрушении биопленки принимают участие собственные поверхностно-активные вещества бактерий, альгинатлиаза и другие полисахаридлиазы [105; 141; 169; 175].

Образование биопленок является одной из основных стратегий, повышающих выживание бактерий в окружающей среде, в том числе, в организме – хозяине [7; 8; 82; 189]. Способность бактерий формировать биопленки является существенным фактором их патогенности. Как уже упоминалось, бактерии, живущие в биопленке, существенно отличаются от свободноживущих планктонных клеток [3]. Например, когда планктонные клетки сравнили с клетками биопленки в поздней стадии созревания, оказалось, что более 800 белков имеют шестикратное изменение уровня экспрессии [188]. Существование значительных отличий в составе и уровнях белков, синтезируемых планктонными бактериями и бактериями в биопленках, и участие различных регуляторов, действующих на разных стадиях развития биопленок, еще раз свидетельствуют о том, что развитие биопленок – сложный, высоко регулируемый, генетически запрограммированный процесс, причем структура биопленки регулируется как физико-химическими взаимодействиями с факторами окружающей среды, так и генетическими механизмами самих бактерий [3; 111; 139; 181]. В составе биопленок бактерии более устойчивы к действию антибактериальных препаратов различной природы (антибиотики, антитела, поверхностно активные вещества, бактериофаги, фагоциты), и неблагоприятных факторов окружающей среды (изменения температуры, рН среды, ультрафиолетовое излучение, высушивание и т.п.); они также получают возможность сохранения постоянства условий существования (гомеостаза) [31; 54; 188; 145; 181; 221].

В связи с вышесказанным, образование микробных биопленок является широко распространенной проблемой во многих областях жизни человека. Процесс формирования биопленки часто называют биообрастанием (анг. biofouling). Биообрастание вызывает серьезные проблемы в медицинской, химической и фармацевтической промышленности. Формирование биопленок снижает эффективность химического процесса в биореакторах, а их образование на имплантируемом оборудовании (катетерах, искусственных клапанах

сердца, линзах и др.) или на живых тканях (эндокард, в ранах, на эпителии легких и др.) является причиной ряда тяжелых, чрезвычайно трудно излечиваемых хронических заболеваний в медицинской практике [2; 82; 101; 141; 167]. Защитные механизмы организма редко бывают в состоянии избавить организм от инфекций, вызванных образованием биопленки. Было показано, что в наибольшей степени адгезии микроорганизмов способствуют полиэтиленовые и поливиниловые устройства, в наименьшей – силиконовые, тефлоновые и полиуретановые. Однако в настоящее время не существует материалов, применение которых одновременно было бы безвредно для макроорганизма и исключало бы биологическое обрастание. Считается общепринятым представление о том, что биопленки развиваются на любом материале, который контактирует с любой жидкостью, где в принципе могут существовать микроорганизмы. Фактически любая поверхность, как биогенного, так и абиогенного происхождения, может колонизироваться микроорганизмами, и, следовательно, на всех этих поверхностях закономерно формируются биопленки. Более того, ни для одного вида бактерий не описано существование только в планктонном состоянии при всех возможных условиях роста [10; 44; 75; 82; 139; 145].

Биообрастание и как следствие биокоррозия трубопроводов, коммуникаций, технологического оборудования, корпусов судов и нефтяных платформ вызывает серьезные трудности в микробиологической и нефтеперерабатывающей промышленности. В пищевой промышленности образование биопленок на продуктах увеличивает риск заражения пищи патогенными микроорганизмами [82; 139; 145; 173; 267]. В естественных местах обитания микроорганизмов биопленки могут вызвать серьезное ухудшение экологической обстановки. Например, сообщество цианобактерий образует в природных условиях биопленку на поверхности водоемов, что приводит к нежелательным для водопользования изменениям качества воды [34]. Биопленки ассоциированных с растениями и фитопатогенных бактерий в ризосфере играют существенную роль во взаимодействиях микроорганизмов с растениями [75; 306; 313]. Например, было обнаружено, что определенные бактерии, обитающие в биопленках, индуцируют рост растений и защищают растения от фитопатогенов (процесс названный биоконтролем), в то время как другие участвуют в патогенезе [64; 75; 303].

В настоящее время наиболее надежным методом изучения микробной биопленки является специальная микроскопия. Использование при изучении биопленок современных методов микроскопии, таких как конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, атомно-силовая микроскопия (АСМ) и др., показало, что биопленки имеют сложную архитектуру [59; 159]. Жидкостная силовая микроскопия, являющаяся модификацией атомно-силовой микроскопии, может быть использована не только для количественной оценки адгезивной силы единичных клеток на поверхности, но и для инъекций в клетки и пространственных

манипуляций [247; 282]. Среди методов, которые позволяют идентифицировать микроорганизмы в составе биопленок, можно назвать современные молекулярные методы (электрофорез в геле, высокоэффективная жидкостная хроматография с флуоресцентной гибридизацией *in situ* и др.) [301; 302]. На данный момент также существуют различные методы направленные не только на изучение структуры биопленки, но и на выяснение биопленочной гетерогенности, взаимосвязи между скоростью потока жидкости и биомассой биопленки, и ряда других характеристик микробных сообществ находящихся внутри биопленке [46; 329].

Бактериальные клетки составляют не более 15 % объема биопленки, остальное представляет экзополимерный матрикс. Поры и каналы, пронизывающие всю биопленку – очень важная часть ее структуры, они непосредственно влияют на ее функции – по ним перемещаются вещества по градиентам концентрации и/или мигрируют бактерии. Было доказано движение потока жидкости через эти каналы [22; 47; 122; 204]. Они позволяют свободно распространяться по всей толщине биопленки низкомолекулярным веществам (например, флуоресцеин), из чего следует, что эти вещества примерно одинаково доступны всем клеткам биопленки. Но при этом биопленка непроницаема для достаточно крупных молекул большинства антибиотиков [7]. Каналы обеспечивают распространение питательных веществ и обмен продуктами метаболизма с окружающей жидкостью. Измерение *in situ* растворенного кислорода с использованием микроэлектродов показало, что кислород, доступен в любой точке биопленки; из этого следует, что по каналам окисленная жидкость транспортируются по всей толщине биопленки. При этом внутри биопленки наблюдается значительная гетерогенность [281]. Например, у *P. aeruginosa* был выявлен огромный градиент перепада кислорода [8; 38; 94; 139]. Сходные градиенты выявлены для pH и питательных веществ. Эти градиенты обуславливают физиологическую вариабельность среди отдельных клеток биопленок. Так, клетки, находящиеся в глубоких слоях биопленки, характеризуются низкой скоростью роста, а клетки на периферии растут более активно. При этом если биопленка сформировалась в слабо подвижной среде, то она имеет низкую силу натяжения и легко разрывается, тогда как биопленка, сформированная в высокоподвижной среде, имеет высокую силу натяжения и очень устойчива к разрывам [47].

Характерной особенностью бактерий в биопленке является наличие мембранных пузырьков или везикул [53; 115]. Методом ультратонких срезов были выявлены мембранные везикулы в биопленке *Burkholderia cepacia* образованной на поверхности пластика [34]. Детально изучены пузырьки *P. aeruginosa* PAO1, содержащие протеазу, щелочную фосфатазу, фосфолипазу С и ферменты, лизирующие пептидогликан. В пузырьки пакуются периплазматические гидролитические ферменты, предназначенные для транспортировки к

поверхности. Предполагается, что основная функция пузырьков в биопленке – лизис части клеток, которые служат источником необходимых ростовых факторов для остальных членов микробного сообщества. Известен ряд примеров, когда при истощении источника питания в среде, бактерии биопленки выделяют гидролитические ферменты, позволяющие им использовать полимеры матрикса как источники питания и одновременно высвобождающие их в виде планктонных клеток, способных найти более благоприятные для размножения условия [169; 182; 284; 288; 316].

Внеклеточный биоплёночный матрикс, его состав и роль отдельных компонентов

Матрикс, состоящий из внеклеточных полимерных веществ (анг. extracellular polymeric substances – EPS) обеспечивающих межклеточные взаимодействия, является одним из ключевых структурных компонентов биопленок. Внеклеточный матрикс биопленок, помимо воды (занимает примерно 80–90 % объема биопленки) и микробных клеток, состоит из смеси компонентов, таких как экзополисахариды (ЭПС), белки, нуклеиновые кислоты и другие вещества; состав матрикса различен у бактерий разных таксономических групп [22; 122; 267]. Наряду с этими экзополимерами, белки наружной мембраны клеток и разнообразные клеточные структуры, такие как фимбрии и жгутики, могут также функционировать как часть матрикса биопленок [122; 139; 204; 288]. Компоненты матрикса не только стабилизируют структуру биопленки, но также являются посредниками при бактериальной адгезии к различным поверхностям, связывая и временно иммобилизуя клетки биопленки. Основной функцией матрикса, помимо каркасной, обеспечивающей стабильность биопленки, является протекторная [141; 241]. Матрикс биопленки играет ключевую роль в физиологии и экологии бактерий, в том числе в межклеточных взаимодействиях, в горизонтальном переносе генов и в экологической приспособленности бактериальной популяции [34; 75; 122].

Внеклеточные полисахариды, как правило, являются важной частью матрикса биопленки. Химический состав и физические свойства полисахаридов в матриксе биопленки могут значительно варьироваться в зависимости от типа мономерных единиц, типа гликозидных связей (например, присутствие β -1,4-; β -1,3- или α -1,2-; α -1,6- связей обеспечивает большую жесткость или гибкость структуры матрикса, соответственно), и наличия различных органических и неорганических замен. Экзопполисахариды матрикса состоят в основном из гомо- и гетеропполисахаридов. Присутствие в питательной среде избытка доступного углеродного субстрата и лимитирование по другим питательным веществам, таким как азот, калий или фосфат, способствует синтезу ЭПС. Большинство ЭПС являются полианионными молекулами вследствие наличия в своем составе уроновых кислот,

главным образом, D-глюкуроновой (также встречаются D-галактуроновая и D-маннурановая кислоты), и аминсахаров, имеющих такие замены, как пируват, сульфат или фосфат. Были описаны также поликатионные ЭПС [75; 288]. Подавляющее большинство бактерий в составе ЭПС содержат линейный гомогликан β -1,6-N-ацетилглюкозамин, названный PIA (анг. polysaccharide intercellular adhesin), или целлюлозу. Некоторые микроорганизмы в зависимости от условий окружающей среды обладают способностью синтезировать несколько внеклеточных полисахаридов, в том числе поли- β -1,6-N-ацетилглюкозамин (PNAG), колановую кислоту, целлюлозу, β -1,3-глюканы и др. [186; 221; 288]. ЭПС обычно требуются не для стадии начальной адгезии, но для последующего архитектурного развития матрикса биопленки. Показано, что ЭПС матрикса обеспечивают архитектурную форму биопленок и стабилизируют их трехмерную структуру, защищают бактерии в биопленке от иммунной системы организма (анг. host immunological system), антибактериальных препаратов (ЭПС обеспечивает физический барьер, препятствующий диффузии антибиотиков, и/или их связывание), повреждающих факторов внешней среды (радиация, осмотический шок, высыхание и т.п.). ЭПС сорбирует металлы и минералы, растворенные органические вещества, концентрирует ферменты и ростовые факторы. ЭПС матрикса играет важную роль, фиксируя и закрепляя бактерии в тех экологических нишах, где существует угроза смыва [22; 122; 277]. Таким образом, стабильность структуры биопленки, зависит от физико-химических и биологических свойств ЭПС и от их взаимодействия с ионами, низкомолекулярными растворенными веществами и другими макромолекулами, такими как белки и внеклеточная ДНК [28; 75; 181; 288].

Внеклеточная ДНК. Внимание исследователей, помимо ЭПС, привлекает другой компонент матрикса биопленки – внеклеточная ДНК; было показано, что она играет важную роль в формировании биопленок у ряда бактерий. Количество, локализация и происхождение внеклеточная ДНК варьируется в зависимости от вида бактерий. В ряде исследований было показано, что внеклеточная ДНК расположена в определенных структурах и что ее высвобождение основано на лизисе определенных типов бактерий [37; 75; 284; 316]. Было обнаружено, что внеклеточная ДНК является одним из основных компонентов матрикса биопленки *P. aeruginosa* и функционирует в качестве межклеточного соединительного элемента (во взаимодействиях клетка-клетка и клетка-поверхность в биопленках), что подкрепляло концепцию о стабилизирующей роли внеклеточной ДНК для матрикса биопленки [128]. У *P. aeruginosa*, производство внеклеточной ДНК находится под контролем железа и QS систем регулирования [128; 139; 141; 241]. Мембранные везикулы, производимые *P. aeruginosa*, также могут играть определенную роль в получении внеклеточной ДНК. Внеклеточная ДНК может быть получена либо из везикул, которые в

конечном итоге лизируются, либо посредством бактериолитической активности везикул, которые могут лизировать небольшие субпопуляции клеток *P. aeruginosa*. Были описаны различные механизмы влияния внеклеточной ДНК на формирование биопленок *P. aeruginosa*. Показано, что внеклеточная ДНК эффективно образует комплексы с двухвалентными катионами, такими как Mg^{2+} и Ca^{2+} , приводя к обеднению катионами клеточной среды [22; 122].

Внеклеточная ДНК имеет и другие функции, например, выступает в качестве структурного компонента матрикса во время образования биопленки *Shewanella oneidensis*. В этом случае внеклеточная ДНК высвобождается в основном за счет профаг-опосредованного лизиса клеток и служит не только в качестве структурного компонента биопленки, но и в качестве источника питательных веществ. Были определены три внеклеточной нуклеазы, для каждой показана их роль в деградации ДНК и контроле поглощения ДНК [147]. Внеклеточная ДНК грамположительных бактерий принимает участие в адгезии к гидрофобным поверхностям и в бактериальной автоагрегации [75].

Внеклеточные белки. Наряду с экзополисахаридами и внеклеточной ДНК, такие компоненты матрикса биопленки, как внеклеточные белки, также играют важную роль в первоначальном прикреплении клеток к различным поверхностям и/или в процессе формирования биопленки разными видами бактерий. Внеклеточные белки могут функционировать как отдельные поверхностные белки или быть компонентами (входить в состав) мультимерных поверхностных клеточных структур [47; 75; 187].

Внеклеточные белки в матриксе биопленки имеют как структурные, так и физиологические функции. Некоторые матриксные белки функционируют как внеклеточные ферменты и их связывают с такими видами активностями, как деградация и переработка биополимеров для доступности питательных веществ и модификация других экзополимеров. Ферменты, которые играют подобную роль в матриксе биопленки, включают липазы, гидролазы, лиазы и др. [75]. Ряд белков в матриксе биопленки имеют структурные функции, например, лектины, которые связывают бактериальные клетки с полимерным матриксом. Примеры таких внеклеточных углеводсвязывающих белков включают глюкан-связывающий белок *Streptococcus mutans*, LecA и LecB *P. aeruginosa*, TasA белок *Bacillus subtilis* и лектины *A. brasilense* [111; 295]. Амилоиды являются еще одним распространенным видом белков матрикса биопленки с функцией внеклеточных адгезинов [75; 91].

Большинство поверхностных белков имеют ряд структурных и функциональных особенностей (относительно высокий молекулярный вес, наличие центральных доменов с высокой гомологией друг к другу и др.), они играют важную роль в формировании и/или развитии биопленок (могут способствовать синтезу таких ЭПС как PIA / PNAG) и в

бактериальных инфекционных процессах [186; 187; 267]. К этому семейству относят различные белки, среди них: ассоциированный с биопленками белок (Bap) *Staphylococcus aureus*, крупный адгезионный белок (LapA) *P. fluorescens* и *P. putida*, ассоциированный с биопленками белок (BapA) *Salmonella enterica*, энтерококковый поверхностный белок (ESP) *Enterococcus faecalis*, AdhA адгезин *B. cenocepacia* и ряд других белков [122; 159; 187; 221].

Минорные компоненты матрикса. В ряде исследований были получены данные о значительной роли в формировании и функционировании биопленки минорных компонентов экзополимерного матрикса, а именно липидов и жирных кислот [37; 49; 105; 262]. При биосинтезе экзополимерного матрикса жирные кислоты способны ковалентно связываться с гидрофильными молекулами, образуя поверхностно-активные соединения: гликолипиды (рамнолипиды) и липопептиды [70; 122]. С одной стороны, их синтез позволяет бактериям адгезироваться на гидрофобных субстратах [28; 262], с другой – эти соединения ответственны за важные этапы формирования специфической структуры биопленки, а именно каналов в матриксе биопленки [49; 241; 297]. Например, было показано, что: 1) выделение рамнолипидов *P. aeruginosa* необходимо для предотвращения плотного прикрепления вновь образованных бактерий внутри биопленки и таким образом, для формирования и поддержания полостей в биопленках; 2) бактериям требуется избыток углерода, чтобы запустить процесс синтеза рамнолипидов [22; 241; 262; 316]. Индуцируемая рамнолипидами дисперсия не ограничивается *P. aeruginosa*, что делает эти поверхностно-активные соединения привлекательными кандидатами для борьбы с полимикробными биопленками, образованными на медицинском и промышленном оборудовании и устройствах [70; 148; 241]. Секреция рамнолипидов способно индуцировать дисперсию биопленки *in vivo*, вследствие чего бактерии становятся более уязвимыми к действию традиционных антибиотиков [49; 262].

Были обнаружены качественные отличия жирнокислотного состава липидной части экзополимерного матрикса биопленки и планктонно-растущих бактерий: в биопленке было выше содержание ненасыщенных жирных кислот. Значение степени ненасыщенности жирных кислот при переходе от планктонной к биоплёночной форме роста отличалось; показано, что в микробных ассоциациях степень ненасыщенности жирных кислот в экзополимерном комплексе биопленок существенно выше, чем в суспензии планктонных клеток [28]. Известно, что ненасыщенные жирные кислоты имеют большую реакционную способность и могут взаимодействовать с белками, полисахаридами и другими полимерами. Связывание липидов, в частности жирных кислот, может способствовать формированию каналов биопленки и повышению ее стабильности [241]. Было показано, что некоторые

внеклеточные жирные кислоты являются сигнальными молекулами и способны к индукции распада микроколоний биопленки [105; 139; 297].

Мультимерные поверхностные клеточные структуры; роль в образовании биопленок

Известно, что поверхности большинства бактериальных клеток заряжены отрицательно, причем степень отрицательного заряда изменяется в зависимости от условий роста. Сам по себе отрицательный заряд поверхности клетки неблагоприятен для бактериальной адгезии из-за силы электростатического отталкивания, удерживающей клетки на небольшом расстоянии друг от друга и от поверхности (субстрата), к которой они должны прикрепиться. Тем не менее, поверхность бактериальной клетки обладает гидрофобностью за счет фимбрий, жгутиков и липополисахаридов (ЛПС). Важность гидрофобности поверхности бактериальной клетки заключается в уменьшении силы отталкивающего взаимодействия между двумя поверхностями [267].

Большие мультимерные поверхностные клеточные структуры, таких как жгутики и фимбрии (пили), обычно состоят из многочисленных крупных структурных белковых компонентов и ряда вспомогательных белков. Было показано, что для многих видов бактерий, включая *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* и др., жгутики в определенных условиях играют важную роль в начальной фазе формирования биопленок, они также могут играть определенную роль в более поздних фазах структурного развития биопленки [75; 132; 171; 296]. У бактерий известно несколько типов миграции по поверхности сред. С помощью жгутиков осуществляется плавание (свимминг – англ. swimming) и роение (сворминг – англ. swarming), а дергающаяся подвижность (твичинг подвижность – англ. twitching motility) обеспечивается пилиями IV-го типа. Подвижность, обусловленная жгутиками, может способствовать начальному образованию биопленки, облегчая транспорт бактерий к поверхности [22; 122; 141; 241].

Фимбрии/пили - это клеточные структуры, обладающие гидрофобными аминокислотными остатками, которые в зависимости от их ультраструктуры, белкового состава, генетических детерминант и механизмов сборки подразделяют на несколько категорий. Они вносят свой вклад в гидрофобность поверхности бактериальных клеток и в дальнейшем помогают при адгезии клеток к субстратам [267]. Так, например, с адгезией связывают пили 1-типа, обнаруженные, помимо *E. coli*, у *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri* и др. Пили 1-типа способствуют прикреплению бактерий к субстрату и обеспечивают межклеточные контакты. Каждая бактериальная клетка обычно несет 100-500 пилей 1-типа на своей поверхности. Они представляют собой вытянутые структуры, построенные из белка пилина, длиной 1,5 мкм и

диаметром 5–10 нм, расположенные перитрихиально [34]. Пили 1-типа состоят в основном из структурного белка FimA и нескольких вспомогательных белков, необходимых для транспортировки и сборки структурных белков. Было показано, что мутации в генах, кодирующих клеточные структуры *P. aeruginosa*, названные Cup фимбриями (от англ. *Chaperoneusher pathway*), влияют на способность клеток прикрепляться к поверхности. Накапливаются доказательства того, что Cup фимбрии, помимо их роли в начальном образовании биопленок, также играют роль в качестве соединений, связывающих клетки между собой в зрелых биопленках [141; 216; 241]. Наряду с пиллями 1-типа, было показано, что кэрли (англ. *curli fibers*) и антиген 43 выступают в качестве посредника при адгезии и при межбактериальных взаимодействиях на абиотических поверхностях. [91; 181; 236; 296].

В отличие от других видов пилей, пили IV-го типа отвечают у ряда бактерий за безжгутиковую подвижность и обеспечивают дергающуюся подвижность (твитчинг подвижность) уже прикрепившихся к поверхности бактерий, а так же участвуют в клеточной агрегации [72]. Например, было показано, что мутанты *P. aeruginosa*, дефектные по образованию пилей IV-го типа, адгезируют к поверхности, формируют монослой, но не образуют микроколонии и биопленку [34; 251]. Пили IV-го типа делятся на IVa и IVb, различающиеся длиной сигнального пептида [34; 126]. У *E. coli* найдены пили IV-го типа, образующие пучки (*bundle forming pili – BFP*) [98]. Кроме того пили IV-го типа в определенных условиях могут действовать в качестве сшивающих агентов между клетками и внеклеточной ДНК матрикса биопленки *P. aeruginosa* [122]. Были представлены доказательства того, что экспрессия главного структурного компонента пилей IV-го типа, PilA, подавляется в начальных стадиях формирования биопленок, но активируется на более поздних стадиях развития биопленки [141; 241].

Липополисахариды (ЛПС) из-за своих физико-химических свойств и расположения на наружной мембране бактериальных клеток, придают гидрофильные свойства бактериальной клетке, а также играют важную роль в первоначальном прикреплении клеток к поверхностям (особенно к гидрофильным) и в развитии зрелой биопленки (за счет взаимодействий клеток с другими клетками и с компонентами матрикса). Различные мутации, связанные с синтезом ЛПС в фитопатогенных бактериях, таких как *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas axonopodis* и *Xanthomonas citri*, а также *P. aeruginosa*, который также может функционировать как фитопатоген, приводили к снижению вирулентности и способности образовывать биопленки [20; 64; 75; 306].

Участие катионов металлов в адгезии и образовании биопленок

В адгезии и образовании биопленок участвуют катионы металлов. Большое внимание уделяется значению железа в инициации и поддержании структуры биопленки [19; 143; 181].

Продукция сидерофоров (небольшие молекулы, связывающие железо для дальнейшего его переноса из окружающей среды внутрь клетки) напрямую связана с образованием биопленки *P. aeruginosa* [143]. На модели *E. coli* показано, что бактерии обладают специальным регуляторным протеином (Fur), который является репрессором всех систем, связанных с транспортом железа. Fur-зависимый Iha-рецептор сидерофор энтерогеморрагической *E. coli* служит одним из адгезинов, который усиливает ее прикрепление к эпителиальным клеткам почек. Соединяясь с Fe^{2+} , Fur тормозит транскрипцию более 90 генов, которые участвуют в метаболизме, жгутиковой подвижности, патогенезе, окислительном и кислотном стрессе *E. coli*. Было показано, что Fur связывается не только с железом, но и с другими двухвалентными металлами, такими как Zn^{2+} и Co^{2+} . Это сопровождается потерей способности к взаимодействию с Fe^{2+} и утратой репрессорных функций Fur- Fe^{2+} комплекса. Добавление микроконцентраций $ZnCl_2$ вызывает значительное снижение адгезивных и биопленочных функций *E. coli* без подавления роста бактериальных культур [140; 291]. Предполагается, что то же самое будет происходить и с другими грамотрицательными бактериями, в том числе с *P. aeruginosa*, которые зависят от железа, используя специальные рецепторы-сидерофоры и связанные с ними белки-регуляторы [19; 20; 143].

Роль циклического димерного гуанозин монофосфата (c-di-GMP) в регуляции формирования и разрушения биопленок

Ключевая роль в формировании и разрушении бактериальной биопленки принадлежит сигнальной молекуле c-di-GMP – циклическому ди-гуанозин монофосфату [74; 77; 118]. Известно, что синтез внеклеточного матрикса биопленки и бактериальная адгезионная способность во многих случаях регулируется с помощью регуляторных белков, которые содержат GGDEF- и/или EAL- домены. С помощью двух классов ферментов, а именно дигуанилатциклаз (они синтезируют c-di-GMP) и c-di-GMP фосфодиэстераз (гидролизуют c-di-GMP, превращая его в неактивную ди-гуанозин монофосфат pGpG форму), содержащих, соответственно, GGDEF- и EAL- домены, контролируются внутриклеточные уровни c-di-GMP. c-di-GMP в свою очередь, выступает в качестве вторичного мессенджера и влияет на синтез внеклеточного матрикса и адгезию бактерий [57; 185; 270]. Для ряда бактерий было показано, что c-di-GMP участвует в регулирование переходов между планктонным и прикрепленным образом жизни [267]. Большинство регуляторных белков с GGDEF- и EAL- доменами участвуют не только в формировании биопленки, но и в процессах дифференцировки, подвижности, фотосинтеза и вирулентности бактерий. Эти белки составляют сложную бактериальную систему сигнальной трансдукции, обеспечивающую синтез молекулы-посредника – c-di-GMP [58; 186; 268]. Гены, ответственные за синтез и разрушение c-di-GMP, имеются, по-видимому, у всех

прокариотов, но отсутствуют у высших эукариотов [74; 86; 170]. Это делает c-di-GMP привлекательной мишенью для антибиоплёночных препаратов [19; 270].

Гены дигуанилатциклаз и фосфодиэстераз в наибольшем количестве представлены у грамотрицательных бактерий [74; 86]; поэтому роль c-di-GMP в биоплёночном процессе лучше всего изучена для грамотрицательной флоры, в частности, для *P. aeruginosa* [161; 205; 298]. Обработка биопленки *P. aeruginosa* токсичными соединениями тяжелых металлов ведет к ее отторжению. В этом участвует сенсорный рецептор BdlA, который, реагируя на изменение окружающей среды, запускает деградацию c-di-GMP [224]. Повышенные уровни оксида азота вызывают отторжение биопленки *P. aeruginosa*, что связано с взаимодействием между оксидом азота и рецептором BdlA, вовлекающим в реакцию фосфодиэстеразу [67]. Сообщалось, что GGDEF / EAL- доменный белок FimX, связывающий и деградирующий c-di-GMP, требуется для сборки пилей IV-го типа у *P. aeruginosa* при низких концентрациях c-di-GMP [161].

Переключение синтеза c-di-GMP с высокого уровня на низкий является одним из центральных механизмов, контролирующих образование и отторжение биопленки [77; 185]. Низкие уровни необходимы для фазы прикрепления бактерий к субстрату и используются на ранних стадиях адгезии. Они сменяются высокой продукцией c-di-GMP, которая характеризует фазу активного образования биопленки, обеспечивая снижение подвижности, повышенный синтез экзополисахаридов, агрегацию клеток и т.д. Для фазы активной дисперсии необходимо очередное уменьшение уровня c-di-GMP, которое сопровождается снижением синтеза биоплёночных экзополисахаридов и усилением жгутиковой подвижности [185].

Высокий уровень c-di-GMP положительно влияет на экспрессию *pel*- и *psl*-генов, ответственных за продукцию матриксных полисахаридов *P. aeruginosa* (Pel и Psl), и на образование биопленок, а низкий уменьшает образование биопленок [141]. Синтез альгината у *P. aeruginosa* также регулируется изменением уровней c-di-GMP. Было показано, что дигуанилатциклаза MucR, связанная с поверхностью клетки, положительно регулирует синтез альгината, предположительно за счет высоких локальных концентраций c-di-GMP [181]. У *Pseudomonas putida*, c-di-GMP регулирует образование биопленки путем связывания с внутренним мембранным белком LapD, контролирующим активность периплазматической протеиназы LapG, которая в свою очередь важна для большей адгезивности внешнего мембранного белка LapA, необходимого для формирования биопленки *P. putida* [134]. У *B. cepacia*, c-di-GMP регулирует образование биопленки путем связывания с транскрипционным регулятором Vcam1349, который индуцирует экспрессию генов, кодирующих ферменты для синтеза экзополисахаридов матрикса биопленки и фимбрий

[118]. Был обнаружен белок BdcA (от англ. biofilm dispersal via c-di-GMP), который связывает c-di-GMP и тем самым запускает отторжение биопленки *E. coli*, не влияя на ее формирование; этот белок также, по крайней мере, частично ответственен за стимуляцию свимминг и сворминг подвижности [205]. Ген *bdcA* обладает высоким консерватизмом. Он имеет 50–98 % гомологии для родов *Shigella*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Xanthomonas*, *Citrobacter*, *Sphingopyxis*, *Pantoea*, *Roseomonas* и 17-ти других родов бактерий, включая представителей рода *Pseudomonas*. Кроме того у *E. coli*, c-di-GMP активировывает RpoS-зависимую экспрессию регулятора биопленки CsgD в каскаде с участием нескольких дигуанилатциклаз и фосфодиэстераз [74].

Показано, что сульфатазол (антимикробный агент) в субингибиторных концентрациях блокирует синтез c-di-GMP, препятствуя развитию биопленки *E. coli* [58]. Обнаружено, что 5-фторурацил (противораковое средство) блокирует вирулентность и развитие биопленки *P. aeruginosa* в концентрациях, не влияющих на рост планктонных бактерий [61]. Можно ожидать, что получение новых препаратов, нацеленных на c-di-GMP и белки, причастные к его регуляции, окажется полезным для воздействия на патогенные бактерии и биоплёночные процессы [19; 298].

Биопленка *Pseudomonas aeruginosa*

Рассмотрим немного подробнее процесс формирования биопленки *P. aeruginosa*, а также компоненты и структуры этой бактерии, участвующие в данном процессе.

P. aeruginosa обладает множественной резистентностью к антибиотикам и способностью продуцировать защитный биопленочный матрикс. Матрикс *P. aeruginosa* может включать полисахариды, протеины, внеклеточную ДНК и др. [20]. Некоторые исследователи полагают, что ДНК-комплексы внеклеточного матрикса являются главными провоспалительными факторами матрикса биопленок *P. aeruginosa* [128].

Формирование биопленок у *P. aeruginosa* происходит поэтапно, согласно описанным ранее стадиям образования биопленок [19].

К первичным адгезинам *P. aeruginosa* относятся жгутики, пили IV-го типа и пилеподобные структуры (Сур-фимбрии) [20; 132; 236; 241]. Обнаружено, что в начальные фазы образования биопленок у *P. aeruginosa* активируются *src*-гены, ответственные за биосинтез фимбрий (пилей) [203; 222]. Также экспрессируется ген *pilA*, кодирующий белок пилин, являющийся структурной единицей фимбрий (пилей) [8; 34; 175]. Жгутики, пили IV-го типа и Сур-фимбрии неспецифически прикрепляются к биогенным и абиогенным субстратам, обеспечивая начало биопленочного процесса. Было показано, что мутанты *P. aeruginosa* с поврежденными жгутиками или пилиями значительно медленнее прикрепляются к поверхности глазных линз, чем их интактные варианты [296]. После адгезии бактерии *P.*

aeruginosa лишаются активного передвижения и начинают размножаться с образованием монослоя. При этом включается специальная функция, обеспечивающая возможность твитчинг подвижности клеток. Формируются многоклеточные скопления (микроколонии) бактерий. Микроколонии дифференцируются с образованием зрелой биопленки. На периферии биопленки находятся быстрорастущие клетки, внутри биопленки клетки растут медленнее, здесь создаются анаэробные условия [74; 132; 140; 171; 204; 296].

Было показано, что при хронической (биопленочной) пневмонии *P. aeruginosa* связывается с олигосахаридными компонентами муцинов, которые секретируются на поверхность слизистых оболочек респираторного тракта. В адгезии участвуют поверхностные белки *P. aeruginosa*, специфически реагирующие с нейтральными и кислыми гликопептидами [20; 175; 243; 294].

На поверхности *P. aeruginosa* обнаружено два белка со свойствами лектинов – LecA и LecB [111]. Они специфически связываются с производными D-галактозы (LecA) и L-фукозы (LecB). Штаммы, лишённые LecA и LecB, хуже прикрепляются к монослою легочных эпителиальных клеток, чем исходные бактерии, из которых они были получены [95]. Совместное введение *P. aeruginosa* с углеводными ингибиторами лектинов LecA и LecB (альфа-метил-галактозид и альфа-метил-фукозид) снижает повреждение респираторных клеток *in vitro* и *in vivo* (опыты на мышах) [95]. Эти данные согласуются с другими работами, в которых показали, что LecA и LecB участвуют в образовании биопленочного матрикса, скрепляя между собой молекулы Psl- и Pel- матриксных полисахаридов [111; 295]. Было показано, что галактоза и фукоза снижают респираторную инфекцию *P. aeruginosa* у человека [294]. Женское молоко (за ним следует молоко ламы, жирафа) эффективно подавляет связывание галактофильного LecA и фукозофильного LecB лектинов *P. aeruginosa* с рецепторами клеток человека [334]. По мнению авторов, полимерные гликаны женского молока и других сходных с ним молочных продуктов могут быть использованы для профилактики биопленочных инфекций [19; 20].

Кроме LecA и LecB, на поверхности *P. aeruginosa* расположен еще один лектиновый белок, CdrA. Ген *cdrA* относится к двухгенному оперону, один из компонентов которого отвечает за продукцию белка (CdrB), который обеспечивает секрецию своего партнера, CdrA [77]. CdrA участвует в создании стабильной биопленки, скрепляя нити матриксного Psl-полисахарида. Этот процесс может быть заблокирован производными маннозы, т.е. CdrA обладает свойствами лектинов [19; 278].

Были получены данные о роли двухкомпонентных систем при образовании биопленок *P. aeruginosa*. Продукция экзополисахаридов контролируется сложной регуляторной системой включающей в себя сенсорные киназы RetS, GacS и LadS и малые регуляторные

молекулы РНК, а также c-di-GMP [226]. Производство Cup-фимбрий, в частности CupD, контролируется другой двухкомпонентной системой – Rcs/Pvr, в которой активность регулятора ответа RcsB регулируется киназой PvrS и фосфатазой RcsB [76; 216; 218].

Стабильное прикрепление бактерий зависит также от секреции полисахаридов, с которыми связано образование биопленочного матрикса. Было показано, что внеклеточные полисахариды участвуют в прикреплении *P. aeruginosa* к слизистым оболочкам, обеспечивая формирование биопленки [204]. *P. aeruginosa*, в зависимости от штамма и условий роста, может синтезировать, по крайней мере, три различных экзополисахарида: альгинат, Pel- и Psl- [20; 100; 122; 204].

Мономерными единицами альгината являются маннуроновая и гиалуроновая кислоты, относительное содержание и распределение которых определяют свойства конкретного альгината [146]. Было показано, что альгинат выполняет протекторные функции (увеличивает устойчивость патогенных бактерий к терапии с применением антибиотиков и к иммунной защите организма при хронических инфекциях) в биопленочном матриксе, он химически связывает аминокликозиды за счет инактивации гидрофильных и положительно заряженных групп в молекуле [170; 222; 316]. Другие экзополисахариды, входящие в состав матрикса биопленки *P. aeruginosa*, такие как глицерол-фосфорилированные бета-глюканы, так же, как и альгинат, не просто замедляют диффузию аминокликозидов сквозь биопленку, но и активно связывают антибиотики [259]. Мукоидные виды *P. aeruginosa* в биопленках обильно синтезируют альгинат (кодирующий генный кластер – *algACD*), штаммы со сверхэкспрессией гена *algA* обычно образуют слизистые колонии с выраженными свойствами вирулентности [19; 234].

Тем не менее, большинство штаммов *P. aeruginosa* не являются мукоидными, и было обнаружено, что альгинат не является важным обязательным компонентом внеклеточного матрикса биопленки немучоидных лабораторных штаммов. Было показано, что немучоидные и мутантные штаммы с дефектом альгинатных генов сохраняют способность к образованию биопленки, а в колонизации муковисцидозного легкого изначально участвуют немучоидные формы *P. aeruginosa*, которые через месяцы и годы сменяются мукоидными (альгинатными) культурами [71; 141; 241]. Это говорит о том, что *P. aeruginosa* располагает другими генами, которые отвечают за синтез полисахаридов, играющих важную роль в биопленочном процессе. Позже было показано, что матриксные полисахариды поддерживают структуру биопленки тотчас после прикрепления *P. aeruginosa* к субстрату (Pel-полисахарид) или на более поздней стадии биопленочного процесса (Psl-полисахарид), и только те из мутантов *P. aeruginosa*, которые имеют двойной дефект по *pel*- и *psl*-генам, не способны к образованию биопленки [20; 77; 204]. Pel- и Psl- полисахариды, представляют собой разветвленные

гетерополисахариды, причем основным компонентом Pel-полисахарида является глюкоза, а Psl- обладает высоким содержанием маннозы. Pel-полисахарид способен играть как структурную, так и защитную роль (повышает устойчивость к аминогликозидным антибиотикам) в биопленке *P. aeruginosa*, а Psl- увеличивает адгезию *P. aeruginosa* к муциновым и эпителиальным клеткам дыхательных путей [141; 204; 241]. Потеря продукции Pel-полисахарида в лабораторном штамме PAO1 не привела к разнице в прикреплении или в развитии биопленки; оказалось, что Psl- является основным структурным полисахаридом для зрелой биопленки. Интересно, что этот эффект является штаммоспецифическим, поскольку Pel-полисахарид имеет решающее значение для поддержания взаимодействий между клетками в биопленке штамма *P. aeruginosa* PA14, выступая в качестве основного структурного каркаса для сообщества, а делеция гена *pelB* приводила к биопленочному дефициту [100]. В тоже время другие экзополисахариды, имеющиеся у *Pseudomonas* spp., такие как леван, возможно также играют определенную роль в формировании биопленок [139].

Роль биопленок в инфекционном процессе. Резистентность бактерий, живущих в биопленках, к антибактериальным агентам

К настоящему времени доказана роль микробных биопленок в возникновении и развитии таких заболеваний [9], как:

- инфекции, связанные с образованием биопленок на имплантируемом оборудовании (катетерах, сердечных клапанах, суставных протезах и др.), вызванные *S. aureus* и др. микроорганизмами;
- инфекции среднего уха, вызываемые, например, *Haemophilus influenzae*;
- пародонтит, вызванный рядом микроорганизмов полости рта;
- инфекции, связанные с хроническими ранами;
- инфекции мочевыводящих путей, вызванные *E. coli* и др. патогенами;
- муковисцидоз (кистозный фиброз), вызываемый *P. aeruginosa*, и другие инфекции верхних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта.

Все эти заболевания трудны для лечения, имеют высокую частоту рецидивов и некоторые из них могут явиться причиной летальных исходов [4; 7; 8; 10; 14; 82; 101; 151]. Далеко не до конца ясны механизмы, по которым микроорганизмы, образующие биопленки, вызывают патологические процессы в макроорганизме.

При антибиотиковой терапии инфекционных заболеваний существует несколько серьезных препятствий, одно из которых (наряду с генетической и приобретенной устойчивостью бактерий к антибиотикам) связано с бактериями, находящимися в биопленке.

Биопленки, формируемые патогенными микроорганизмами, являются причиной ряда хронических инфекций, которые не поддаются лечению антибиотиками [9; 151]. Концентрации антибиотиков, требуемых для достижения бактерицидного эффекта для микроорганизмов, обитающих в биопленках, в ряде случаев, в зависимости от природы антибиотика, может быть в 10–1000 раз выше, чем для планктонных форм данной бактерии [79; 151; 172; 174]. В результате лечение стандартными дозами антибиотиков способно уничтожить только планктонные клетки, не затрагивая прикрепленные формы, которые могут выживать в биопленке и размножаться, когда терапия закончена, а использование высоких концентраций антибиотиков в течение длительного времени может вызвать устойчивость клеток к антибиотикам и многочисленные побочные эффекты. Кроме того, патогенные микроорганизмы, живущие в биопленке, взаимодействуют с иммунной системой организма хозяина. Антигены бактерий биопленки стимулируют синтез антител, но при этом являются устойчивыми к механизмам иммунной защиты организма [82; 145; 181]. Именно поэтому некоторые ученые считают не вполне корректной практику определения чувствительности к антибиотикам именно планктонных микроорганизмов, поскольку установленные на основе выявленных минимальных подавляющих концентраций дозы препаратов могут быть совершенно неадекватными для борьбы с возбудителями, находящимися в биопленке [9; 13; 44; 172].

Несмотря на интенсивные исследования, механизмы, лежащие в основе антибиотикорезистентности бактерий биопленки, все еще не до конца изучены.

К настоящему времени описан ряд факторов, ответственных за резистентность биопленок к антибиотикам [31; 45; 79; 209; 269]. К ним относятся:

- модификации мишени;
- инактивация антибиотиков внеклеточными полимерами или ферментами;
- ограниченное проникновение антимикробных веществ в биопленки;
- различия в метаболической активности и скорости роста отдельных клеток бактерий, а также замедление метаболизма и, соответственно, уменьшение скорости роста микроорганизмов в условиях лимитирования питательных веществ в биопленке, из-за чего антибактериальный препарат диффундирует из биопленки быстрее, чем успевает подействовать на микроорганизмы, находящиеся в биопленке;
- экспрессия возможных генов резистентности;
- возникновение в биопленке под воздействием антибиотиков микроорганизмов-персистеров.

У бактерий в биопленках возможны те же типы резистентности к антибиотикам, что и у планктонных бактерий. Например, модификация мишени, как причина резистентности к

антибиотикам биоплёночных бактерий, была показана для мутантов штамма *S. aureus*. Мутация в кластере I гена *groB*, кодирующего бета-цепь ДНК-зависимой РНК-полимеразы (основная мишень для рифампицина), обеспечивала в опытах *in vivo* резистентность стафилококковой биоплёнки к рифампицину [45; 323]. Инактивация антибиотиков была продемонстрирована на примере биоплёночных бактерий *P. aeruginosa*, немуконидные изоляты которых обладали повышенной способностью продуцировать β -лактамазы [71; 172; 175]. Это явление приводило к нечувствительности изучаемых биоплёнок к антибиотикам β -лактаминового ряда. В опытах с биоплёнками этой бактерии было также доказано активное выведение антибиотика из микробной клетки со скоростью, превышающей скорость поступления внутрь клетки [209]. Этот процесс (efflux) осуществлялся за счет гиперэкспрессии мембранной помпы MexCD-OprJ. Возможность ослабления проницаемости антибиотиков через внешнюю мембрану бактериальных клеток продемонстрирована на модели *V. cholerae* [45; 240]. Был получен образующий биоплёнку мутант *V. cholerae* D116A с измененной структурой порына OmpU, который проявлял выраженную резистентность к цефалоспориновым антибиотикам. Перечисленные примеры объясняют механизмы устойчивости биоплёночных бактерий к одному или нескольким однотипным антибиотикам [45].

Вместе с тем, бактерии в биоплёнках обладают свойством множественной устойчивости к антибиотикам разных групп. Множественная резистентность может быть связана с существованием в биоплёнках особых персистирующих форм бактерий, или персистеров [24; 54; 195; 278]. Персистер – это фенотипический вариант клеток с обычным для данного штамма генотипом, но с сильно заторможенным метаболизмом. Персистеры существуют не только в биоплёнках; во всех культурах, где преобладают замедленные типы деления клеток (а биоплёнка относится к таким культурам), относительное количество персистеров больше, чем среди быстро делящихся бактерий. В биоплёнках, образуемых различными бактериями, количество персистеров варьирует от 1 до 10 % [17; 45; 54]. Главной особенностью персистирующих клеток является их удивительная способность к выживанию при воздействии антибактериальных агентов [24; 32; 72; 97; 195].

Множественная резистентность может быть связана также с фильтрующей способностью матрикса, так как внеклеточный матрикс не только связывает клетки в единую структуру, но и заполняет межклеточные пространства, образуя трехмерную фильтрующую систему. Все это позволило считать фильтрацию одной из важнейших функций биоплёнки [45; 114]. Поэтому ограничение проникновения антибактериальных препаратов внутрь биопленок связывают с наличием биополимерного матрикса, окружающего биопленку, способного не только препятствовать диффузии, но и связывать антимикробные вещества.

Ограничение диффузии, вызываемое биополимерным матриксом, уже само по себе защищает биопленки, поскольку уменьшается концентрация антибиотика, проникающего внутрь биопленки. Опубликованы работы, в которых наблюдали замедленную диффузию антибиотиков внутрь биоплёнок [269]. Например, было описано затруднение проникновения ципрофлоксацина внутрь биоплёнки *P. aeruginosa* [79; 141; 174; 228]. Трансмиссивная электронная микроскопия показала, что повреждение биоплёночных бактерий при обработке цефуроксимом зависит от того, насколько глубоко от поверхности биопленки они расположены. Локализация поврежденных бактерий ограничивалась поверхностными слоями биоплёнки, во внутренних слоях поврежденных клеток было значительно меньше [174; 256; 269].

Определенные элементы матрикса биопленки способны связывать антимикробные вещества. Например, слизь, которая продуцируется некоторыми патогенами, заполняя межклеточное пространство в биоплёнках, может обладать связывающим антибиотик действием. Было показано, что слизистые полисахариды, выделенные из биоплёнок *Staphylococcus epidermidis*, снижали антибактериальный эффект ванкомицина и тейкопланина [213; 269]. Аналогичное подавление активности гликопептидов (ванкомицина, тейкопланина) и β -лактамов (оксациллина, цефотаксима) было получено в опытах со слизистым матриксом, вырабатываемым штаммами эпидермального и золотистого стафилококков [1; 89; 92; 213]. Исследования внеклеточного полимерного вещества биопленок продемонстрировали, что 2 %-ая суспензия альгинатов, выделенная из биопленки *P. aeruginosa*, ингибировала действие гентамицина и тобрамицина, однако этот эффект отсутствовал при одновременном использовании альгинатных лиаз [35]; в тоже время, альгинатная слизь *P. aeruginosa* значительно ингибировала активность тобрамицина [79; 141; 174]. Структуры матрикса действуют против антибиотиков избирательно. Было показано, что слизь стафилококков не влияет на активность рифампицина и ранбезолида. Другие эксперименты продемонстрировали, что слизистый матрикс (*S. epidermidis*) не препятствует проникновению ванкомицина и рифампицина сквозь биоплёнку [213; 269]. Вероятно, исход взаимодействия матрикса и антибиотика зависит не только от видовой принадлежности образующих биоплёнку бактерий и типа антибиотика, но и от их штаммовых особенностей, а также от возраста биопленки, т.е. параметров, которые могут определять химический состав и архитектуру матрикса [45].

Помимо ограниченной диффузии и возможного связывания антибиотиков компонентами матрикса биопленки, существует и другой механизм устойчивости бактерий в биопленках – каталитическое расщепление с помощью ферментов. В случае образования в клетках биопленки ферментов, вызывающих деградацию или модификацию антибиотиков,

имеет место синергидное действие перечисленных эффектов, обеспечивающее биопленкам еще более эффективную защиту. Задержка проникновения антибиотиков в биопленку приводит к уменьшению их концентрации в биопленке, тем самым помогая бактериальным ферментам успеть инактивировать поступающий антибиотик [34; 79; 256; 269]. Особенно эффективно в этих случаях обеспечивается резистентность к большим молекулам, таким как белки лизоцим и комплемент, а также положительно заряженным аминогликозидным антибиотикам. Известно множество ферментов, которые выделяются бактериями в окружающую среду для предохранения от действия антимикробных веществ различной природы. Например, пероксидаза и каталаза вырабатываются бактериями для защиты от губительного действия пероксида водорода, который способен быстро уничтожить планктонные клетки микроорганизмов. Пероксид водорода не эффективен против уже сформированной микробной биоплёнки, так как внеклеточные полимеры матрикса биопленки адсорбируют большие количества выделяемой бактериями каталазы, и пероксид водорода не успевает проникнуть вглубь биопленки, разлагаясь на её поверхности. Несмотря на обильное выделение газообразного кислорода в виде пузырьков, пероксид водорода не проникал вглубь биоплёнки даже спустя почти час после начала обработки. Более того, в ответ на стрессовое воздействие выделяющегося кислорода бактерии поверхностных слоёв «просигнализировали» глубже лежащим бактериям о необходимости выйти из фазы покоя и приступить к размножению. Такая коллективная адаптация бактерий ускорила синтез дополнительных количеств каталазы для защиты экосистемы биоплёнки от воздействия биоцида [45; 156; 174; 207; 281].

Еще один механизм множественной лекарственной устойчивости может быть связан с тем, что внутри биоплёнки могут присутствовать популяции бактерий с разными защитными свойствами, дополняющими друг друга [142]. В полимикробных биоплёнках наблюдаются наиболее сложные сочетания резистентности к антибиотикам, так как одно из свойств таких биопленок – совокупные защитные способности, которые бактерии различных видов могут передавать между собой. Например, устойчивые к антибиотикам бактерии способны выделять защитные ферменты или белки, связывающие антибиотики, которые могут защищать соседние чувствительные к антибиотикам бактерии в биопленке. Также они могут передавать другим бактериям гены, отвечающие за резистентность к антибиотикам, даже между различными видами бактерий. Была доказана межвидовая передача генов резистентности к антибиотикам, которая, по мнению авторов, успешнее реализовалась в условиях тесного контакта бактерий внутри биоплёнки. В частности, внутри популяции биоплёночных бактерий была показана возможность передачи генов устойчивости к

ванкомицину (*vanA*) и тетрациклину – *tet(S)*, *tet(U)* (передача плазмид) от *Enterococcus faecium* к *S. aureus* резистентным к метициллину [45; 142; 151; 275].

В ряде исследований было показано, что специфические характеристики экзополисахаридного матрикса биопленок, присущие одному виду бактерий, могут играть существенную роль в способности других видов присоединяться и внедряться в существующую биопленку [2; 142; 202; 262]. Например, немукцидные изоляты *P. aeruginosa* из биопленок от больных с муковисцидозом способны к продукции высоких уровней β -лактамаз, что отличает их от мукцидных изолятов, лишенных такой способности. Немукцидные бактерии высвобождают мембранные везикулы, содержащие высокие концентрации β -лактамаз, тем самым обеспечивая защиту мукцидных бактерий этого вида от β -лактамных антибиотиков. Мукцид, главным компонентом которого является альгинат, обеспечивает защиту биопленочных бактерий от других антибиотиков, например от тобрамицина [71; 172; 175]. Подобный механизм защиты описан и для представителей других таксономических групп. Вероятно, такая генетическая кооперация внутри биопленки позволяет бактериальному сообществу более рационально использовать свои жизнеобеспечивающие ресурсы и гибко реагировать на повреждающие факторы, достигая при этом главной стратегической цели – выживания вида [45].

Опубликованы работы, которые подтверждают, что возникновение и выраженность резистентности биопленочных бактерий зависят от многих параметров. К факторам, которые могут формировать резистентность к антибиотикам биопленочных бактерий, можно отнести недостаток кислорода (для *P. aeruginosa*), ограничение питательных веществ (для *K. pneumoniae*) и, конечно же, сигналы Quorum Sensing систем регуляции [78; 79; 142; 174; 228]. Например, были представлены доказательства того, что биопленочные бактерии *P. aeruginosa* становятся чрезвычайно устойчивыми к антибиотикам при ограничении/лимитировании питательных веществ (обеспечивается с помощью активных ответов на голодание/стресс) и что резистентность зависит от способности клеток модулировать продукцию прооксидантных хинолонов [141; 228]. Используя транскриптомный подход, направленный на раскрытие физиологических и генетических основ увеличения устойчивости бактерий, живущих в биопленке, к антибиотикам, обнаружили 293 гена, которые экспрессируются на более высоких уровнях в биопленочных бактериях *P. aeruginosa*, чем в планктонных бактериях. Это указывает на то, что существенный вклад в устойчивость вносят особенности “биопленочного” фенотипа клеток, выраженные в избирательной экспрессии генов “устойчивости”. К таким генам, в частности, относят “ген-регулятор ответа на аминокликозиды” (*arr*) *P. aeruginosa*, кодирующий мембранную фосфодиэстеразу, субстратом которой, в свою очередь, служит “вторичный

мессенджер” – c-di-GMP [123; 150]. Эти данные также дополняют существующие концепции того, что антибиотики часто убивают бактерии путем окислительного стресса, и что механизмы, которые увеличивают стресс, могут повысить противомикробную активность, в то время как защита от окислительного стресса повышает резистентность [144; 178]. Наиболее общий механизм возникновения резистентности может быть связан с повышением мутабельности бактерий в биоплёнке. На примере *P. aeruginosa* было продемонстрировано, что угнетение антиоксидантных систем в клетках биоплёнок ведёт к кислородозависимому повреждению ДНК, накоплению множественных мутаций и появлению резистентности к антибиотикам [45; 79; 113].

В тоже время недавно было обнаружено еще одно явление, которое усложняло борьбу с биопленками. Оказалось, что некоторые вещества, образуемые растениями [25; 245], а также многие антибиотики в субингибиторных дозировках регулировали (обычно стимулировали) формирование биоплёнок, хотя и не убивали биоплёночные бактерии [13; 33; 168; 233]. Так, например, аминогликозидный антибиотик тобрамицин в субингибиторных концентрациях индуцирует образование биопленок у *P. aeruginosa* и *E. coli* [150]. Аналогичный эффект вызывает имипенем (β -лактамный антибиотик широкого спектра действия) [233]. Ванкомицин в дозах ниже минимальной ингибирующей концентрации стимулировал образование биоплёнок изолятов *S. epidermidis*, выделенных из биоплёнки с ортопедического протеза [89]. Добавление к суспензии планктонных клеток *P. aeruginosa* антибиотика ципрофлоксацина в дозах, значительно меньших, чем терапевтические, способствует интенсивному процессу образования биопленки, но при этом значительно подавляется рост планктонных клеток [1]. Субингибиторные дозы диклоксациллина, напротив, угнетали формирование биоплёнок *S. epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus* [92], а макролиды тормозили биоплёночный рост *P. aeruginosa* за счет угнетения подвижности, связанной с пиями IV-го типа [38; 79; 172]. Показано, что антибиотики (азитромицин, рифампицин) в низких концентрациях (слабо или совсем не подавляющих рост планктонных культур изучаемых микроорганизмов) вызывают заметную стимуляцию образования биопленок, тогда как для оксациллина это явление не обнаружено. Добавление азитромицина или рифампицина после завершения этапа обратимой адгезии (через 4–6 ч) приводило к снижению или отсутствию эффекта стимуляции образования биопленок [36]. Механизм стимулирующего действия антибиотиков на формирование биопленок остается неизвестным. Высказано предположение, что аминогликозидные антибиотики могут влиять на уровень c-di-GMP, который является фактором, влияющим на образование биопленок [150]. Другая возможность – стимуляция синтеза адгезинов и как следствие индукция образования биопленок при рибосомальном стрессе, вызванном воздействием

субингибиторных концентраций антибиотиков, нарушающих функционирование рибосом [74]. Также предполагают, что антибиотики, непосредственно или опосредовано влияющие на процесс транскрипции и трансляции, имитируют действие стрессовых факторов, запускающих процессы формирования “биопленочного фенотипа” с участием сигма-фактора RpoS и других активаторов [36]. Некоторые ученые объясняют стимулирующий эффект низких доз антибиотиков сложностью сигнальных путей, вовлеченных в глобальную генетическую регуляцию в ответ на стрессорные воздействия [168].

Методы борьбы с микробными биопленками: подходы к профилактике образования или разрушения биопленок

Во многих случаях, антимикробные агенты (биоциды, антибиотики и дезинфектанты) и механическая очистка являются широко используемым методом борьбы с биопленками [7; 9; 13; 44]. Механическая очистка эффективна, но может быть дорогостоящей, поскольку она часто включает в себя простой оборудования или значительные трудовые расходы, а также иногда бывает трудно добраться до всех участков оборудования, загрязненных биопленкой. Однако устойчивость бактерий в биопленках к классическим схемам обработки биопленок антимикробными агентами и нецелесообразность использования в ряде случаев механической очистки подчеркивают необходимость разработки новых подходов [82; 101; 151; 160; 176].

На данный момент наиболее перспективными представляются следующие направления борьбы с биопленками [9; 35; 43; 169; 181]:

- предотвращение первичного инфицирования медицинского или другого оборудования/устройств;
- минимизация начальной адгезии микробных клеток к поверхности (на данном этапе, бактерии все еще чувствительны к антибиотикам);
- разработка методов проникновения через внеклеточный матрикс биопленки различных антимикробных агентов с целью подавления активности клеток живущих внутри биопленки;
- блокировка синтеза и/или разрушение внеклеточного полимерного матрикса биопленки;
- нарушение межклеточного обмена информацией.

Перечисленные методы воздействия на биопленки могут сочетаться с действием собственно бактерицидных агентов. Подобное лечение, действующее на структуру или функции биопленок, может оказаться более эффективным, чем стандартная антибактериальная терапия [145; 249].

В течение последних десятилетий были разработаны разнообразные технологии против образования бактериальных биопленок на различных поверхностях [121], в том числе действие УФ-облучения, ультразвука, электрических полей, противообрастающих полимерных покрытий, красок и др. [121; 173; 193; 212; 249; 250; 318; 326]. Например, была показана эффективность ультразвука против биопленки *P. aeruginosa*, адгезированной на стали, более того оказалось, что эта обработка повысила эффективность гентамицина в отношении тех же биопленок; при обработке ультразвуком удалялось до 95 % *Pseudomonas diminuta*, адгезированных на ультрафильтрационной мембране, и ингибировалось прикрепление личинок рачков к поверхности субстрата [138; 155; 335].

С использованием достижений ультразвуковой химии (сонохимия) были синтезированы наночастицы с антибиопленочными свойствами. Синтез таких наночастиц является перспективным для разработки новой антибиопленочной стратегии, которая могла быть полезной в клинической практике. Интересно, что нано-антибиотики, которые были созданы с использованием сонохимии, оказались более активны и более эффективны, чем классические антибиотики против лекарственно-устойчивых патогенных микроорганизмов. Этот эффект может быть связан с улучшением проницаемости данных веществ через клеточную стенку, а также преодолением механизмов бактериальной резистентности к антибиотикам [193]. Также следует упомянуть использование наночастиц суперпарамагнитного оксида железа (SPION) в качестве ингибитора роста и формирования биопленок *S. epidermidis* [292].

Изучение влияния электромагнитного воздействия на различных частотах молекулярного спектра поглощения и излучения (МСПИ) показало, что облучение культуры бактерий *P. aeruginosa* на частоте МСПИ оксида азота (NO) снижает ее способность к образованию биопленки и индуцирует переход к планктонному способу роста, а при облучении на частоте МСПИ кислорода (O₂) наблюдался противоположный эффект [27]. Новым способом борьбы с биопленками условно-патогенных микроорганизмов, в частности образованных *P. aeruginosa*, является фотодинамическое уничтожение планктонных и биопленочных культур (фотодинамическая дезинфекция). В экспериментах *in vitro* осуществляли облучение планктонных клеток связанных с фотосенсибилизатором метиленовым синим. Результаты показали, что облучение светом с длиной волны 670 нм планктонных клеток с фотосенсибилизатором при использовании нетермального диодного лазера, проводимое в условиях однократной экспозиции, определяло 100 %-ный эффект уничтожения планктонных клеток и 99 %-ное снижение жизнеспособности клеток внутри 24-х часовой биопленки *P. aeruginosa* [286].

Наиболее распространенная практика защиты трубопроводов, корпусов судов, нефтяных платформ и т.п. поверхностей погруженных в воду от биообрастания заключается в том, чтобы покрыть их антибиопленочными красками, содержащими биоциды. Например, было показано, что краски, содержащие дихлор-халкон, повреждали клеточные мембраны, снижали гидрофобность поверхности и ингибировали образование биопленки [271]. В прошлом, наиболее широко используемые и эффективные краски содержали в своем составе в качестве биоцида, главным образом, тяжелые металлы, такие как медь, свинец, ртуть, мышьяк, кадмий. Но многие из этих соединений представляют угрозу для морской экосистемы, поэтому в настоящее время идет поиск нетоксичных противообрастающих (антибиопленочных) соединений и выяснение молекулярных механизмов их действия. Четкое понимание механизма действия таких соединений предоставит важную информацию о чувствительных молекулярных мишенях и сигнальных путях, ответственных за процесс биообрастания. Эта информация может помочь при создании целевых биоанализов, использующих чувствительные биомаркеры для быстрого скрининга антибиопленочных соединений. В настоящее время противообрастающие соединения обычно подразделяют по механизму их действия на пять основных категорий: 1) ингибиторы ионных каналов; 2) ингибиторы Quorum Sensing систем; 3) блокаторы нейромедиаторов; 4) ингибиторы синтеза адгезинов; 5) ингибиторы ферментов, регулирующих выработку энергии или первичный метаболизм; 6) соединения с общим механизмом действия, для которых не были определены молекулярные мишени [121; 249; 271; 273].

Недавно была представлена скрининговая система, которую можно использовать для открытия новых соединений ингибирующих биопленки, на основе метода высокопроизводительного скрининга (анг. high-throughput screening method) за счет использования для получения изображений высокопроизводительной эпифлуоресцентной микроскопии (анг. high-throughput epifluorescence microscopy imaging). С помощью этой системы были определены новые натуральные продукты с активностью против биопленок *Pseudomonas* и *Vibrio* [242]. Два найденных соединения могли ингибировать образование биопленок и разрушать уже сформированные биопленки. Наконец, было показано, что одно из них обладает способностью повышать чувствительность уже сформированных биопленок к действию антибиотиков, в том числе к тетрациклину и ципрофлоксацину [145].

Признанной проблемой при борьбе с биопленками является наличие в них небольших, но значимых популяций персистентных клеток (персистеры), которые являются физиологически резистентными к антибиотикам (см. предыдущий раздел) [54]. Поэтому сокращение числа персистентных клеток в биопленках и одновременное введение сильнодействующих антибиотиков может быть эффективной стратегией борьбы при

инфекциях, осложненных образованием биопленок. Так как уровень ионов водорода влияет на чувствительность к антибиотикам (например, к тобрамицину), повышение рН должно привести к снижению устойчивости бактерий в биопленках к антибиотикам. Действительно, данные эффекты наблюдались при добавлении щелочных аминокислот, таких как аргинин, добавление которого не только увеличило рН, но и значительно повысило чувствительность бактерий к антибиотикам. Такая многообещающая комбинированная терапия была продемонстрирована с помощью модели имплантации венозного катетера на крысах, в которой гентамицин, неэффективен сам по себе, становится весьма эффективным в сочетании с аргинином [94]. Было обнаружено, что комплекс D-аминокислот (D-тирозин, D-лейцин, D-триптофан, D-метионин), синтезируемых во время стационарной фазы роста, или добавление экзогенных D-аминокислот (смеси или отдельных D-аминокислот) также препятствует образованию биопленки и/или разрушает уже зрелые биопленки *P. aeruginosa* и ряда других бактерий, но не влияет на их рост или экспрессию компонентов матрикса биопленки. Полагают, что этот эффект зависит от включения D-аминокислот в пептидные цепи пептидогликана (вместо конечного D-аланина), что препятствует формированию адгезивных связей с субстратом [179]. Норспермидин (анг. norspermidine) ингибировал биопленки *B. subtilis*, *S. aureus* и *E. coli*, воздействуя на экзополисахариды. Таким образом, новый метод борьбы с биопленками может заключаться в использовании D-аминокислот в сочетании с норспермидином или другими полиаминами, способными связываться с определенными экзополисахаридами [19; 181].

Были описаны антиадгезины различной природы, в их числе зостеревая кислота, экстрагированная из морской травы *Zostera marina*, капсаицин, выделенный из перца *Capsicum frutescens*, и ряд других веществ, способных блокировать адгезию бактерий к субстрату, таким образом, предотвращая образование биопленки [176; 294; 318]. В опытах *in vitro*, было продемонстрировано, что муциновые биополимеры предотвращают колонизацию поверхности патогенными бактериями. Муцины способствуют бактериальной сегрегации и ингибируют прикрепление бактерий, однако было показано, что данные эффекты были преодолены неподвижными синтезирующими альгинат- и Psl- полисахариды бактериями *P. aeruginosa*, которые образуют взвешенные агрегаты [145]. Блокировать прикрепление некоторых бактерий к абиогенным и биогенным субстратам удавалось также при помощи таких олигосахаридов как декстран, декстран-сульфат, гепарин и др. [9; 14; 235; 294]. Например, было показано, что декстран и другие нейтральные полисахариды (гликоген, маннан) тормозят прикрепление к легочным и буккальным эпителиальным клеткам не только *P. aeruginosa*, но и других респираторных патогенов (*S. aureus*, *Str. pyogenes*, *H. influenzae*) [19; 294]. Полисахариды, выделенные из бесклеточных экстрактов некоторых

видов бактерий, также обладают антибиопленочными свойствами. Большинство антибиопленочных полисахаридов показывают широкий спектр ингибирования биопленок; некоторые из них способны разрушать уже сформировавшиеся биопленки. Было показано, что образование биопленки *P. aeruginosa* и ряда других грамотрицательных и грамположительных бактерий подавлялось в присутствии супернатанта культуры некоторых штаммов *E. coli*, которые секретируют капсульный полисахарид группы II. Реагируя с субстратом, он препятствует его взаимодействию с бактериями, неспецифически блокируя первичную адгезию [300]. Супернатанты культуры *P. aeruginosa*, содержащие Pel- и Psl-полисахариды, разрушали уже сформировавшиеся биопленки *S. epidermidis* и *S. aureus* без ингибирования роста этих бактерий. Кроме того, они увеличивают эффективность антибиотиков при совместном введении. Антиадгезивное действие проявляют и биосурфактанты, образуемые некоторыми бациллами [64; 70; 262]. Все это говорит о том, что применение антибиопленочных полисахаридов может быть перспективной стратегией для лечения и профилактики инфекций, осложненных биопленками [24; 181].

Было показано, что хелатирующие агенты, помимо вмешательства в стабильность бактериальной мембраны, дестабилизируют архитектуру биопленки, так как известно, что катионы металлов вовлечены в адгезию и образование биопленки [140; 181]. Например, связывание (хелатирование) двухвалентных катионов при помощи ЭДТА (disodium-EDTA, tetrasodium-EDTA), цитрата и/или использование миноциклина с ЭДТА ведет к нарушению взаимодействия бактерий с субстратом, подавляя образование биопленки [65]. Блокаду адгезии можно также получить при введении в систему гидрофобных агентов, которые тормозят взаимодействие бактерий с субстратом [176]. Например, это наблюдалось в присутствии р-нитрофенола, который почти полностью подавлял адгезию *P. aeruginosa* в культуре пневмоцитов человека [294].

В качестве кандидатов для разработки новых типов антибиотиков для борьбы с биопленками бактерий были предложены антимикробные пептиды, производимые системой врожденного иммунного ответа. Кателицидины составляют один из важнейших классов антимикробных пептидов. Последние работы показали, что SMAP-29, VMAP-28, и VMAP-27 значительно снижали образование биопленки штаммами *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), выделенными из изолятов больных муковисцидозом, и убивали бактерии внутри уже сформированных биопленок [181]. Было показано, что лактоферрин, секретируемый нейтрофилами человека, способен подавлять формирование биопленок *P. aeruginosa*, хотя и не может вызывать их отторжение [1]. Представитель еще одной группы антибактериальных средств иммунной защиты человека – катионный пептид LL-37, содержащийся в гранулах фагоцитов, – ингибировал формирование биопленок *P.*

aeruginosa. Механизм его действия связан с уменьшением способности бактериальных клеток к адгезии, со стимуляцией твитчинг-подвижности и с влиянием на Quorum Sensing системы, что в конечном итоге приводило к подавлению экспрессии генов, необходимых для развития биопленки [238].

При колонизации твердых поверхностей материал, из которого изготовлена колонизируемая поверхность, а точнее – его физико-химические свойства (гидрофильность, электрический заряд, инертность, гладкость и т.п.), играют важную роль в возможности и скорости образования биопленок. Немаловажный вклад в этот процесс вносят, конечно, и характеристики микроорганизмов. Для борьбы с биопленками предлагается использовать материалы, способные длительное время самостоятельно противостоять колонизации. Так, установлено, что полиуретановые, тефлоновые и силиконовые материалы в наименьшей степени способствуют адгезии микроорганизмов и поэтому являются более предпочтительными материалами для изготовления сосудистых катетеров, нежели полиэтилен и поливинил [14; 235]. Разновидностью данного подхода является и разработка специальных покрытий или импрегнация материала биоцидом (собирающее понятие, включающее антибиотики, антисептики, дезинфектанты), препятствующим колонизации. Одним из часто используемых в таком аспекте агентов является серебро, поэтому для борьбы с бактериальными инфекциями, осложненными образованием биопленок, предлагалось использовать ионы и наночастицы серебра [42; 250]. Было показано, что формирование биопленок *E. coli* AB1157 и *S. proteamaculans* 94 полностью ингибировалось при концентрации AgNO_3 – 0,3 мкг/мл, *P. aeruginosa* PAO1 – при 0,6 мкг/мл [42; 250]. Попытки повышения антиинфекционной безопасности таким путем предпринимаются уже несколько десятилетий. Одним из наиболее успешных примеров в медицинской практике является покрытие/импрегнация хирургического шовного материала триклозаном, результатом чего является доказанное в клинических исследованиях эффективное предупреждение развития инфекций при хирургическом вмешательстве [9; 145; 176; 189].

Следующий подход заключается в непосредственном использовании различных биоцидов для предупреждения образования и/или борьбы с биопленками на имплантируемых устройствах (сосудистые и мочевые катетеры, некоторые виды шунтов, имплантируемые порты для гемодиализа и др.), которые в силу технологий использования неотвратимо подвергнутся колонизации и для которых по ряду объективных причин, лучший метод ликвидации биообрастания – извлечение устройства – не всегда приемлем. Антисептики являются лучшими агентами для использования в таких целях, так как обладают в данном аспекте несомненными преимуществами перед антибиотиками (неспецифический механизм действия и связанное с этим отсутствие риска развития

истинной устойчивости возбудителей, а также прогнозируемая фармакокинетика при местном применении) [9; 14; 94; 235]. Некоторые антимикробные препараты (АМП) для местного применения также характеризуются хорошей мерой проникновения в биопленки и высокой клинической эффективностью в терапии хронических и рецидивирующих инфекций. Например, клиническое использование мупироцина или комбинации тиамфеникола (антибиотик группы амфениколов с широким спектром активности) с N-ацетилцистеином вело к гибели клеток бактерий живущих в биопленке и к её удалению у пациентов с хроническим риносинуситом [9; 206; 275]. Среди препаратов для системного использования наилучшей мерой проникновения в биопленки, в целом, демонстрируют фторхинолоны и фосфомицин [1; 9; 213; 256]. Было показано, что одним из перспективных методов для воздействия на биопленки *P. aeruginosa* (клинические исследования проводились на больных с муковисцидозом и диффузным панбронхиолитом) является совместное применение антимикробного препарата фторхинолона в комбинации с кларитромицином (антибиотик из группы макролидов) [38; 44]. Детальное изучение механизма действия кларитромицина на образование биопленки позволило выявить, что в присутствии этого антибиотика структура биопленки изменяется, уменьшается количество альгината, гексозы, тем самым повышается проникновение антимикробного препарата фторхинолона, который использовали для подавления *P. aeruginosa*. Эффективность фторхинолона оказалась значительно выше в присутствии кларитромицина, что привело к уничтожению клеток *P. aeruginosa* в биопленках [44]. Также способом улучшения проникновения в биопленку антимикробных препаратов может являться и совершенствование форм их доставки [274]. Известно, что липосомальный комплекс амфотерицина В обладает выраженной активностью по отношению к биопленкам, продуцируемым *Candida* spp., что позволяет использовать его при инвазивных системных микозах [44; 219].

На модели *in vitro* было показано совместное действие лактоферрина и антибиотика ципрофлоксацина на рост и процесс формирования биоплёнок *P. aeruginosa*. Комбинированный эффект их воздействия заключается в том, что при использовании низких концентраций антибиотика интенсивность процесса формирования биоплёнок клетками культуры *P. aeruginosa* значительно уменьшается и может оказаться эффективной альтернативой для лечения иммунодефицитных больных с целью предотвращения возникновения хронических очагов инфекции [1]. Также изучалось влияние на процесс образования биоплёнок комбинации ципрофлоксацина с окситоцином на моделях *in vitro* и *in vivo* с использованием условно-патогенных микроорганизмов, изолированных из гнойных ран (*S. aureus*, *S. epidermidis*; *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *B. fragilis*) [33]. На модели

in vitro при применении $\frac{1}{2}$ минимальной подавляющей концентрации окситоцина и ципрофлоксацина было показано, что образование биоплёнок угнеталось на 35-57 % по сравнению с контролем. Экспериментальные исследования *in vivo* подтвердили более высокую эффективность местного применения комбинации этих антибиотиков по сравнению с использованием в лечении гнойных ран ципрофлоксацина или окситоцина в отдельности [2; 33; 44]. Комбинация ципрофлоксацина или линезолида с рифампицином оказывала подавляющий эффект на биопленку *E. faecalis in vitro*; она перспективна для лечения людей с ранней инфекцией протеза, вызванной этим микроорганизмом [8; 152].

Весьма интересные результаты показаны при действии антибиотика батумина, выделенного из штамма почвенной бактерии *Pseudomonas batumici*. Батумин, в $\frac{1}{2}$ минимальной подавляющей концентрации, ингибировал биоплёнки у стафилококков с высоким уровнем образования биоплёнок и в тоже время стимулировал образования биоплёнок у штаммов с низкими показателями образования биоплёнок. Аналогичные результаты были получены при его действии на образование биоплёнок *Candida albicans* [5].

Не менее важным является более детальное изучение механизмов взаимодействия макроорганизма с колонизирующими его биопленками с целью разработки альтернативных подходов в терапии инфекций, вызванных образованием биопленок. Одно из возможных решений этой проблемы многие исследователи видят в поиске антипатогенных препаратов, которые, в отличие от антимикробных, вызывающих гибель или подавление роста бактерий, обладали бы способностью понижать или блокировать вирулентность бактерий, в результате чего с инфекцией справилась бы иммунная система организма. Мишенями таких антипатогенных лекарственных препаратов могут стать системы регуляции бактерий, контролирующие экспрессию факторов вирулентности, например, Quorum Sensing системы [43; 162; 253; 257].

Другим возможным подходом является поиск ферментов, способных разрушать основные компоненты биопленочного матрикса, для того, чтобы обеспечить доступ антибиотиков или факторов иммунной защиты к клеткам, существующим в организме в составе биопленок [34]. Известно, что полимерный матрикс окружает биопленку, защищая ее от воздействия неблагоприятных факторов, содействуя ее межклеточным контактам, связям с окружающей средой, и, в конечном счете, определяет способность бактерий к выживанию. Поэтому все, что действует на компоненты матрикса, будет предотвращать развитие биопленочного процесса или разрушать уже сформированную биопленку [31; 122]. Разрушение матрикса всегда приводит к отторжению биопленки, поэтому информация о его биохимической структуре является крайне важной для управления биопленочными процессами, позволяя оптимизировать выбор антибиопленочных препаратов, действие

которых может быть направлено на деградацию внеклеточных полисахаридов (поли- β -(1,6)-N-ацетилглюкозамина и др.), ДНК, белков и других компонентов матрикса [46; 158; 169; 185]. Как указывалось выше, основными компонентами матрикса являются внеклеточные полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты. Было показано, что ингибиторы N-ацетил-D-глюкозамин-1-фосфат ацетилтрансферазы (GlmU, вовлечена в биосинтез важного предшественника – пептидогликана у грамположительных и липополисахарида у грамотрицательных патогенов соответственно), N-этилмалеимид (анг. N-ethylmaleimide) и его аналоги показывали антибиопленочную активность против клинических изолятов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis* и *E. faecalis* [158; 181; 316].

Одним из хорошо изученных матрикс-деградирующих ферментов является дисперсин В – гликозидгидролаза, продуцируемая патогеном *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [169]. Дисперсин В разрушает один из главных матриксных полисахаридов, поли-N-ацетилглюкозамин (PNAG), препятствуя образованию биопленки и отторгая ее у видов бактерий, образующих поли-N-ацетилглюкозамин. С другой стороны было показано, что внеклеточный матрикс биопленки *P. aeruginosa* (не содержит поли-N-ацетилглюкозамин в своем составе) не только выдерживает действие дисперсина В, но он даже усиливает биопленочный процесс [158]. Мукоидный (альгинатный) матрикс *P. aeruginosa* разрушается собственным ферментом, альгинатлиазой, обеспечивая высвобождение из биопленки бактерий и в результате делая их более чувствительными к антибиотикам [35; 175; 316]. Было показано, что альгинатлиаза способствует более эффективной диффузии гентамицина и тобрамицина через альгинатный полисахарид биопленки *P. aeruginosa* [172; 316]. Матриксные компоненты *P. aeruginosa* и *B. cenocepacia* разрушаются лиазами, выделенными из природных штаммов рода *Bacillus* [35]. Воздействие бактериальных гидролаз на матриксный Psl- полисахарид ведет к образованию пустых пространств в центре биопленочных микроколоний и высвобождению планктонных клеток *P. aeruginosa* [19; 141; 204].

Как уже отмечалось, мультимерные поверхностные клеточные структуры, такие как жгутики и фимбрии (пили), также являются компонентами матрикса биопленки и принимают участие в процессе образования биопленки; поэтому они также могут быть мишенью для действия антибиопленочных препаратов. Известно, что некоторые типы пилей собираются за счет белок-белок-связывающих конструкций типа шаперон-ашер (анг. chaperone-usher), когда один из белков (шаперон) периплазматического пространства формирует комплекс с будущим структурным белком пилей, и этот комплекс воспринимается ашерным белком клеточной мембраны [12; 91; 270]. При этом шапероны имеют консервативные участки, которые реагируют с разными ашерными белками, создавая

возможность подавления ашер-связывающих сайтов низкомолекулярными (малыми) молекулами. Это было показано на примере уропатогенных штаммов *E. coli*, которые содержат различные пили и пилеподобные отростки – кэрли (анг. *curlies*), обеспечивающие прикрепление бактерий к эпителиальной поверхности мочевого пузыря и почечных лоханок. Малые молекулы, синтезированные на основе бициклических 2-пиридонов (они получили название пиллицидов и кэрлицидов, англ. *bicyclic 2-pyridones*), предотвращали образование пилей и пилеподобные выступов – кэрлей, задерживая биопленочный процесс [91]. Было показано, что пиллициды не влияют на рост бактерий, поскольку продукция пилей не связана с бактериальным размножением. Это означает, что пиллициды/кэрлициды можно рассматривать как антивирулентные препараты, нацеленные на ингибирование образования биопленок [19; 91; 137; 270].

Присутствие белков предполагает чувствительность матрикса биопленки к протеолитическим ферментам [211]. Было показано, что папаин, трипсин и ферментный комплекс вобэнзима способны не только частично угнетать образование микробных биопленок, но и усиливать действие на них различных неродственных антибиотиков, что свидетельствует о неспецифичном общем увеличении поступления препаратов в биопленки [39]. В данном аспекте могут также быть использованы давно известные и хорошо себя зарекомендовавшие препараты, например, N-ацетилцистеин, являясь предшественником L-цистеина и глутатиона, обладает выраженными муколитическими свойствами и широко используется при заболеваниях дыхательных путей [206; 243; 330]. Было установлено, что N-ацетилцистеин обладает способностью уменьшать адгезию некоторых возбудителей к эпителиальным клеткам дыхательных путей, а также оказывает прямое разрушающее воздействие на биопленочный матрикс, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного неантибактериального компонента терапии инфекций, связанных с образованием биопленок [9; 206; 243]. Действие препарата на биопленки зависит от его дозировки. В субингибиторных концентрациях (0,5–5,0 мг/мл) N-ацетилцистеин вызывает отторжение биопленки *P. aeruginosa*, снижая продукцию матриксных полисахаридов. В дозировке 10 мг/мл N-ацетилцистеин приводил к полному подавлению биопленочного процесса, но в этой концентрации он действовал и как бактерицидный агент, убивая большинство бактерий [330]. Наряду с этим было показано, что N-ацетилцистеин ингибирует продукцию слизи *S. epidermidis* и *S. aureus*, а также он способен отрицательно влиять на жизнеспособность бактерий в биопленке, критически снижая (от 63 % в начальной фазе созревания до 52 % в зрелой структуре) количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в биопленке [9; 206; 243; 269].

В последние годы была также выявлена новая мишень – внеклеточная ДНК матрикса биопленок - для воздействия на биопленки бактерии с целью повышения эффективности антибиотиковой терапии инфекционных заболеваний. Использование ДНК матрикса, как дополнительной мишени при терапии, позволяет повысить эффективность действия различных антибиотиков на микроорганизмы, находящиеся в биопленках [37]. Например, было продемонстрировано, что 24-часовая биопленка *P. aeruginosa* (как и ряда других бактерий) чувствительна к дезоксирибонуклеазе I (ДНК-азе I), а 5-суточная биопленка четырех клинических штаммов *P. aeruginosa* эффективно разрушается стрептококковой ДНК-азой [19; 128; 141; 293]. Кроме того, было показано, что чувствительность бактерий к антибиотикам увеличивалась в присутствии ДНК-азы I. Азитромицин, рифампицин, левофлоксацин, ампициллин и цефотаксим были более эффективны в присутствии ДНК-азы I [293].

Перспективной альтернативой антибиотиковой терапии биопленок патогенных бактерий является фаготерапия. Для фаготерапии используются литические фаги, которые не входят в профаговое состояние и таким образом редко содержат или передают гены вирулентности, хотя они и приводят к быстрому разрушению бактериальной клетки. Интересны новые факты, касающиеся механизмов антибактериального эффекта бактериофагов. Было показано, что бактериофаги, помимо непосредственного литического действия, индуцируют продукцию деполимераз в микробных биопленках. Например, было продемонстрировано, что после аэрозольного применения больными муковисцидозом антисинегнойного бактериофага наблюдается положительный клинический результат, который, по-видимому, связан с эффектом активной деградации экзополисахаридного компонента биопленочного матрикса при проникновении бактериофагов во внутренние слои биопленки *P. aeruginosa* [8; 63; 90; 196]. Бактериофаги использовались для лечения и предотвращения образования биопленок *Proteus mirabilis* и *E. coli* на урологических устройствах и на катетерах и для подавления формирования биопленок *S. epidermidis* на катетерах. При этом наблюдалось предотвращение и/или подавление формирования биопленок на поверхности катетеров после их покрытия гидрогелем с бактериофагами [63; 153; 181]. В результате применения фагов происходило отчетливое (в 90 % случаев) подавление образования биопленок госпитальными штаммами *P. mirabilis* и *E. coli*, по сравнению с необработанным контролем [8; 31; 90].

Известно, что многие виды грамотрицательных бактерий, патогенных для человека, располагают секреторной системой 3-го типа; они вводят свои токсины непосредственно в цитозоль эукариотических клеток, используя специальный аппарат (в его сборке участвуют свыше 20 белков), который называется Т3SS-инъектосомой [19; 120]. Например, для *P.*

aeruginosa известно четыре токсина (ExoS, ExoT, ExoU, ExoY), которые вводятся при помощи T3SS [120; 217; 226]. Участвуя в патогенезе псевдомонадных инфекций, они оказывают серьезное цитотоксическое действие. Система секреции 3-го типа имеет значение, помимо острых инфекций, и при хронических (биоопленочных) процессах, так как было показано, что T3SS-гены *P. aeruginosa* работают и в составе биоопленочных бактерий [217; 226]. Опубликовано несколько статей, где приводятся данные об ингибиторах T3SS, которые, прежде всего, относятся к классу салицилиден ацилгидразидов (анг. salicylidene acylhydrazides), непосредственно действующих на T3SS-инъектосому [12; 66; 217]. *In vitro* они подавляли инфекции, связанные с *Y. pseudotuberculosis*, энтеротоксигенными и энтеропатогенными *E. coli*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Chlamydia pneumoniae*. Возможно, в будущем на основе химического класса T3SS-ингибиторов, салицилиден ацилгидразидов, появятся новые способы борьбы с инфекционными заболеваниями, в том числе с биоопленочными процессами. Следует отметить, что *P. aeruginosa* располагает (дополнительно к T3SS) секреторными системами 1-го, 2-го и 6-го типов [120; 311]. Их блокада тоже может оказаться полезной при разработке антивирулентных (антибиоопленочных) препаратов, нацеленных против *P. aeruginosa* [19; 66].

Суммируя выше сказанное, можно сделать вывод, что для одних ситуаций наилучшим методом профилактики является покрытие потенциально контаминируемых поверхностей биоцидами, в других случаях только механическая очистка, в том числе и биологических поверхностей, может являться гарантом успеха терапии инфекции [9; 35; 169]. В любом случае, уже сейчас понятно, что традиционная антибактериальная терапия не всегда в состоянии решить ряд серьезных проблем, связанных с инфекциями, вызванными образованием микробных биоопленок, особенно на фоне глобального роста резистентности возбудителей. Именно поэтому активный поиск лекарственных средств, имеющих потенциал воздействия на биоопленки, продолжается в лабораториях и компаниях в различных странах по всему миру [9; 82; 139; 172; 181].

Преимущества использования биоопленок в биотехнологии

Образование биоопленок бактериями, кроме отрицательных эффектов, имеет ряд положительных моментов для человека. Долговечность и структурированность биоопленок, наряду с разнообразием их структурных и метаболических характеристик, делают использование биоопленочных сообществ важным для биологической очистки от загрязняющих веществ (при очистке промышленных сточных вод дает возможность удалять из них разнообразные органические загрязняющие вещества и тяжелые металлы) [23; 29; 115; 322]. Использование биоопленок при производстве токсичных веществ и/или при

биотрансформации токсичных загрязняющих веществ позволяет защитить штаммы-продуценты. Например, было показано, что использование активированных углеродных частиц, покрытых биопленкой, способствовало биологической очистке окружающей среды от загрязняющих веществ, таких как полихлордифенилы (ПХД). Бактериальные биопленки, связанные с гранулированным активированным углем, существенно повышали деградацию ПХД. Также было показано, что двувидовые биопленки, состоящие из *Burkholderia sp.* NK8 и *P. aeruginosa* PA01, обладают улучшенной способностью более полно деградировать хлорированные бензоаты, а биопленки, состоящие из *Comamonas sp.* штамма KD7, на корнях белого клевера (*Trifolium repens*), обеспечивали значительное снижение имеющихся в пробах почвы диоксинов [115]. В тоже время возможность искусственного конструирования биопленок в качестве “биореакторов” также вызывает большой интерес. В таких системах можно получить новые физиологически активные продукты [115; 326; 336].

Остановимся подробнее на использовании биопленок в процессах очистки сточных вод. Основными системами очистки сточных вод в настоящее время являются биофильтры и биореакторы, к которым относятся аэробные аэротенки, анаэробные метантенки и др. В биореакторах используется так называемый «активный ил». Активный ил представляет собой сообщество различных микроорганизмов, включающее, прежде всего, бактерии, а также другие одноклеточные организмы – грибы, простейшие и микроскопические животные (нематоды, колероватки, водные клещи), из которых формируются специфические образования – флоккулы. Флоккулы можно рассматривать как суспендированные малоструктурированные биопленки недифференцированного типа [22; 23; 115].

В биофильтрах очищаемая вода фильтруется через твердый носитель, покрытый плотной микробной биопленкой, содержащей микроорганизмы, удаляющие поллютанты – минерализующие органические вещества-загрязнители, а также окисляющие аммоний, поглощающие фосфаты, тяжёлые металлы, восстанавливающие нитраты [23]. Так, например, в практике водоочистки одним из эффективных устройств являются погружные дисковые биофильтры (ПДБ) [29; 52]. Фильтры представляют собой насаженные на ось и частично погруженные в раствор субстрата диски, например, из полихлорвинила. Диски вращаются, реализуя, таким образом, отдельную подачу кислорода из воздуха и субстрата из воды к поверхности биопленки на диске, что обеспечивает организацию аэробного процесса переработки растворенных в воде загрязнений. Микроорганизмы биопленки на диске используют загрязнения в качестве субстрата, необходимого им для размножения. С помощью ПДБ могут быть очищены сточные бытовые воды, в частности, воды, содержащие двухвалентное железо, аммиак [29; 229; 322].

Было показано, что новое поколение кормовых пробиотических препаратов в виде биопленки на фитоносителе отличается высокой биологической активностью и перспективно для применения в рационах животных (например, препарат Ферм-КМ). Кроме того пробиотические бактерии, находясь в биопленке на поверхности фитосубстрата, способны сохранять жизнеспособность при высушивании, при гранулировании комбикормов и выживать при комбинировании с некоторыми кормовыми антибиотиками. Затраты, связанные с приобретением препаратов и их использованием, окупаются дополнительным приростом живой массы, лучшей сохранностью поголовья и конверсией корма [40].

Другая возможная область применения бактериальных биопленок основана на их способности оказывать ингибирующий эффект на асцидии и водоросли, вызывающие обрастание корпусов кораблей [326]. Полагают, что биопленки, образуемые бактериями с выраженными антагонистическими свойствами, могут явиться альтернативой токсичным химическим защитным покрытиям. Например, показано, что биопленки, которые включают *B. brevis*, образующую грамицидин, защищают металлы от коррозии в присутствии сульфатвосстанавливающих бактерий [336].

Биопленки могут исполнять роль агентов биоконтроля в ризосфере растений, особенно в борьбе с грибными и бактериальными инфекциями [64; 75; 220; 237]. Например, были получены данные о том, что образование биопленок бактериями *B. subtilis* подавляет развитие фитопатогенов на корневой системе растений [64]. Показано, что способность образовывать биопленки важна для закрепления бактерий-антагонистов в ризосфере [34].

Quorum Sensing системы регуляция экспрессии генов бактерий

Бактерии способны чувствовать повышение плотности популяции и отвечать на него быстро и скоординированно индукцией определенных наборов генов. Этот тип регуляции получил название Quorum Sensing (QS); он основан на взаимодействии низкомолекулярных сигнальных молекул, аутоиндукторов (АИ), с регуляторными рецепторными белками. Одни АИ связываются с мембранными рецепторами, расположенными на поверхности бактериальной клетки, в то время как другие способны проникать через мембрану и связываться с внутриклеточными рецепторами [41; 69; 86]. QS регуляция обнаружена более чем у 50 видов бактерий [69; 191; 257; 305]. В качестве сигнальных молекул в QS системах используются соединения различной химической природы; количество обнаруженных АИ увеличивается с каждым годом. QS система регуляции рассматривается как средство коммуникации между бактериями одного или разных видов, родов или даже семейств. Интересно, что один вид бактерий может использовать и узнавать более чем один тип сигнальных молекул и содержать QS системы различных типов; АИ, продуцируемые одними

бактериями, могут быть использованы для активации транскрипции у других бактерий. Сигнальные молекулы QS систем накапливаются в бактериальной популяции и аутокаталитически воздействуют на бактерии, не принимая прямого участия в бактериальном росте [19; 107; 231; 253]. Такая межклеточная регуляция основывается на следующем принципе: когда единичные бактерии производят низкомолекулярные сигнальные молекулы, их внеклеточная концентрация ниже определенной пороговой; при увеличении плотности популяции концентрация АИ увеличивается, доходит до критической, это позволяет рецепторным белкам «опознать» сигнальные молекулы, что приведет в результате к активации (индукции) экспрессии генов-мишеней [41; 162; 191; 257].

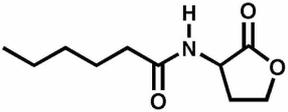
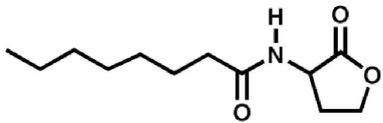
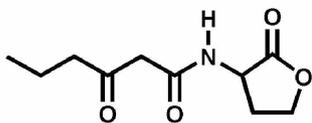
QS системы являются глобальными регуляторами экспрессии бактериальных генов, они играют ключевую роль в регуляции многих метаболических процессов клетки, в том числе отвечающих за синтез антибиотиков, экзоферментов, синтез экзополисахаридов, споруляцию, компетентность, продукцию вирулентных факторов и элементов матрикса биопленок патогенных и фитопатогенных бактерий и др. [248]. QS системы играют важную роль в регуляции формирования биопленок различными бактериями [71; 257; 309]. Образование биопленки предусматривает фазу быстрого размножения, которая сопровождается колонизацией субстрата и формированием матрикса биопленки. Именно на этой стадии следует ожидать наиболее выраженной активности сигнальных молекул QS систем и их влияния на фенотип бактерий. Как уже отмечалось биопленка *P. aeruginosa* на разных этапах своего развития зависит от различных факторов. Было показано, что ингибиторы QS систем не влияют на образование ранней биопленки *P. aeruginosa* (когда идет процесс обратимого, т.е. временного прикрепления бактерий), но способны подавлять позднюю биопленку, вызывая ее отторжение [20; 71; 149; 325]. В последние годы также стало понятно, что благодаря сигнальным молекулам QS систем биопленки патогенных и условно-патогенных бактерий преодолевают механизмы защиты организма-хозяина и проявляют отрицательное воздействие на клетки иммунной системы, приводящее к серьезному повреждению тканей организма-хозяина. Отрицательное воздействие на клетки иммунной системы организма включает модуляцию провоспалительных цитокинов, фагоцитоз и индукцию апоптоза. В целом, бактериальные аутоиндукторы оказывают иммуносупрессирующее действие на клетки иммунной системы организма [8; 189].

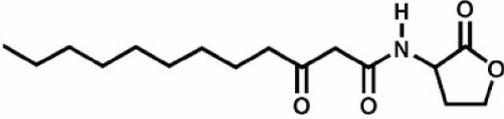
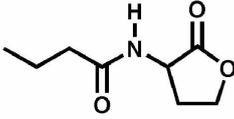
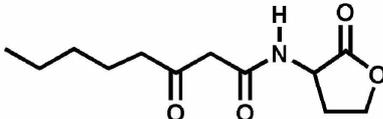
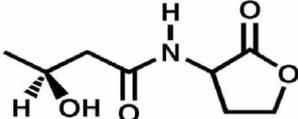
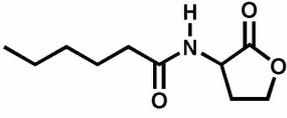
Функционирование QS систем можно сравнить с гормональной регуляцией функциональной активности различных органов и тканей в многоклеточном организме. Грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы используют различные сигнальные системы и разные химические передатчики сигналов. Первые синтезируют 7–8-

членные пептиды (*Enterococcus* spp.), циклопептиды (*Staphylococcus* spp.); вторые – разнообразные N-ацил-гомосеринлактоны (АГЛ) и др. [8; 41; 48; 191; 257].

У грамотрицательных бактерий наиболее изученными являются QS системы, функционирующие с участием сигнальных молекул N-ацил-гомосеринлактонов (АГЛ), аутоиндукторов 1-го типа (АИ-1). АГЛ содержат лактонное кольцо, образованное из гомосерина, и боковые ацильные цепи [280]. В таблице 1 показаны АГЛ некоторых грамотрицательных бактерий. Описано более 40 видов АГЛ, отличающихся длиной ацильных цепей в молекуле и наличием замещающих группировок у атома С-3 (оксо-, гидроксо-). АГЛ, содержащие короткие ацильные цепи, свободно диффундируют через клеточные мембраны; АГЛ с длинными ацильными цепями для выхода из клетки нуждаются в активном транспорте. АИ-1 проникают внутрь бактериальной клетки и там специфически взаимодействуют с LuxR-белками, которые выполняют функцию внутриклеточных рецепторов. Активированные лигандом LuxR-белки связываются с АГЛ-регулируемым промотором и запускают процесс транскрипции QS-контролируемых генов [191; 305; 313]. Специфичность взаимодействия АГЛ с рецепторами определяется количеством атомов углерода в боковых цепях (от С4 до С16) и присутствием дополнительных группировок у атома С-3, которые, таким образом, являются детерминантами, ответственными за связывание АИ-1 с определенным типом LuxR-белков и их активацией [102; 191; 257; 308]. Некоторые АИ-1 могут взаимодействовать с поверхностными рецепторами, как это показано для АГЛ *Vibrio harveyi* и *V. cholerae*, которые взаимодействуют с рецепторным белком LuxN, функционально связанным с LuxR [305; 309].

Таблица 1. Примеры структур АИ-1 (АГЛ), синтезируемых грамотрицательными бактериями.

Название бактерии/ген, ответственный за синтез АИ-1/название АИ-1	Структура АИ-1 (АГЛ)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> / <i>phzI</i> / N-гексаноил-гомосеринлактон (С6-HSL)	
<i>Burkholderia cepacia</i> / <i>cepI</i> / N-октаноил-гомосеринлактон (С8-HSL)	
<i>Vibrio fischeri</i> / <i>luxI</i> / N-3-оксо-гексаноил-гомосеринлактон (3-оксо-С6-HSL)	

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>lasI</i> / N-3-оксо-додеканоил-гомосеринлактон (3-охо-C12-HSL)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>rhII</i> / N-бутаноил-гомосеринлактон (C4-HSL)	
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> / <i>traI</i> / N-3-оксо-октаноил-гомосеринлактон (3-охо-C8-HSL)	
<i>Vibrio harveyi</i> / <i>luxM</i> / N-3-гидрокси-бутаноил-гомосеринлактон (3-hydroxo-C4-HSL)	
<i>Chromobacterium violaceum</i> / <i>cviI</i> / N-гексаноил-гомосеринлактон (C6-HSL)	

Субстратами для ферментов LuxI-типа служат S-аденозилметионин (SAM) и ацил-переносящий белок (ACP), который является промежуточным соединением в пути биосинтеза жирных кислот. LuxI-синтаза соединяет специфический белок ACP с SAM посредством образования амидной связи между боковой ацильной цепочкой ACP и аминогруппой гомоцистеинового мотива SAM. Последующая лактонизация образовавшегося интермедиата с высвобождением метилтиоаденозина приводит к образованию АГЛ (рис. 1). Подобный механизм биосинтеза с использованием SAM и белка ACP продемонстрирован для нескольких LuxI-подобных белков из различных бактерий, это LuxI из *V. fischeri*, TraI из *A. tumefaciens*, RhII из *P. aeruginosa*. Видимо, этот путь биосинтеза консервативен среди LuxI гомологов [41; 131; 162; 299; 305].

Описаны QS системы, включающие АГЛ, с иным типом регуляции экспрессии генов, в которых рецепторные белки LuxR типа действуют как репрессоры транскрипции генов-мишеней, а их связывание с АГЛ снимает репрессию [41; 69; 191; 257; 309].

Отдельное внимание в настоящем обзоре уделено описанию QS систем и их регуляции формирования биопленок у бактерий рода *Pseudomonas aeruginosa* и *Agrobacterium tumefaciens*, основных объектах исследования диссертационной работы.

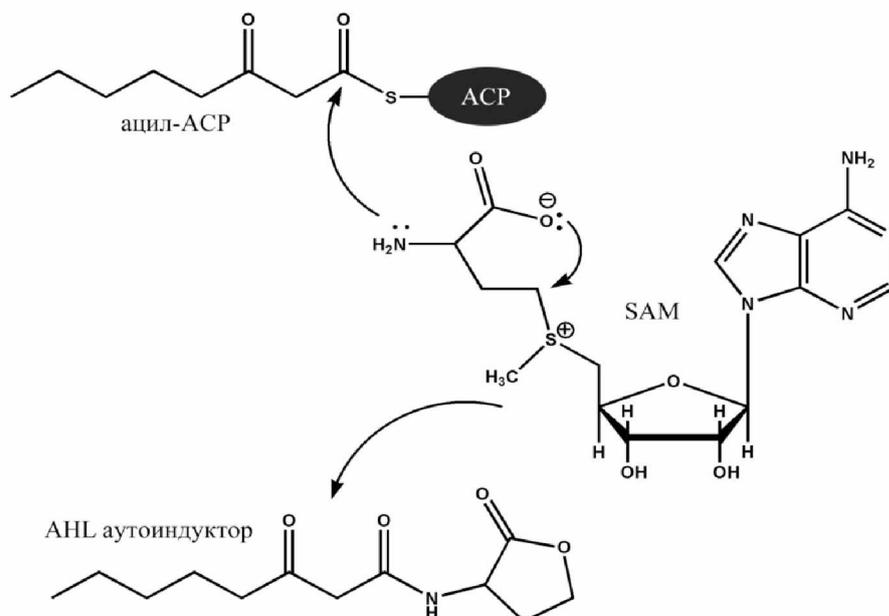


Рис. 1. Схема синтеза N-3-оксо-гексаноил-гомосеринлактона.

ACP – ацил-переносящий белок, SAM – S-аденозилметионин, AHL – АГЛ (аутоиндуктор).

QS системы регулирования и формирование биопленки *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens – почвенная бактерия, близкородственная *Rhizobium*, вызывает образование корончатых галлов у многих видов растений. Галлы представляют собой растительный аналог злокачественной опухоли и образуются в результате переноса онкогенных фрагментов ДНК от бактерии в ядро растительной клетки. Основным фактором вирулентности является большая (около 100 т.п.н.) плаزمида, называемая Ti-плазмидой (от Tumor inducing), которая содержит гены синтеза специфических аминокислот – опинов, используемых *A. tumefaciens* в качестве источника питания, а также онкогены (*iaaM*, *iaaH* и *ipt*) – гены синтеза фитогормонов (ауксин и цитокинин), которые индуцируют деление растительных клеток [129; 223; 290]. Было показано, что в вызванных *A. tumefaciens* опухолях присутствуют ауксин индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и цитокинин трансзеатин [25; 80; 290]. В период инфекции область Ti-плазмиды, T-ДНК (от англ. transfer – переносить, перемещать), переносится из клеток *A. tumefaciens* в клетки растения, где она интегрируется в ядерный геном [130; 263]. Для успешной трансформации растительных клеток необходимы продукты генов *vir*-регулона, которые определяют способность бактериальных клеток вступать в контакт с растительными клетками и обеспечивать передачу T-ДНК из бактериальной клетки в растительную. Было показано, что некоторые растительные фенольные соединения (ацетосирингон, α -гидроксиацетосирингон, предшественники лигнина и суберина - кониферилловый спирт, феруловая кислота и др.), моносахариды (глюкоза, галактоза, глюкуроновая кислота, галактурановая кислота и др.) и низкие значения

pH (от 5,0 до 5,8) запускают работу *vir*-регулона. Присутствие моносахаридов усиливает действие фенольных соединений как основных индукторов генов вирулентности [80; 130].

A. tumefaciens включает QS систему LuxI-LuxR типа: TraI-TraR, которая контролирует конъюгацию Ti плазмид, регуляцию числа копий этих плазмид и включает в качестве основной сигнальной молекулы N-3-оксо-октаноил-гомосеринлактон (3-охо-C8-HSL). За синтез 3-охо-C8-HSL отвечает TraI-синтаза, кодируемая *traI* геном. Функционирование QS системы *A. tumefaciens* аналогично QS системе LuxR-LuxI типа *Vibrio fischeri* [41; 309; 313]. Было обнаружено, что у *A. tumefaciens* протеиназа ClpXP, принадлежащая к протеиназам Clp-семейства, способна деградировать белок-рецептор TraR, на стадии, когда он еще не образует комплекса с АГЛ [332]. Другой регуляторной детерминантой является TraM-белок, который ингибирует активность *tra*-генов, инактивируя TraR-белок и, следовательно, запрещая синтез 3-охо-C8-HSL. Белок TraM обладает сродством к карбокси-терминальному домену TraR-белка. Образование комплекса TraR-TraM сопровождается потерей ДНК-связывающей активности TraR-белка. Считается, что комплекс TraR-TraM предотвращает перенос Ti-плазмиды до тех пор, пока уровень TraR-белка не превысит уровень TraM-белка [289].

Вирулентность *A. tumefaciens*, как и многих других фитопатогенов, непосредственно связана со способностью прикрепляться к поверхности растений и формировать биопленки [103; 104; 112; 129]. В опытах с использованием мутантов *A. tumefaciens*, не способных к адсорбции на растительных тканях, было показано, что данные штаммы были не способны вызывать заболевание [112]; с другой стороны было установлено, что мутантные растения (*Arabidopsis thaliana*), к которым были неспособны прикрепляться штаммы *A. tumefaciens*, были устойчивы к корончато-галловой болезни [333]. Известно, что *A. tumefaciens* производит не менее шести видов полисахаридов, некоторые из которых играют роль в прикреплении и образовании биопленки (целлюлоза, униполярный полисахарид и др.) [186]. Униполярный полисахарид (анг. unipolar polysaccharide), являясь экзополисахаридом (содержит, по крайней мере, два сахара: N-ацетилглюкозамин и N-ацетилгалактозамин) и эффективным клеточным адгезином, играет важную роль в адгезии бактерий и образовании биопленки на абиотических поверхностях, а также может требоваться для эффективного связывания с поверхностью растений. Помимо целлюлозы и униполярного полисахарида *A. tumefaciens* синтезирует и другие экзополисахариды: сукциногликан (анг. succinoglycan) – его биосинтез контролируется *exo* генами; циклические β -1,2-глюканы и курдлан (нейтральный β -1,3-глюкан). Ряд исследований показал, что синтез целлюлозы (важнейший компонент матрикса биопленки) и циклических β -глюканов *A. tumefaciens* и рядом других бактерий играет ключевую роль в способности прочно прикрепляться к поверхности

растений, в образовании биопленки и в поддержке архитектуры матрикса биопленки [75; 112]. В биопленках эти глюканы причастны к устойчивости к антибиотикам; кроме того, можно считать, что они вносят свой вклад в структуру биопленки [288].

Прикрепление и образование биопленок *A. tumefaciens*, регулируется множеством факторов, в том числе уровнями кислорода и концентрациями фосфатов. Для бактерий данного вида было установлено, что одним из внешних индукторов формирования биопленок является снижение концентрации неорганического фосфата в окружающей среде. Процесс усиленного формирования биопленки при дефиците фосфата регулируется системой белков PhoR-PhoB, функционирование которой наиболее детально изучено у бактерий *E. coli* [47; 104; 232]. На прикрепление и образование биопленок *A. tumefaciens* влияет также pH, через регуляторный путь ExoR-ChvG/ChvI. Периплазматический регулятор ExoR является положительным регулятором прикрепления и формирования биопленки *A. tumefaciens*. Мутанты *A. tumefaciens* по *exoR* демонстрируют повышенный синтез сукциногликана, снижение подвижности, а мутации в ExoR-ChvG/ChvI сигнальной системе приводят к резкому снижению прикрепления и образования биопленок. Предполагают, что кислородный потенциал (анг. oxygen tension) тоже влияет на созревание биопленки *A. tumefaciens* посредством действия на два независимых регуляторных пути (SinR/FnrN и BigR) [104]. Наряду с этим было показано, что вторичный мессенджер c-di-GMP, являясь наряду с АГЛ одной из основных сигнальных молекул, влияет на образование внеклеточных компонентов матрикса биопленки (может активировать синтез целлюлозы) и адгезию бактерий *A. tumefaciens*. *A. tumefaciens* обладает 33 белками, которые по прогнозам, участвуют в модуляции внутриклеточных уровней c-di-GMP (16 белков с GGDEF- доменом, 1 с EAL-, 1 с HD-GYP и 13 с GGDEF-EAL доменами). Было показано, что у *A. tumefaciens* переключение перехода от подвижного к прикрепленному состоянию, особенно синтез униполярного полисахарида, очень сильно зависит от c-di-GMP синтаз, дигуанилатциклаз с GGDEF- доменами. Эти ферменты, под контролем факторов транскрипции VisN и VisR, регулируют подвижность и прикрепление к различным поверхностям [80; 145; 303; 313].

QS системы *P. aeruginosa*

QS системы P. aeruginosa, функционирующие с участием сигнальных молекул АГЛ.

P. aeruginosa включает две главные QS системы LuxI-LuxR типа: LasI-LasR и RhlI-RhlR (в дальнейшем – Las- и Rhl-системы), которые отвечают за продукцию сигнальных молекул – N-3-оксо-додеканоил-L-гомосеринлактон (3-охо-C12-HSL) и N-бутаноил-гомосеринлактон (C4-HSL). За синтез 3-охо-C12-HSL и C4-HSL отвечают LasI- и RhlI-синтазы соответственно, кодируемые *lasI/rhlI* генами [41; 102; 191; 257; 314].

Системы QS регуляции *P. aeruginosa* функционируют следующим образом [102; 191; 314]. Ген *lasR* экспрессируется в зависимости от фазы роста, увеличение его экспрессии происходит при переходе клеток к стационарной фазе роста. При достижении высокой клеточной плотности образуется комплекс LasR–3-охо-C12-HSL, который активирует транскрипцию генов–мишеней, определяющих продукцию факторов вирулентности: экзотоксина А (*toxA*), ферментов эластазы (*lasB*), протеазы (*lasA*), щелочной фосфатазы (*aprA*). Кроме того, Las-система вовлечена в формирование биопленок. Комплекс LasR–3-охо-C12-HSL активирует транскрипцию гена синтазы АГЛ *lasI* и гена рецепторного регуляторного белка *rhlR*. Комплекс RhlR–C4-HSL контролирует работу второй QS системы, индуцирует экспрессию гена синтазы АГЛ *rhlI* и двух генов, регулируемых Las-системой, *lasB* и *aprA*; генов, участвующих в синтезе антибиотика пиоцианина; рамнолипидов; гена *lecA*, кодирующего цитотоксический лектин и др. [71; 102; 298; 314]. Также этот транскрипционный регулятор активирует экспрессию другого регулятора – RpoS (сигма-фактор стационарной фазы роста *P. aeruginosa*), который инициирует образование стрессовых белков клетки и участвует в адаптационных реакциях [36; 41; 51; 97; 107].

При низких клеточных плотностях 3-охо-C12-HSL конкурентно связывается с RhlR, что позволяет Las-системе осуществлять контроль над Rhl-системой и осуществлять последовательный запуск двух QS систем. На экспрессию гена *rhlR* большое влияние оказывают факторы окружающей среды, при определенных условиях она может быть не зависимой от комплекса LasR–3-охо-C12-HSL [102; 314]. LasR и RhlR связываются с консервативными палиндромными последовательностями в промоторных областях QS контролируемых генов, называемых *las-rhl*-боксами, сходными с *lux*-боксами *V. fischeri*. *las-rhl*-боксы локализованы на расстоянии от –40 до –50 пар нуклеотидов относительно старта транскрипции генов мишеней; с этими последовательностями могут связываться или LasR, или RhlR, или оба регулятора [51; 128; 241; 314]. LasR образует мультимеры и связывается с *las*-боксами только в присутствии 3-охо-C12-HSL [102; 314], RhlR димеризуется и связывается с ДНК и в присутствии C4-HSL (действует как активатор), и в его отсутствие (действует как репрессор) [71; 102; 164]. Каждый индивидуальный ген имеет собственный порог LasR/RhlR-зависимой активации, который определяется численностью окружающих бактерий (англ. Quorum size). Это означает, что различные гены проявляют повышенную экспрессию при разном количестве бактерий, т.е. на разных стадиях бактериального развития [41; 71; 107; 298; 314]. Это относится и к биопленке. Очевидно, не существует унифицированной плотности бактерий, когда одновременно активируются все QS-зависимые гены [19].

Оказалось, что 3-охо-С12-HSL может непосредственно воздействовать на организм, даже без участия бактерии, продуцирующих его. Молекулы 3-охо-С12-HSL взаимодействуют с компонентами иммунной системы, такими, как интерлейкины, модулируя иммунный ответ организма на инфекцию *P. aeruginosa*; ингибируют пролиферацию лимфоцитов, дифференциацию Т-клеток, продукцию цитокинов, уменьшают продукцию факторов некроза опухолей α и IL-12; инъекции этого соединения индуцировали у мышей воспалительный процесс [2; 43; 167]. Было обнаружено, что и растительные организмы способны отвечать на бактериальные АГЛ. Например, *Medicago truncatula* отвечает на 3-охо-С12-HSL (сигнальная молекула, продуцируемая некоторыми патогенами, включая, как уже указывалось, *P. aeruginosa*) и 3-охо-С16-HSL (сигнальная молекула, продуцируемая симбионтом растения - *Sinorhizobium meliloti*); *A. thaliana* отвечает на С16-HSL [303]. При этом (с помощью метода протеомики) было определено, что АГЛ вызывают глобальные изменения в продукции некоторых растительных белков. Кроме того, они индуцировали секрецию растениями веществ, которые могли взаимодействовать с QS регуляцией бактерий – ингибировать или стимулировать QS системы [177; 220; 303; 305].

QS система P. aeruginosa, функционирующая с участием производных хинолона.

Кроме Las- и Rhl-систем, *P. aeruginosa* имеет еще одну QS систему, также предназначенную для внутривидовой коммуникации бактерий. Она отвечает за синтез целого семейства АИ, являющихся по химической природе производными хинолона (анг. quinolone) [110; 144; 164]. Они, наряду с АГЛ, регулируют экспрессию генов, ответственных за вирулентность, образование биопленок *P. aeruginosa*, и, таким образом, играют ключевую роль в развитии вызываемых *P. aeruginosa* инфекций [48; 184]. Производные хинолона, продуцируемые *P. aeruginosa*, обладают также антибиотиковой активностью в отношении многих видов грамположительных бактерий [110; 144]. В общей сложности, *P. aeruginosa* продуцирует около 55 производных хинолона и родственного ему хинолинона [110; 144]. У *P. aeruginosa* наиболее широко представлены три производных хинолона: 1) 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон (2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone), известный как PQS (анг. Pseudomonas quinolone signal), и находящийся под контролем LasR белка, который регулирует экспрессию оперонов, конвертирующих антранилат в PQS, а PQS, в свою очередь, активирует транскрипцию гена *rhlI* [107; 164; 314]; 2) 2-гептил-4-хинолон (анг. 2-heptyl-4-quinolone, HHQ) и 3) его N-оксид (анг. 2-heptyl-4-quinolone N-oxide) [19; 110; 144]. Синтез PQS зависит от локуса *pqsABCDE*, который является ответственным за продукцию множества 4-хинолонов (4Qs), включая продукцию HHQ, непосредственного предшественника PQS [99]. Синтезированный HHQ диффундирует во внеклеточное пространство, проникает в соседние клетки, где с помощью PqsH (предполагаемая моно-оксигеназа) превращается в PQS. PQS

осуществляет контроль своей собственной продукции, взаимодействуя с регуляторным белком PqsR (MvfR), который регулирует экспрессию оперона *pqsABCDE*. MvfR (PqsR) (Multiple virulence factor Regulator) – это LysR–подобный транскрипционный фактор (ассоциированный с мембраной белок, действующий как транскрипционный активатор до тех пор, пока клетки не достигнут стационарной фазы роста), положительный регулятор продукции эластаз, фосфолипаз, пиоцианина, PQS [71; 107; 314; 317]. MvfR участвует в регуляции большого количества QS-контролируемых генов *P. aeruginosa*, не изменяя при этом экспрессию генов *lasI*, *lasR* и *rhlI*, *rhlR* или продукцию АГЛ [298; 314; 317]. Было показано, что галогенизированные аналоги антракиловой кислоты, реагирующие с MvfR, блокируют продукцию PQS и снижают вирулентность *P. aeruginosa* (опыты на мышах), не влияя на жизнеспособность бактерий [19; 194].

Кроме того, транскрипция с промотора *pqsABCDE* положительно регулируется комплексом LasR–3-охо-C12-HSL и отрицательно регулируется RhlR–C4-HSL [144; 164; 314]. В мутанте *P. aeruginosa* по гену *mvfR* происходит изменение регуляции 143 генов [317].

PQS играет важную роль в регуляции экспрессии генов *P. aeruginosa* при переходе клеток к стационарной фазе роста и во время стационарной фазы [110; 144]. Было показано, что PQS необходим для образования везикул в *P. aeruginosa*. Значительное количество PQS накапливается в конце экспоненциальной и начале стационарной фазы роста. В случае *lasR* мутанта, PQS способен активировать Rhl-систему во время стационарной фазы роста (в диком типе клеток Las-система активирует Rhl-систему раньше, при переходе клеток к стационарной фазе роста) [110; 144; 164]. Ген *pqsE* локуса *pqsABCDE* не принимает участия в биосинтезе PQS. PQS совместно с белком PqsE, осуществляет контроль над продукцией эластазы, рамнолипидов, пиоцианина, цианистого водорода (HCN); влияет на образование биопленки [144; 314; 317].

PQS играет важную роль в патогенности *P. aeruginosa*. PQS продуцируется *P. aeruginosa* в легких больных муковисцидозом [71; 175] и необходим для синтеза факторов вирулентности *P. aeruginosa* в нематодах, растениях и мышах [110; 144; 311 314]. Добавление PQS в физиологических концентрациях стимулировало апоптоз и уменьшало жизнеспособность эукариотических клеток [85]. Деградация этих АИ может рассматриваться как перспективное направление в лечении заболеваний, вызываемых *P. aeruginosa* [19].

Активировать экспрессию QS систем, содержащих белки LuxR-типа, могут также дикетопиперазины – циклические дипептиды, продуцируемые *P. aeruginosa* и некоторыми другими грамотрицательными бактериями [43; 191; 257].

QS-системы, как было показано выше, принимают участие в контроле вирулентности *P. aeruginosa* в сложной, иерархической сети регуляции [191; 314]. QS системы,

функционирующие с участием АГЛ, осуществляют глобальную регуляцию экспрессии генов в *P. aeruginosa*, они контролируют приблизительно 6 % генов (полный геном состоит из 6000 генов), включая наиболее важные гены вирулентности [41; 71; 107; 314].

Наряду с перечисленными выше сигнальными молекулами для коммуникаций с другими видами бактерий *P. aeruginosa* располагает, по меньшей мере, еще несколькими сигнальными медиаторами, один из которых был идентифицирован как короткоцепочечная цис-2-деценвая кислота (анг. *cis*-2-decenoic acid) [20; 105; 297]. Ее добавление предотвращало развитие биопленочного процесса и полностью разрушало биопленку, образованную представителями *P. aeruginosa* или различными другими бактериями (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*), прокариотами и грибом *C. albicans* [105]. Показано, что другой медиатор, цис-11-метил-2-додеценвая кислота (анг. *cis*-11-methyl-2-dodecenoic acid – diffusible signal factor - DSF) *Stenotrophomonas maltophilia*, усиливает биопленочный процесс *P. aeruginosa*. Это связано с тем, что *P. aeruginosa* имеет сенсорный рецептор для DSF, пересылая сигнал на хромосомные гены, от которых зависит экспрессия эффекторных белков [19; 258].

Регуляция QS системы *P. aeruginosa* дополнительными факторами. QS системы *P. aeruginosa* связаны с другими клеточными глобальными регуляторными сетями, в их контроле принимает участие множество дополнительных факторов, действующих, как правило, в зависимости от фазы роста или реагирующих на изменение условий окружающей среды в дополнение к изменению плотности популяции, на которую отвечает QS [41; 305].

К ним относят: белок QscR, который регулирует работу QS системы в зависимости от фазы роста, предотвращая раннюю экспрессию QS-контролируемых генов, а также репрессирует синтез факторов вирулентности - пиоцианина и HCN [71; 196; 199]; RpoS (σ^S субъединица РНК-полимеразы, является глобальным регуляторным фактором экспрессии генов при переходе клеток к стационарной фазе роста и принимает участие в контроле формирования биопленки) и RpoN (σ^N субъединица РНК-полимеразы регулирует некоторые метаболические функции и участвует в регуляции вирулентности) [11; 36; 41; 51; 71; 298]; два транскрипционных регулятора RsaL и MvaT, принимающих участие в репрессии QS системы при низкой клеточной плотности [196; 252]; регуляторные белки RelA, DksA и RsmA также осуществляющие регуляцию QS системы в зависимости от фазы роста [116; 136; 148; 165; 218]; двухкомпонентные регуляторные системы *P. aeruginosa* PprA/PprB и GacS/GacA [248; 311]; глобальный регулятор экспрессии генов Vfr [102; 127; 264]; VqsM (Virulence and quorum sensing Modulator) являющийся положительным регулятором QS системы *P. aeruginosa* и VqsR (Virulence and quorum sensing Regulator) [199]; ClpA – АТФ-азная субъединица шапероноподобной протеиназы ClpAP; AlgR2 и др. [56; 191; 257].

Ниже будут рассмотрены более подробно некоторые из перечисленных факторов, вовлеченные также в регуляцию процессов формирования биопленки.

GacS/GacA (Global antibiotics and cyanide control) – двухкомпонентная система передачи сигнала, включающая два белка, сенсор-киназу GacS и цитоплазматический регулятор GacA. GacS/GacA система, необходима для продукции экзоферментов и вторичных метаболитов, а также важна для образования биопленки *P. aeruginosa*. При утрате функции GacA прикрепление клеток к поверхности происходит, но биопленки не развиваются в зрелые структуры [136; 311]. У *P. aeruginosa* GacS/GacA система положительно регулирует QS систему и экспрессию внеклеточных продуктов посредством двух малых регуляторных РНК – RsmY (124 н.) и RsmZ (117 н.). GacA требуется для транскрипции генов *rsmY* и *rsmZ*. В *rsmY rsmZ* двойном мутанте и в *gacA* мутанте наблюдали сходные нарушения в синтезе C4-HSL, HCN, пиоцианина, эластазы, хитиназы, увеличение способности клеток к миграции по поверхности среды (сворминг) и более раннее образование биопленки [135; 276; 285]. Малые молекулы РНК, действуют, прежде всего, как антисмысловые факторы, блокируя мРНК и тем самым препятствуя трансляции с образованием белков, часть которых является значимыми факторами вирулентности бактерий. Синтез малых молекул РНК является ответом на стресс-факторы, которые улавливаются рецепторами клеток и переносятся на их генетический аппарат. Изучение малых молекул РНК может дать новый толчок для поиска препаратов против вирулентности бактерий, которые будут влиять на различные факторы патогенности бактерий, в том числе и на процесс формирования бактериальных биопленок [19; 44; 276; 285].

AlgR2 (AlgQ) – глобальный транскрипционный регуляторный белок *P. aeruginosa*, участвующий в регуляции продукции альгината, неорганических полифосфатов, различных факторов вирулентности, синтезе сидерофоров, рамнолипидов, внеклеточных протеаз. AlgR2 белок является также негативным регулятором *lasR* и *rhlR* генов, регуляция осуществляется за счет его специфического связывания с промоторами этих генов [56; 191].

Неорганические полифосфаты являются линейными полимерами, содержащими сотни ортофосфорных остатков, связанных АТФ-подобными высокоэнергетическими фосфоангидридными связями; они найдены во всех бактериях, грибах, растениях и животных. В бактериях за синтез полифосфатов отвечают полифосфат киназы (PPK), которые полимеризуют последний фосфат АТФ в полифосфатную цепь. Мутанты *P. aeruginosa* по гену *ppk* неспособны формировать нормальную биопленку, синтезируют на 50 % меньше АГЛ, меньшее количество эластазы и рамнолипидов [20; 164; 232; 298]. Также было показано, что неорганический фосфат (Pi) регулирует образование биопленки *P.*

fluorescens, контролируя секрецию и / или локализацию адгезина LapA на поверхности клетки [159; 221].

Вместе с QS системой рассмотренные регуляторы представляют сложную, многофакторную каскадную регуляторную сеть. Понимание молекулярных механизмов регуляции QS системы *P. aeruginosa* позволит разработать новые методы борьбы с образованием биопленок этой бактерией и с ее патогенностью [12; 19; 43; 257].

Ингибиторы QS систем регуляции

Известно множество работ, связанных с поиском QS-ингибиторов. Предполагают, что подавление функционирования QS систем может обеспечить новые способы лечения инфекций, приводя к фактическому блокированию или снижению вирулентности бактерий, фактически превращая патогенные бактерии в непатогенные без использования обычно применяемых антибиотиков и/или других лекарственных средств, в результате чего с инфекцией справилась бы иммунная система организма [12; 137; 173; 177; 270]. Препараты с анти-QS потенциалом должны обладать, по меньшей мере, одним из четырех ниже перечисленных свойств. Они могут: 1) ингибировать синтез молекул-предшественников аутоиндукторов или самих АИ; 2) подавлять связывание регуляторных белков QS систем с аутоиндукторами; 3) блокировать или разрушать аутоиндукторы QS систем; 4) ингибировать синтез факторов вирулентности, которые экспрессируются под контролем систем QS-регуляции [19; 43; 73; 108; 253].

Ниже более подробно описаны некоторые из способов, перечисленных выше, с помощью которых может быть достигнуто подавление функционирования QS систем.

1) Ингибирование синтеза молекул-предшественников аутоиндукторов или синтеза самих АИ:

Макролидные антибиотики в субингибиторных концентрациях блокируют QS системы *P. aeruginosa*, действуя как ингибиторы LasI- и RhlI-синтаз, а также продукцию некоторых факторов вирулентности [38; 43; 227; 272]. При этом добавление в культуру экзогенно АГЛ приводило к восстановлению продукции этих факторов вирулентности, показывая, что именно синтез АГЛ являлся первичной мишенью действия антибиотика [227]. Не являясь классическими антипсевдомонадными агентами, макролиды оказывают лечебный эффект при хронических муковисцидозных инфекциях легких, связанных с *P. aeruginosa* [19; 151; 172; 175]. В настоящее время механизм действия антибиотиков – макролидов на синтез АГЛ не ясен [168; 227; 272; 279].

Известно, что S-аденозилметионин (SAM) является субстратом для синтеза АГЛ и аутоиндукторов 2-го типа QS систем регуляции (АИ-2, фуранозил-борат-диэфир и его

гомологи) [41; 162; 299; 305]. Показано, что различные аналоги SAM, например, S-аденозилгомоцистеин, S-аденозилцистеин действовали, как сильные ингибиторы синтеза АГЛ у *P. aeruginosa* [137; 308; 320]. Следует отметить при этом, что взаимодействие АГЛ-синтазы с SAM, по-видимому, происходит очень специфично, несмотря на то, что SAM является обычным предшественником во многих прокариотических и эукариотических биохимических путях. Это позволяет надеяться, что аналоги SAM могут быть использованы как специфические ингибиторы синтеза аутоиндукторов бактериальных QS систем, не влияющие на ферменты эукариот [43; 162; 257; 320].

2) Ингибирование связывания аутоиндукторов с соответствующими регуляторными белками:

Подавление функционирования QS систем регуляции может быть достигнуто с помощью молекул антагонистов аутоиндукторов, которые мешают связыванию АИ с молекулами рецепторных белков. В последние годы ведется активный поиск низкомолекулярных ингибиторов регуляторных белков QS систем бактерий [12; 19; 43; 308; 320].

Получены данные об ингибировании QS систем аналогами АГЛ, несущими модификации в различных частях молекул АГЛ – в ацильных цепях и гомосеринлактонном кольце. Было показано, что длина ацильной цепи имеет существенное значение для активности АГЛ. Аналоги АГЛ с более длинными ацильными цепями, чем у нативных АГЛ, могли быть ингибиторами активности QS систем регуляции [108; 214; 257]. Например, аналог АГЛ, в котором боковая цепь содержит бромэтилбензиловую группу, в микромолярных концентрациях подавлял связывание АГЛ с рецепторным белком LasR *P. aeruginosa* [131; 162; 308]. Замена в молекулах АГЛ 3-оксо-групп на 3-гидроксильные или метильные группы, введение ненасыщенных связей в ацильные цепи приводит к значительному снижению активности АГЛ [108; 131; 308; 320]. В тоже время, аналоги АГЛ, в которых лактоновая группа замещена циклическими структурами (циклогексанон, фенол), связываются с регуляторными белками LasR и RhlR *P. aeruginosa*, подавляя экспрессию генов *lasI* и *rhlI* соответственно, эти соединения также устойчивы к лактоназам [108; 131; 320]. Синтезирован целый ряд таких «малых» молекул. Они блокируют активность QS-регулона, что позволяет думать об их нацеленности на регуляторные белки LasR и RhlR QS систем [253]. Существуют также ингибиторы, которые прерывают QS-циклы. Это было показано для PQS QS системы, которая блокируется галогенизированными аналогами антрахилоновой кислоты [19; 194].

Кроме синтетических QS-ингибиторов, исследуются естественные факторы с анти-QS-активностью. Взаимоотношения в бактериальных системах, а также реакции между про-

и эукариотами встречаются повсеместно. Про- и эукариоты располагают механизмами, которые способны атаковать QS системы организмов-конкурентов, что является частью их борьбы за собственное выживание. Замечено, что многие из морских обитателей (водоросли, губки, моллюски) не поддерживают развития бактериальных биопленок. Предполагают, что в процессе эволюции у них выработалась способность прямого или косвенного (через продукты симбиотической микрофлоры) сопротивления патогенным бактериям [19]. Многие микробные симбионты морских организмов синтезируют вторичные метаболиты с антибиопленочной активностью [230]. Было обнаружено, что производные фуранонов (продуцируются различными водорослями, грибами, актиномицетами и др. организмами), например, галогенизированные фураноны морских водорослей *Delisea pulchra*, являясь аналогами АГЛ-аутоиндукторов, воздействуя на QS-зависимую подвижность и первичную адгезию бактерий [149; 325]. Нативные фураноны блокируют активность QS систем многих грамотрицательных бактерий, но не действуют на биопленочный процесс *P. aeruginosa*. Было обнаружено, что высокой активностью против QS систем *P. aeruginosa* обладают полусинтетические дериваты фуранонов, лишенные боковой ациловой цепи [149; 162; 320; 325]. Связываясь с регуляторными белками LasR/RhlR QS систем *P. aeruginosa*, они подавляли экспрессию 40–60 % QS-зависимых генов. Для полной QS-блокады необходимо использовать несколько QS-ингибиторов с различной аффинностью к регуляторным QS-белкам на разных стадиях клеточного цикла [19].

Наряду с этим было показано, что лизин-оксидаза морских бактерий (*Pseudoalteromonas tunicate* и *Marinomonas mediterranea*) вызывает отторжение биопленки ряда грамотрицательных бактерий. Это связано с тем, что она индуцирует продукцию пероксида водорода, который способствует гибели бактерий [207]. Антибиопленочный скрининг природных морских продуктов привел к открытию новых ингибиторов QS систем, таких как бромалгелиферин и ороидин, способных подавлять образование и вызывать отторжение QS-зависимых бактериальных биопленок [270]. M.E. Skindersone et al. провели поиск веществ с QS-ингибирующей анти- *P. aeruginosa* активностью среди свыше 200 экстрактов морских обитателей и обнаружили, что таким эффектом обладают экстракты, содержащие маноалидные дериваты [19; 273].

В тоже время известно, что *lasI*-мутант *P. aeruginosa* менее устойчив к биоцидным веществам [97; 102; 141; 203]. Биопленки двойных *lasR/rhlR*-мутантов *P. aeruginosa* более чувствительны к тобрамицину и пероксиду водорода, чем биопленки дикого штамма, из которого они были получены [71]. Это побудило к поиску QS-ингибиторов, которые снижают резистентность биопленок к антимикробным факторам. Было показано, что биопленки *P. aeruginosa* и *V. cerasia* обнаруживают повышенную чувствительность к

тобрамицину (опыты *in vitro* и *in vivo*) в комплексе с QS-ингибиторами; то же самое наблюдалось для биопленки *S. aureus* (повышение чувствительности к клиндамицину и ванкомицину) [78]. Было обнаружено, что биопленки *P. aeruginosa*, обработанные производными фуранона, быстро уничтожаются тобрамицином и легко диспергируются детергентами [270; 320]. Из других природных QS-ингибиторов, которые, возможно, связываются с регуляторными белками QS систем, отмечали патулин, пеницилловую кислоту (продукты *Penicillium sp.*) [254], N-гептил-сульфанил-ацетил-L-гомосеринлактон и аджоен – 2-пропенил-3-(2-пропенилсульфинил)-1-пропенил дисульфид – один из наиболее активных компонентов экстрактивных веществ чеснока (анг. Ajoene – C₉H₁₄OS₃ – 2-Propenyl-3-(2-propenylsulfinyl)-1-propenyl disulfide) [73; 163]. Экстракты чеснока, патулин и пенициллиновая кислота обеспечивают также более высокую чувствительность *P. aeruginosa* к тобрамицину [73; 163; 253]. При контакте с биопленкой дикого штамма *P. aeruginosa* нейтрофилы человека не способны уничтожить большинство биопленочных бактерий. Иначе обстоит дело с биопленками QS-мутантов или диких штаммов, обработанных QS-ингибиторами. В этом случае бактерии быстро уничтожаются нейтрофилами во время мощного респираторного взрыва – быстрого высвобождения активных форм кислорода (супероксидного радикала и пероксида водорода) клетками иммунной системы организма [19; 141; 172]. Например, было показано, что при добавлении патулина или пеницилловой кислоты нейтрофилы реагировали на биопленку *P. aeruginosa* респираторным взрывом; мыши, инъецированные патулином, быстрее, чем в контроле, освобождались от легочной инфекции [19; 253; 254].

3) Деградация АГЛ:

Деградация аутоиндукторов QS систем – один из перспективных путей борьбы с бактериальными инфекциями, регулируемые этими системами. Разложение АГЛ может быть следствием действия специфических ферментов бактерий и высших организмов; кроме того, они могут разлагаться в результате щелочного гидролиза, при высоких значениях pH, при повышенной температуре выращивания бактерий [321]. В настоящее время проводится активный скрининг ферментов, деградирующих АГЛ. Был обнаружен ряд бактериальных ферментов, которые разрушают АГЛ-медиаторы, действуя на лактоновое кольцо (N-ацил-гомосеринлактоназы) или на алифатические боковые цепи АГЛ (АГЛ-ацилазы) [16; 197; 253; 328]. АГЛ-лактоназы были впервые обнаружены у бацилл. Лактоназа AiiA расщепляет лактонное кольцо, инактивируя АГЛ [307; 321; 328]. Были получены данные о том, что введение в клетки бактерий плазмид, несущих клонированные гены этих ферментов, приводило к деградации АГЛ и изменению экспрессии некоторых генов, в регуляции которых участвуют QS системы. Введение гена *aiiA* в клетки фитопатогенной бактерии

Erwinia carotovora снижало содержание АГЛ и в результате уменьшало активность пектолитических ферментов и проявление симптомов заболевания растений [197]. К недостаткам АГЛ-лактоназ/ацилаз относится то, что, являясь белковыми молекулами, они вызывают образование антител, которые нейтрализуют блокирующий эффект. Было показано, что лактоназная реакция обратима: в нейтральной и слабощелочной среде происходит смыкание разорванного кольца и восстановление биологической активности АГЛ-молекулы [253; 307].

Высшие организмы содержат ферменты, подобные бактериальным лактоназам. Они получили название параоксоназ [87; 210]. В крови и тканях человека и других млекопитающих обнаружено, по меньшей мере, три параоксоназы: PON1, PON2 и PON3. При выделении эпителиоцитами дыхательного тракта параоксоназы прерывают QS-сигнализацию бактерий, препятствуя накоплению биопленки у муковисцидозных больных [87]. Было показано, что параоксоназы, помимо действия на бактериальные АГЛ-молекулы, выполняют важные защитные функции, участвуя в борьбе против атеросклероза (гидролиз токсичных дериватов окисленного холестерина и фосфолипидов), инактивируют ряд токсичных веществ и т.д. [62].

В настоящее время есть все основания полагать, что лекарственные средства, осуществляющие ингибирование QS систем, могут быть альтернативой традиционным лекарственным средствам антибактериальной терапии для медицины, сельского хозяйства, пищевых технологий [43; 73; 78; 87; 108; 220; 257; 320].

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Среда и условия культивирования

Для выращивания и поддержания бактерий использовали среды: Миллера Лурья-Бертани Бульон (Miller Luria Bertani Broth - LB: Бакто триптон - Bacto Tryptone – Pronadisa, Hispanlab, S.A., Madrid, Spain – 10 г/л; дрожжевой экстракт - Yeast Extract - Pronadisa, Hispanlab, S.A., Madrid, Spain – 5 г/л; хлорид натрия - NaCl – РЕАХИМ, Россия – 10 г/л); LB (Sigma, St. Louis, Missouri, USA); минимальная солевая среда М9 (М9: Гидрофосфат натрия - Na_2HPO_4 – РЕАХИМ, Россия – 6 г/л; дигидрофосфат калия - KH_2PO_4 – РЕАХИМ, Россия – 3 г/л; хлорид натрия - NaCl – РЕАХИМ, Россия – 0,5 г/л; хлорид аммония - NH_4Cl – РЕАХИМ, Россия – 1 г/л); после автоклавирования добавляли стерильно хлорид кальция - 0,1М CaCl_2 – РЕАХИМ, Россия – 1 мл; сульфат магния семиводный - 1М $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 1 мл и 10 мл 20 %-ной/40 %-ной глюкозы на 1 литр среды М9 [21];
– агаризованные среды: LA и М9 (LB и М9 с 1,5 % агара – Difco, Michigan, USA – соответственно).

Клетки в жидкой среде LB или М9 растили на качалке при 30 °С. Оптическую плотность культуры (планктонный рост) определяли при длине волны 595 нм. Количество клеток определяли по высеву на чашки Петри со средой LA с помощью шпателя или высеивая их на поверхность твердой агаризованной среды LA в 3 мл мягкого (0,5 % агара) LA.

Для подготовки исходных растворов фенольных соединений и фитогормонов (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), взвешенные образцы веществ по отдельности растворяли в 96 % этаноле (РЕАХИМ, Россия) с последующим добавлением стерильной дистиллированной воды. Соотношение 96 % этанола к дистиллированной воде в полученных растворах составляло 1:1.

Антибиотики добавляли в среду в следующих концентрациях: ампициллин – 100 и 200 мкг/мл (ОАО «Биохимик», Россия); тетрациклин гидрохлорид – 20 и 200 мкг/мл (AppliChem, Germany), в опытах с *B. cephalosporium* 370 – от 200 до 900 мкг/мл; гентамицин – 40 мкг/мл (КРКА, Словения); канамицин – 100 и 200 мкг/мл (ОАО «Синтез», Россия); хлорамфеникол – 20 мкг/мл (SERVA, Heidelberg, Germany).

2. Штаммы, плазмиды и олигонуклеотиды

Штаммы бактерий, использованные и полученные в работе, представлены в таблице 2, праймеры для ПЦР-амплификации генов – в таблице 3.

Таблица 2. Штаммы бактерий, использованные в работе

Штаммы бактерий и плазмиды	Характеристика	Источник или ссылка
<i>Serratia proteamaculans</i> 94	Прототроф, Rif ^r . Выделен из испорченных в холодильной установке мясных продуктов.	[106]
<i>S. proteamaculans</i> 94 / pME6000	<i>S. proteamaculans</i> 94, содержит векторную плазмиду pME6000, Tc ^r	[250]
<i>S. proteamaculans</i> 94 / pME6863	<i>S. proteamaculans</i> 94, содержит плазмиду pME6863, несущую клонированный ген <i>aiiA</i> , Tc ^r	[250]
<i>Serratia plymuthica</i> IC1270	Прототроф, Rif ^r . Выделен из ризосферы винограда, Узбекистан.	[237]
<i>Chromobacterium violaceum</i> CVWT	Прототроф. Синтезирует пигмент виолацеин фиолетового цвета.	[214]
<i>C. violaceum</i> CV026	Sm ^r mini-Tn5 Hg ^r <i>cvil::Tn5xylE</i> Km ^r Биосенсор, синтезирует пигмент виолацеин фиолетового цвета при наличии в среде экзогенного АГЛ	[214]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Прототроф. Содержит Ti плазмиду нопалинового типа, выделен из корончатых галлов вишни.	[263]
<i>A. tumefaciens</i> NT1/pZLR4	pZLR4 <i>traG::lacZ</i> . Ti плазмиды не имеет. Биосенсор, синтезирует β-галактозидазу при наличии в среде экзогенного АГЛ, Gm ^r .	[305]
<i>Burkholderia cenocepacia</i> 370	Прототроф. Клинический изолят.	[6]
<i>B. cenocepacia</i> 370 / pME6863	<i>B. cenocepacia</i> 370, несет плазмиду pME6863, содержащую клонированный ген <i>aiiA</i> , Tc ^r	Данная работа
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Прототроф.	Коллекция ИМГ РАН
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 / pME6863	<i>P. aeruginosa</i> PAO1, несет плазмиду pME6863, содержащую клонированный ген <i>aiiA</i> , Tc ^r	Данная работа
<i>P. aeruginosa</i> PAO1 / pME6000	<i>P. aeruginosa</i> PAO1, содержит векторную плазмиду pME6000, Tc ^r	Данная работа
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 449	Прототроф. Выделен из ризосферы кукурузы (Киевская обл., Украина).	[16]
<i>P. chlororaphis</i> 449 / pME6000	<i>P. chlororaphis</i> 449, содержит векторную плазмиду pME6000, Tc ^r	[16]
<i>P. chlororaphis</i> 449 / pME6863	<i>P. chlororaphis</i> 449, содержит плазмиду pME6863, несущую клонированный ген <i>aiiA</i> , Tc ^r	[16]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-4117	Прототроф. Выделен из почвы в Батумском ботаническом саду, Грузия.	[103]
<i>Escherichia coli</i> S17-1 (λ-pir)	<i>thi pro hsdR hsdM recA rpsL</i> RP4-2 (Tc ^r ::Mu) Km ^r ::Tn7 (λ-pir)	Коллекция ИМГ РАН
<i>E. coli</i> K-12 AB1157	F ⁻ <i>thi-1 thr-1 leuB6 proA2 his-4 argE3 lacY1 galK2 ara 14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 supE44 rpsL31</i>	[154]
<i>E. coli</i> K-12 BW25113	<i>rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567Δ(rhaBAD)568 rph-1</i>	The Keio collection
<i>E. coli</i> K-12 MC4100	F ⁻ <i>araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 deoC1 relA1 thiA ptsF25 flb5301 rbsR ompR⁺ ompF⁺ ompC⁺</i>	Коллекция ИМГ РАН
<i>E. coli</i> K-12 TK821	как <i>E. coli</i> K-12 MC 4100, также <i>ompR⁺ ompF⁺ ompC⁺ Tc^r</i>	[198]

<i>E. coli</i> K-12 MH1471	как <i>E. coli</i> K-12 MC 4100, также <i>ompR</i> ⁺ <i>ompF</i> ⁻ <i>ompC</i> ⁺	[198]
<i>E. coli</i> K-12 MH225	как <i>E. coli</i> K-12 MC 4100, также <i>ompR</i> ⁺ <i>ompF</i> ⁺ <i>ompC</i> ⁻	[198]
<i>E. coli</i> JLD271	K-12 Δ <i>lacX74 sdiA271::Cam</i>	[201]
<i>E. coli</i> JLD271 / pAL101	<i>E. coli</i> JLD271, pAL101: <i>rhlR</i> ⁺ <i>rhlI::luxCDABE</i> ; Tet ^r p15A origin Биосенсор, синтезирует люциферазу при наличии в среде экзогенного АГЛ	[201]
<i>E. coli</i> JLD271 / pAL102	<i>E. coli</i> JLD271, pAL102: <i>rhlI::luxCDABE</i> ; Tet ^r p15A origin	[201]
<i>E. coli</i> JLD271 / pAL103	<i>E. coli</i> JLD271, pAL103: <i>luxR</i> ⁺ <i>luxI::luxCDABE</i> ; Tet ^r p15A origin Биосенсор, синтезирует люциферазу при наличии в среде экзогенного АГЛ	[201]
<i>E. coli</i> JLD271 / pAL104	<i>E. coli</i> JLD271, pAL104: <i>luxI::luxCDABE</i> ; Tet ^r p15A origin	[201]
<i>E. coli</i> JLD271 / pAL105	<i>E. coli</i> JLD271, pAL105: <i>lasR</i> ⁺ <i>lasI::luxCDABE</i> ; Tet ^r p15A origin Биосенсор, синтезирует люциферазу при наличии в среде экзогенного АГЛ	[201]
<i>E. coli</i> JLD271 / pAL106	<i>E. coli</i> JLD271, pAL106: <i>lasI::luxCDABE</i> ; Tet ^r p15A origin	[201]
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17 (rk⁻ mk⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 ϕ80dlacZ Δ M15 λ⁻</i>	Коллекция ИМГ РАН
<i>E. coli</i> DH5 α / pSB401	<i>E. coli</i> DH5 α , pSB401: <i>luxR</i> ⁺ <i>luxI::luxCDABE</i> , Tet ^r p15A origin Биосенсор, синтезирует люциферазу при наличии в среде экзогенного АГЛ	[315]
<i>E. coli</i> DH5 α / pSB536	<i>E. coli</i> DH5 α , pSB536: <i>ahyR</i> ⁺ <i>ahyI::luxCDABE</i> , Amp ^r ColE1 origin Биосенсор, синтезирует люциферазу при наличии в среде экзогенного АГЛ	[201]
<i>E. coli</i> S17-1 / pME6863	S17-1(λ -pir), несет плазмиду pME6863, содержащую клонированный ген <i>aiiA</i> , Tc ^r	[16]
<i>E. coli</i> S17-1 / pME6000	S17-1 (λ -pir), содержит векторную плазмиду pME6000, Tc ^r	[16]
pME6000	pBBR1 ori, Tetr lacZ mob ⁺ [192]	Д-р Л. Чернин. Иерусалимский университет
pME6863	Плазмида pME6000, содержащая клонированный ген <i>aiiA</i> , под контролем конститутивного <i>lac</i> промотора pME6000 [255]	Д-р Л. Чернин. Иерусалимский университет

Таблица 3. Праймеры для ПЦР-амплификации нуклеотидных фрагментов

Название	Последовательность 5'-3'
АПА-F	TTCGTCCCAGCAGGTCGTT
АПА-R	GATGCCCTGGAGTATGGCCT

*Олигонуклеотиды синтезированы фирмой “Синтол”, Россия.

3. Определение продукции АГЛ

Для определения продукции АГЛ использовали различные биосенсоры.

Первый биосенсор – мутантный штамм *Chromobacterium violaceum* CV026. Он был получен введением транспозона Tn5 в ген синтазы АГЛ *cviI*. Штамм CV026 лишен синтеза АГЛ, необходимого для продукции фиолетового пигмента виолацеина; синтез этого пигмента может быть индуцирован в присутствии экзогенно добавленных АГЛ с N-ацильными боковыми цепями от C-4 до C-8 атомов углерода [214]. Мутантный штамм поддерживали на среде LA с канамицином (100 мкг/мл). Для определения продукции АГЛ исследуемыми штаммами клетки *C. violaceum* CV026 высевали штрихами на поверхность среды LA без канамицина, пересекали их штрихами тестируемых культур, каждой по отдельности, инкубировали 24-48 часов при 30 °С. В случае, когда тестируемый штамм продуцировал АГЛ, наблюдали окрашивание индикаторного штамма (CV026) в фиолетовый цвет за счет синтеза клетками пигмента виолацеина (см. рис. 2). Интенсивность окраски оценивали визуально [214; 305].

Второй вариант анализа способности бактерий синтезировать АГЛ с использованием этого сенсора заключался в следующем. Бактерии выращивали газоном на чашках с LA средой. Для этого к 3 мл мягкого 0,5 % агара LA (температура которого составляла 45 °С) добавляли 100 мкл ночной культуры CV026, выращенной в жидкой среде LB с 100 мкг/мл канамицина на качалке при 30 °С, и затем выливали на чашку с LA средой. После этого на газон помещали по 2-3 мкл тестируемой культуры или 3 мкл проб этилацетатных экстрактов АГЛ из тестируемых культур, росших с различными концентрациями исследуемых веществ. После 24-48 часов инкубации при 28-30 °С определяли, синтезируется ли виолацеин, по фиолетовой окраске вокруг зон роста тестируемых штаммов или проб этилацетатных экстрактов АГЛ.

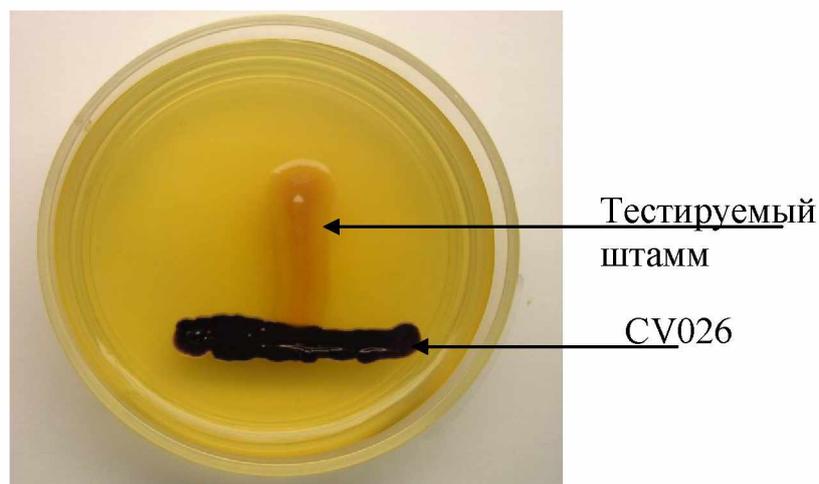


Рис. 2. Тест на продукцию АГЛ с использованием в качестве биосенсора *Chromobacterium violaceum* CV026.

Второй биосенсор - штамм *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4. Он содержит плазмиду pZLR4 несущую регуляторный ген *traR* и конструкцию *traG::lacZ*; эта сенсорная система реагирует на широкий спектр экзогенных АГЛ, в том числе, АГЛ с ацильными группами С-4 – С-12 в боковых цепях и АГЛ, содержащие оксо- и гидроксо- группы [201; 265; 280]. Для определения синтеза АГЛ исследуемыми штаммами ночную культуру *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 выращивали на среде LB с добавлением гентамицина (40 мкг/мл) при 30 °С. На чашки Петри с агаризованной средой М9 добавляли 3 мл мягкого 0,5 % агара М9 (температура которого составляла 45 °С) содержащего 0,1 мл ночной культуры *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 и X-Gal (5-бromo-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактозид – Fermentas, Vilnius, Lithuania; конечная концентрация 50–100 мкг/мл), растворенный в диметилформамиде (ДМФА). На поверхность агаризованной среды после ее застывания помещали по 2-3 мкл тестируемой культуры или 3 мкл проб этилацетатных экстрактов АГЛ из тестируемых культур, росших с различными концентрациями исследуемых веществ или без них. Тестируемые на продукцию АГЛ штаммы также высевали уколами на поверхность агаризованной среды после ее застывания или добавляли жидкую ночную культуру в лунки в агаризованной среде, инкубировали 24-48 часов при 30 °С. О синтезе АГЛ тестируемыми штаммами или о наличии АГЛ в анализируемых пробах судили по появлению голубых зон гидролиза X-Gal. X-Gal разлагается β-галактозидазой, образуя производное, окрашенное в голубой цвет; синтез β-галактозидазы штаммом *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 происходит только в присутствии экзогенного АГЛ (см. рис. 3) [265; 280].

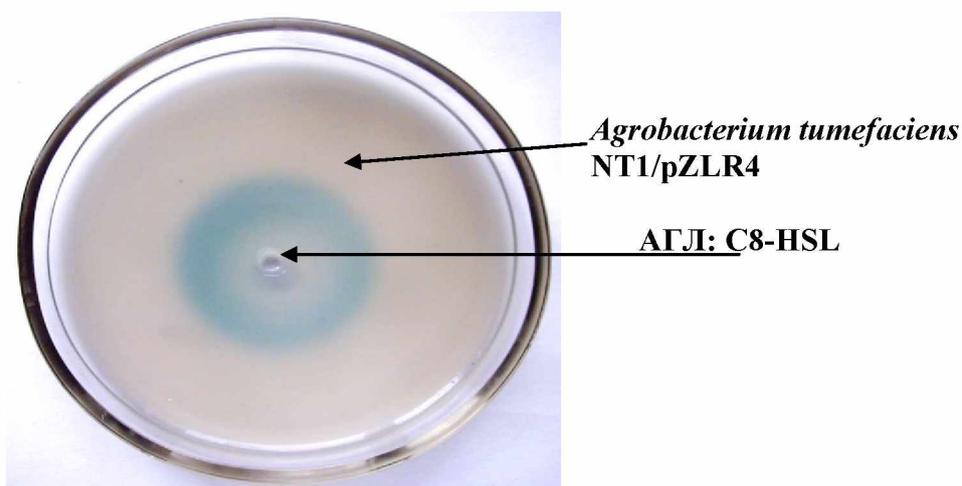


Рис. 3. Проверка активации биосенсора *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 при добавлении экзогенного АГЛ (C8-HSL).

4. Определение действия исследованных веществ на *lux*-биосенсоры

Для того чтобы определить непосредственное действие тестируемых соединений на QS системы мы использовали различные биосенсоры на основе *lux*-репортерных плазмид:

1) штаммы *E. coli* DH5 α , содержащие плазмиды с репортером *lux*-опероном. Эти биосенсоры были сконструированы на основе различных QS систем; они синтезируют различные рецепторные белки LuxR типа, с которыми связываются АГЛ. Биосенсоры не синтезируют АГЛ, т.к. гены, кодирующие АГЛ-синтазы, в них инактивированы, но отвечают на различные экзогенные АГЛ; *lux*-оперон транскрибируется с промотора гена синтазы АГЛ. Репортерные плазмиды pSB401 и pSB536, содержащиеся в сенсорных штаммах, несут гены, кодирующие рецепторные белки LuxR (*V. fischeri*) и AhvR (*Aeromonas hydrophila*) соответственно, которые взаимодействуют с различными АГЛ [315].

2) мы использовали также биосенсоры, любезно присланные нам Dr. B. Ahmer [201]. Эти биосенсоры представляют набор изогенных штаммов *E. coli* JLD271, у которых отсутствует ген *sdiA* (кодирующий белок SdiA, гомолог белка LuxR) и содержатся или не содержатся гены, кодирующие различные рецепторные белки LuxR типа, что позволяет определить зависимость эмиссии света от этих рецепторных белков (сравнивали люминесценцию сенсоров, содержащих плазмиды pAL103 и pAL104; pAL105 и pAL106 и штаммов, содержащих плазмиды pAL101 и pAL102, соответственно).

Интенсивность биолюминесценции штамма *E. coli* DH5 α , содержащего *lux*-репортерные плазмиды pSB401 или pSB536, и штамма *E. coli* JLD271, содержащего плазмиды pAL101, pAL102, pAL103, pAL104, pAL105 и pAL106 (таб. 2) определяли, как описано [201; 315]. Степень активации биосенсоров рассчитывали как отношение интенсивности люминесценции при определенной концентрации исследованного вещества к интенсивности люминесценции в контроле, где вместо вещества добавляли воду. В качестве дополнительного контроля (для проверки состояния биосенсоров) к ним добавляли синтетические АГЛ-стандарты.

Сенсорные штаммы выращивали в среде LB с соответствующими антибиотиками 18 час. при 30 °C и затем разводили в 10 раз в свежей среде LB, содержащей различные концентрации исследуемых веществ. После чего через определенные промежутки времени (обычно через 4 и 6 часов) измеряли биолюминесценцию растущих культур (в объеме пробы, равной 200 мкл). Для измерения биолюминесценции использовали прибор Биолюм-1 люминометр («Протеог», Москва, Россия) и Modulus microplate Multimode Reader (Turner BioSystems inc., USA). В разделе 4.5.2 приводятся данные полученные только с помощью прибора Modulus microplate Multimode Reader (Turner BioSystems inc., USA); поскольку данный прибор обладает большей чувствительностью по сравнению с Биолюм-1 люминометром.

5. Экстракция АГЛ из супернатантов культур и анализ экстрактов

Экстракция АГЛ из супернатантов культур. Для проведения экстракции АГЛ из культуральных супернатантов использовали метод, описанный в работе Shaw P.D. et all [265]. С этой целью бактерии, росшие на чашках со средой LA, пересеивали в жидкую среду LB (10 мл) с добавлением различных концентраций исследуемых веществ и выращивали в течение 17–20 часов роста при 30 °С и перемешивании. Затем полученные ночные культуры центрифугировали (40 мин при 4500 об/мин) с охлаждением (4 °С). Полученные бесклеточные супернатанты смешивали с равным объемом раствора этилацетата ("Компонент-Реактив", Россия), содержащим 0,1 % ледяной уксусной кислоты ("Мосреактив", Россия). Экстракцию проводили в течение 30 минут при перемешивании и комнатной температуре. Водную (нижнюю) фазу отделяли с помощью делительной воронки и повторяли экстракцию. Этилацетатные фазы объединяли. Остатки воды в этилацетатной фазе убирали добавлением сульфата натрия (Na_2SO_4 - ОАО "Михайловский завод химических реактивов", Россия) с перемешиванием. Безводную этилацетатную фазу отфильтровывали для удаления соли. Этилацетат выпаривали на роторном испарителе при 37 °С. После упаривания остаток растворяли в 1,5 мл этилацетата и переносили в пробирки типа эппендорф (Eppendorf). Затем выпаривали до сухости на SpeedVac (вакуумный испаритель) и хранили при –20 °С. В итоге получали сухие остатки экстрактов АГЛ из культур, росших с различными концентрациями исследуемых веществ или без них.

Полученные сухие остатки растворяли в 100–200 мкл этилацетата и затем анализировали полученные пробы.

Для анализа полученных проб использовали различные специфичные *lux*-биосенсоры или биосенсоры *S. violaceum* CV026 и *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 (см. Материалы и методы раздел № 3).

Определение АГЛ в этилацетатных экстрактах культур с помощью lux-биосенсоров. Биосенсорные штаммы *E. coli* JLD271, содержащие pAL101, pAL103 и pAL105 плазмиды, использовали для определения количества АГЛ в полученных пробах. Штаммы *E. coli* JLD271, содержащие pAL102, pAL104 и pAL106 плазмиды, лишённые генов кодирующих рецепторные белки LuxR-типа и не реагирующие специфически с АГЛ, были использованы для контроля. Штаммы *E. coli* JLD271 выращивали на среде LB с соответствующими антибиотиками (с тетрациклин гидрохлоридом – 20 мкг/мл и хлорамфениколом – 25 мкг/мл) в течение 18 часов при 30 °С и перемешивании. Затем разводили в 10 раз в свежей среде LB, с добавлением синтетических АГЛ-стандартов (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), для контроля работы биосенсоров, или проб (5 мкл пробы в 5 мл LB), содержащих этилацетатные экстракты АГЛ из культур *P. aeruginosa* PAO1 или *A. tumefaciens* C58,

выращенных в присутствии различных концентраций 4-гидроксibenзойной, галловой кислот или ванилина. После чего биосенсоры растили при перемешивании и при 30 °С, измеряя значения биолюминесценции растущих культур через определенные промежутки времени (через 2, 4 и 6 часов после добавления анализируемых проб). В качестве контроля использовали пробу, полученную из культуры *P. aeruginosa* PAO1 или *A. tumefaciens* C58, выращенную без добавления исследуемых веществ. Сравнивая полученные значения биолюминесценции растущих культур биосенсорных штаммов с контролем, судили о влиянии различных концентраций исследуемых веществ на синтез АГЛ в культурах, из которых были экстрагированы данные АГЛ.

Аналогично использовались и биосенсорные штамма *E. coli* DH5 α , содержащие *lux*-репортерные плазмиды pSB401 или pSB536 (подробнее о штаммах см. Материалы и методы, раздел № 4).

6. Определение образования биопленок

Свежую культуры бактериальных штаммов, выросшие на чашках со средой LA, высевали в LB с соответствующими антибиотиками или без них, и инкубировали при аэрации в течение 24 часов при температуре 30 °С. Затем культуры разбавлялись в 300 раз в свежей среде LB без антибиотиков. Для измерения образования биопленок культуры выращивали в 96-ти луночных полистироловых планшетах (ОАО “Медполимер”, Россия) с различными концентрациями растворов исследуемых веществ. В лунки вносили 135 мкл культуры и 15 мкл раствора тестируемых веществ, в контроле – 135 мкл культуры и 15 мкл жидкости используемой в качестве растворителя для тестируемых веществ (вода или раствор 96 % этанола с водой взятый в соотношении 1 : 1). Клетки росли 24 часа с легким перемешиванием на качалке (~105 об/мин.) при температуре 30 °С, после чего определяли оптическую плотность неприкрепленных (планктонных) клеток (ОП $\lambda=595$ нм). Образование биопленок измеряли после удаления среды, промывки лунок водой (один раз) и окрашивания образованных биопленок в течение 45 минут 0,1 %-ным водным раствором красителя кристаллического фиолетового (кристаллвиолет) при 24 °С.

Состав красителя на основе кристаллвиолета:

кристаллвиолет (РЕАХИМ, Россия)	1 г
фенол кристаллический (РЕАХИМ, Россия)	2 г
96 % этанол	10 мл
вода дистиллированная	90 мл

После перемешивания оставляли на сутки в тёмном месте, затем отфильтровывали.

После окрашивания жидкость сливали, лунки промывали водой (три раза), в лунки добавляли 96 % этанол для экстракции красителя из биопленок, абсорбцию раствора измеряли при $\lambda=595$ нм через 45 минут после начала экстракции. По интенсивностям окраски полученных растворов судили об уровнях образования биопленок при разных концентрациях тестируемых веществ. Для измерения значений планктонных клеток и биопленок использовали прибор iMark Microplate Reader (Bio-Rad, USA). Продолжительность роста клеток 24 часа была оптимальной для формирования биопленок; после этого времени уровень образования биопленок не изменялся, или даже несколько уменьшался.

В каждом эксперименте биопленки анализировали в 4-8 лунках с исследуемым штаммом и с одинаковой концентрацией тестируемого вещества, эксперименты повторяли 3-4 раза. Изучая под микроскопом клеточную суспензию из лунок, не выявили клеточных агрегатов. Биопленки формировались на стенках лунок на границе питательной среды и воздуха, но не на дне лунок и не на поверхности среды в лунках.

7. Методы работы с ДНК

Выделение плазмидной ДНК и агарозный гель-электрофорез проводили согласно общепринятым методикам [18; 21], с небольшими изменениями, принятыми в лаборатории.

Выделение плазмидной ДНК. Для выделения плазмидной ДНК использовали набор GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Fermentas.

ПЦР – амплификация. ПЦР-амплификацию фрагментов ДНК проводили на четырехканальном программируемом термостате ТП4-ПЦР-01-«Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-технология», Россия). Стандартную реакцию ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси, содержащей: 1) стерильную воду – 16 мкл на пробу; 2) смесь для проведения ПЦР -DreamTaq PCR Master mix (2X) (Fermentas) – 25 мкл на пробу; 3) два праймера, комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК – по 2 мкл на пробу каждого праймера (концентрация праймеров – $C_0 = 10$ пМ; ЗАО «Синтол»); 4) ДНК матрицу – 5 мкл на пробу. В качестве матрицы для ПЦР использовали плазмидные ДНК или «варёнки» с колоний. Для приготовления «варёнки» клетки бактерий с поверхности агаризованной среды петлей помещали в эппендорф, суспендировали в 100 мкл воды, эппендорф помещали в кипящую воду, кипятили 10 мин, охлаждали во льду, центрифугировали 5 мин при 11000 об/мин, осадок отбрасывали; добавляли 5 мкл полученной матрицы к 45 мкл реакционной смеси для ПЦР. В случае плазмидной ДНК к 45 мкл смеси добавляли 1 мкл матрицы + 4 мкл стерильной воды. Чтобы предотвратить выкипание готовой реакционной смеси во время ПЦР-реакции в эппендорф добавляли 15 мкл стерильного вазелинового масла.

Электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле. Анализ фрагментов ДНК проводили в 1 % агарозном (Amresco, Solon, USA) геле в буфере TAE (40 mM трис-ацетат, 1 mM ЭДТА, pH 7.6) с добавлением 1 мкг/мл бромистого этидия (Amresco). Для определения длины фрагментов наносили маркер GeneRuler 1 кб (Fermentas). Пробы ДНК смешивали с буфером для нанесения (0,5 % SDS; 0.1 M ЭДТА; pH 8.0; 50 % глицерин; 0,25 % бромфенолового синего; 0,25 % ксиленцианола). Фрагменты ДНК детектировали в геле при его облучении УФ светом с длиной волны 302 нм.

8. Перенос плазмид

Перенос плазмид pME6000 и pME6863 в клетки *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cenocepacia* 370 выполняли по методу, описанному в работе Reimann C. et all, с небольшими модификациями [255]. Плазмиды передавались из *E. coli* S17-1 конъюгацией в *P. aeruginosa* PAO1 и в *B. cenocepacia* 370 с селекцией на среде LA с тетрациклин гидрохлоридом и ампициллином. Резистентность клеток к тетрациклин гидрохлориду определялась соответствующими плазмидами, ампициллин добавлялся в среду для удаления штамма донора *E. coli* S17-1, содержащего плазмиды pME6000 или pME6863. Присутствие гена *aiiA* в штаммах PAO1 и 370, несущих плазмиду pME6863, было подтверждено с помощью ПЦР, с использованием специфических праймеров для этого гена (подобраны по последовательности гена *aiiA*, AF397400): АПА-F и АПА-R. В качестве матриц были использованы плазида pME6863 и «варенки» реципиентов, несущих эту плазмиду. Режим ПЦР: 1 цикл 94 °C – 3 мин., 62 °C – 2 мин., 72 °C – 2 мин., затем 30 циклов 94 °C – 10 сек., 62 °C – 10 сек, 72 °C – 20 сек., после чего 1 цикл 72 °C – 5 мин. После амплификации пробы подвергались электрофорезу в агарозном геле.

9. Определение способности клеток бактерий к миграции по поверхности среды

Сворминг. Определение способности клеток бактерий к сворминг миграции по поверхности среды проводили по методу, описанному в работе Givskov M. et all [133]. Ночные культуры исследуемых штаммов разводили в 100 раз в свежей среде LB с соответствующими антибиотиками или без них, подрачивали в течение 2-3 часов до достижения клетками экспоненциальной фазы роста. 2-3 мкл культуры наносили на поверхность агаризованных сред: (0,5 %) LA или (0,5 %) M9 с добавками (0,4 % глюкоза; 0,5 % казаминовые кислоты), содержащих различные концентрации тестируемых веществ. Инкубировали 48 часов при 30 °C. Наличие зон миграции клеток по поверхности среды определяли визуально.

Свимминг. Этот анализ был выполнен при тех же условиях, что и сворминг, за исключением того, что использовали среды с 0,3–0,33 % агара.

Твитчинг. Этот анализ был выполнен при тех же условиях, что и сворминг, за исключением того, что 2–3 мкл культуры с помощью наконечников для дозаторов уколом вносились на дно чашки Петри, содержащей среду LA с 1 % агара.

10. Определение действия летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых бактериями, и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58

В работе был использован метод выращивания так называемых колони-биопленок (англ. Colony biofilm assay, или membrane-supported biofilms – один из типов биопленок, образуемый клетками), на стерильных мембранных фильтрах (см. Рис. 4), описанный в работе Merritt J.H. et all [215], с небольшими изменениями, принятыми в лаборатории. Изучение биопленок именно этого типа обусловлено тем, что они легко диспергируются (удаляются) с фильтров в жидкую среду. В качестве мембранных фильтров используются – поликарбонатные мембранные фильтры: диаметр фильтра = 25 мм, размер пор = 0,2 мкм (Filter membranes, Isopore track-etched polycarbonate - Merck Millipore, USA).

*1) Определение действия общего пула летучих веществ, синтезируемых бактериями, и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок *A. tumefaciens* C58.*

A. tumefaciens C58 выращивали на среде LB при 30 °С и перемешивании в течение в течение 17-20 часов роста, затем разводили в 2000 раз в свежей среде LB.

Опыты проводили на чашках Петри, разделенных на две части перегородкой (рис. 4). Перегородка не прилегала к крышке, оставалось свободное пространство для обмена воздухом между двумя частями чашки Петри. Одну половину чашки либо засеивали бактериями-продуцентами ЛОС (*S. proteamaculans* 94, *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* 35, *S. plymuthica* IC1270) на среде LA, либо добавляли различные количества индивидуальных ЛОС (диметилдисульфид, 2-гептанон, 2-нонанон, 2 ундеканон или 1-ундецен – Sigma-Aldrich Chimie GmbH, Steinheim, Germany), а на вторую часть чашки (содержит среду LA) помещали мембранный фильтр, на который затем наносили разведенную культуру *A. tumefaciens* C58 - 15 мкл. После этого чашки для герметизации заматывали лентой «Parafilm M» (Pechiney Plastic Packaging Company, Chicago, USA) и инкубировали 48 часов при 30 °С (см. рис. 4).

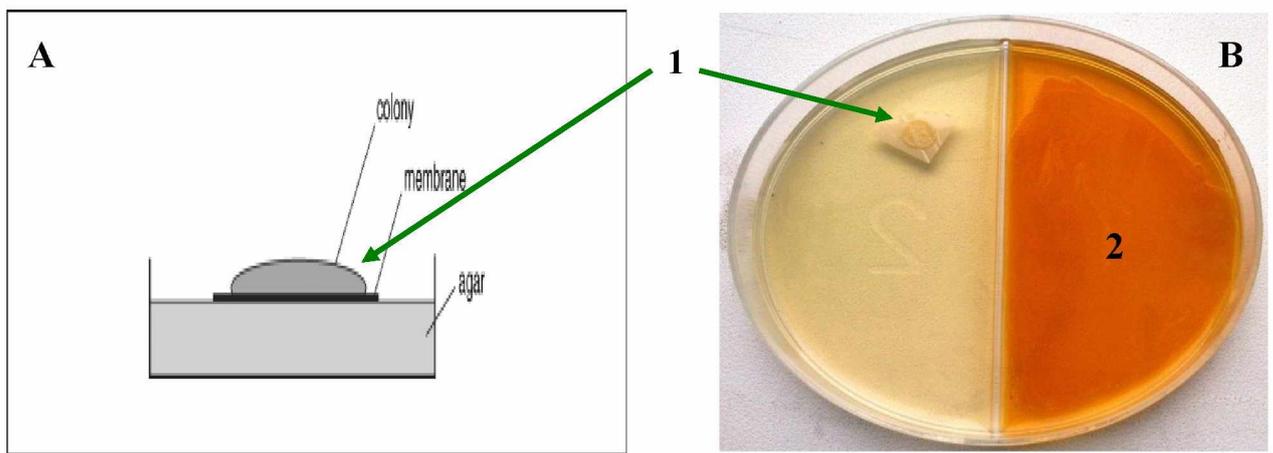


Рис. 4. Colony biofilm assay: **А** – схематичный вид сбоку; **В** – вид сверху; **1** – мембранный фильтр с биопленкой *A. tumefaciens* C58; **2** – *P. chlororaphis* 449, штамм-продуцент ЛОС.

Через 48 часов фильтр с образовавшейся на нем биопленкой *A. tumefaciens* C58 (рис. 4 В) с чашек переносился в пробирки с 5 мл физраствора (0,85 % водный раствор NaCl). Пробирки подвергали механическому перемешиванию на вортексе для удаления биопленки с фильтров в жидкую среду, измеряли оптическая плотность полученных суспензий. Затем готовили различные разведения суспензий (обычно разведение в 10^4 - 10^6 раз). На чашки Петри со средой LA добавляли либо 4 мл мягкого агара LA (0,5 % агара), который содержал 100 мкл клеточных суспензий из полученных разведений, либо добавляли 100 мкл суспензий из соответствующих разведений и растирали шпателем по поверхности агаризованной среды. Подсчитывали количество выросших на LA колоний после роста при 30 °С в течение 48 часов. Таким образом определяли количество клеток в биопленке на фильтре (количество колониеобразующих единиц - КОЕ). По КОЕ судили о действии газовых смесей (общего пула) летучих веществ, синтезируемых бактериями, и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок *A. tumefaciens* C58.

В качестве контроля использовались разделенные перегородкой чашки Петри со средой LA; на одну половину чашки помещали мембранный фильтр, на который затем наносили разведенную культуру *A. tumefaciens* C58 - 15 мкл; на второй половине чашки не было ни ЛОС, ни бактерий-продуцентов летучих веществ.

2) *Определение действия общего пула летучих веществ, синтезируемых бактериями, и индивидуальных ЛОС на зрелые биопленки A. tumefaciens C58.*

Выполнялось аналогично п. 1 данного раздела за исключение следующего:

Для образования биопленок на одну половину разделенных перегородкой чашек Петри со средой LA, помещали мембранный фильтр, на который затем наносили разведенную культуру *A. tumefaciens* C58 - 15 мкл, но при отсутствии на второй половине чашки индивидуальных ЛОС или роста бактерий-продуцентов ЛОС на среде LA. После

этого чашки для герметизации заматывали лентой «Parafilm M» и инкубировали 48 часов при 30 °С.

Затем на другую половину чашки Петри добавляли различные количества индивидуальных ЛОС или подсевали штаммы-продуценты летучих веществ (20 мкл из ночной культуры), после чего чашки снова герметизировали парафильмом и инкубировали 24 часа при 30 °С. Затем биопленки смывали в физраствор и определяли количество выросших колоний.

Достоверность результатов работы основана на воспроизводимости полученных экспериментальных закономерностей; на использовании аттестованного измерительного оборудования, стандартизированных и современных методов исследования (биологических, физико-химических и др.).

Для получения статистически достоверных данных все эксперименты проводили минимум в трех повторностях.

Статистическую обработку результатов для каждого конкретного варианта эксперимента проводили в программе Microsoft Excel. Использовали функцию для вычисления среднего арифметического значения своих аргументов, соответствующих выборке из генеральной совокупности (СРЗНАЧ – в качестве аргументов используются результаты, полученные для конкретного варианта эксперимента), и стандартное отклонение по выборке относительно их среднего арифметического значения (СТАНДОТКЛОН) для определения погрешности полученных значений.

На графиках и в таблицах представлены средние арифметические значения **n**-числа повторностей (где **n** ≥ 3) для каждого конкретного варианта эксперимента. В большинстве случаев на графиках также отображены стандартные отклонения от величин средних значений.

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ

4.1. Действие фенольных соединений на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58

В последнее время большое внимание исследователи уделяют веществам растительного происхождения с антимикробным действием (соединениям фенольной природы, терпеноидам, производным индола и др.). Функции их в растениях разнообразны: они участвуют в регуляции роста и развития растений, во взаимоотношениях между растениями и фитопатогенными и симбиотическими микроорганизмами, обладают антимикробной активностью и важны для защиты растений от фитопатогенных бактерий [160; 208; 245; 287].

Структура и химические свойства растительных фенолов очень разнообразны, к ним относят полифенолы, фенольные кислоты, альдегиды, спирты, и др. Растительные фенолы замедляют рост широкого диапазона микроорганизмов [208]. В чае, кофе, какао, красном вине и медицинских растениях, они являются основными компонентами, влияющими на микроорганизмы. [55; 124; 190]. Лечебные свойства этих веществ в значительной степени связаны с их антиоксидантной активностью. Кроме того, сообщалось, что некоторые из них могут действовать как прооксиданты, индуцируя повреждения ДНК [160; 260].

Многие из фенольных соединений растительного происхождения перспективны для создания на их основе новых лекарственных препаратов или уже применяются в медицинской практике в качестве противовоспалительных, желчегонных, антимикробных и противоопухолевых препаратов [60; 88; 124; 260; 287].

Несмотря на многочисленные исследования их эффектов, некоторые аспекты влияния данных соединений на микроорганизмы плохо изучены, например, действие этих веществ на образование биопленок бактериями; было проведено только несколько работ по исследованию их влияния на бактериальные биопленки. Было показано, что некоторые из них оказывают антибиопленочный эффект в отношении *B. cepacia* и *P. aeruginosa* [160; 306]. Однако эти эффекты требуют более детального изучения и выяснения механизмов действия фенольных соединений.

В связи с вышесказанным, в настоящей работе исследовалось действие различных фенольных соединений растительного происхождения (рис. 5) на способность *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58 формировать биопленки и на рост планктонных (т.е., неприкрепленных) клеток этих бактерий [245]. *A. tumefaciens* – хорошо известная фитопатогенная бактерия, вызывает образование корончатых галлов (опухолей) у многих видов двудольных растений. Бактерия *P. aeruginosa* широко известна как

оппортунистический патоген человека, вызывающий внутрибольничные и легочные инфекции, особенно у пациентов с нарушенным иммунитетом и кистозным фиброзом (муковисцидоз). Тяжесть инфекционного процесса зависит от способности возбудителя к формированию биопленок на легочной ткани. [32]. Кроме того, штаммы *P. aeruginosa* распространены в почве и водной среде, способны колонизовать корни растений, образовывать на них биопленки и вызывать гибель растений. За последние несколько лет *P. aeruginosa* и *A. tumefaciens* стали модельными организмом для изучения QS систем и образования биопленок [80; 104; 306]. Работа выполнялась совместно с младшим научным сотрудником ИМГ РАН Ю.В. Зайцевой.

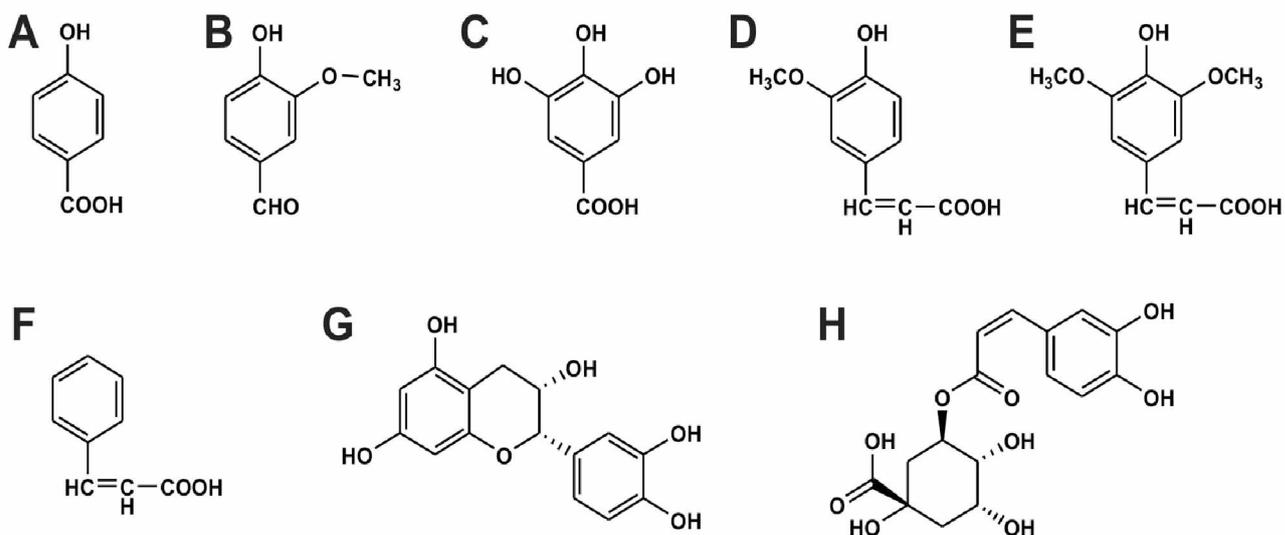


Рис. 5. Химические формулы тестируемых соединений: А – 4-гидроксibenзойная кислота; В – ванилин; С – галловая кислота; D – феруловая кислота; E – синаповая кислота; F – коричная кислота; G – эпикатехин; H – хлорогеновая кислота.

4.1.1. Образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58 в присутствии растительных фенолов

В работе были использованы растительные фенолы различной природы (рис. 5): эпикатехин – характерный представитель класса катехинов из группы флавоноидов (растительных полифенолов); фенолокислоты (производные бензойной кислоты) – галловая (3,4,5-тригидроксibenзойная кислота) и 4-гидроксibenзойная кислоты, производные оксикоричной кислоты – феруловая и синаповая кислоты; фенолоальдегид – ванилин. Также использовалась коричная кислота (жирно-ароматическая ненасыщенная карбоновая кислота группы фенилпропаноидов, существует главным образом в более устойчивой транс-форме), которая является предшественником ряда фенольных соединений, например, хлорогеновой кислоты (сложный эфир кофейной кислоты с одним из стереоизомеров хинной кислоты).

Было показано, что эти соединения могут проявлять стимулирующее или подавляющее действие на формирование биопленок, в зависимости от концентрации. При концентрациях, не подавляющих или слабо подавляющих рост бактерий, все исследованные соединения стимулировали формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58. При более высоких концентрациях, формирование биопленок было подавлено (например, рис. 6 А, С, D, Е, Н и рис. 7 А, В, Е, F). Следует отметить, что все тестированные соединения, независимо от их структуры, оказывали подобное действие.

Например, при действии 4-гидроксibenзойной, галловой и коричной кислот в районе концентраций 25–100 мкг/мл уровень образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 возрастал в 2–3 раза по сравнению с биопленками, сформированными в отсутствие этих соединений (рис. 6 F–H). При действии синаповой кислоты наблюдалось 2–2,5-кратное увеличение образования биопленок в районе концентраций 200–400 мкг/мл (рис. 6 С), и почти в 2 раза увеличивались биопленки при действии феруловой кислоты (при 400 мкг/мл, рис. 6 Е). В присутствии хлорогеновой кислоты наблюдалось постепенное увеличение образования биопленок до 2,5 раз при её концентрациях от 50 до 400 мкг/мл (рис. 6 D). Самые высокие уровни биопленки наблюдались в большинстве случаев при снижении планктонного роста клеток на 20–50 % по сравнению с контролем. При более высоких концентрациях фенольные соединения подавляли образование биопленок. Например, было показано, что ванилин увеличивал образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 до 7 раз, когда его концентрация повышалась до 750 мкг/мл (рис. 6 А). Планктонный рост штамма *P. aeruginosa* PAO1 не изменялся вплоть до концентрации ванилина 400 мкг/мл, при дальнейшем повышении концентрации планктонный рост снижался и был практически полностью подавлен при 3000 мкг/мл. Эпикатехин вызывал 4–5-кратное повышение образование биопленки *P. aeruginosa* PAO1 при субингибиторных концентрациях до 750 мкг/мл (рис. 6 В). При более высоких концентрациях эпикатехина (до 3000 мкг/мл) формирование биопленок оставалось практически на том же уровне, в то время как планктонный рост снижался в 2 раза.

Закономерность влияние растительных фенольных соединений на формирование биопленок *A. tumefaciens* C58 была такой же, как и в случае *P. aeruginosa* PAO1 (рис. 7 А–H). Формирование биопленок увеличивалось до 2–3 раз при действии субингибиторных концентраций фенольных соединений. При более высоких концентрациях эти вещества ингибировали образование биопленок.

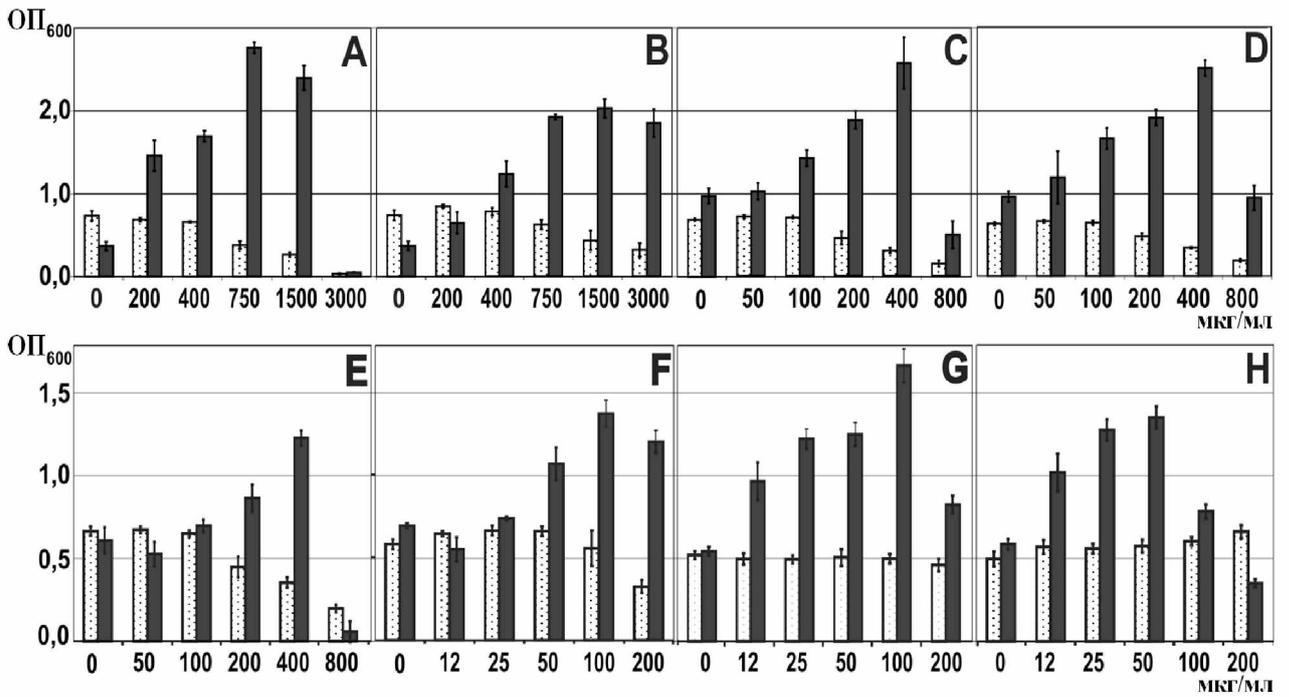


Рис. 6. Влияние ванилина (А), эпикатехина (В), синаповой кислоты (С), хлорогеновой кислоты (D), феруловой кислоты (Е), коричной кислоты (F), 4-гидроксibenзойной кислоты (G), и галловой кислоты (H) на формирование биопленок и планктонный рост *P. aeruginosa* PAO1. Белые столбцы – планктонный рост; черные – биопленки. По оси ординат: оптическая плотность (ОП) при $\lambda=600$ нм. По оси абсцисс – концентрация тестируемого вещества, мкг/мл.

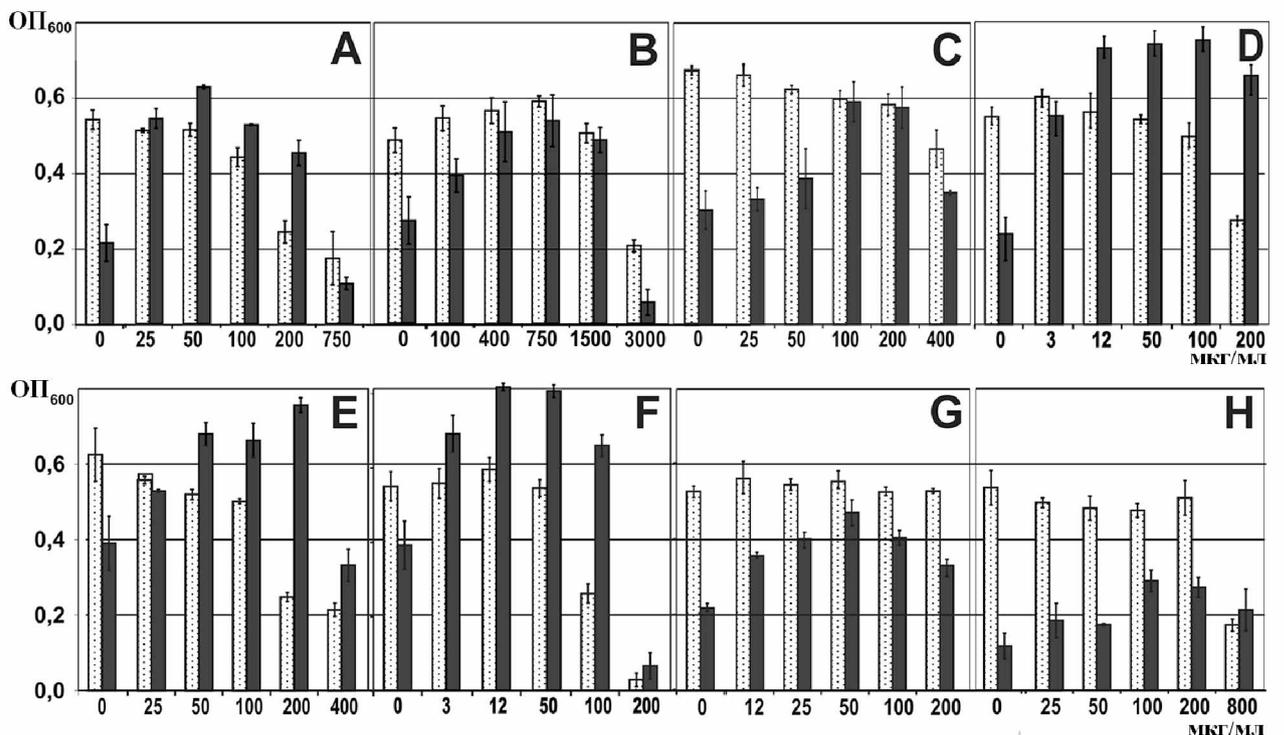


Рис. 7. Влияние ванилина (А), эпикатехина (В), синаповой кислоты (С), хлорогеновой кислоты (D), феруловой кислоты (Е), коричной кислоты (F), 4-гидроксibenзойной кислоты (G), и галловой кислоты (H) на формирование биопленок и планктонный рост *A. tumefaciens* C58. Белые столбцы – планктонный рост; черные – биопленки. По оси ординат: оптическая плотность (ОП) при $\lambda=600$ нм. По оси абсцисс – концентрация тестируемого вещества, мкг/мл.

Стимуляция формирования биопленок при субингибиторных концентрациях фенольных соединений растительной природы была показана нами впервые. Ранее стимуляция образования биопленок при низких концентрациях антибактериальных агентов была отмечена для некоторых антибиотиков, например, аминогликозидов и тетрациклина [150; 200]. Но, несмотря на большой интерес к данному вопросу, точные механизмы, ответственные за действие субингибиторных концентраций антибиотиков на формирование биопленок, еще предстоит выяснить.

4.1.2. Определение синтеза АГЛ штаммом *P. aeruginosa* PAO1, при росте культуры на среде с различными концентрациями фенольных соединений

Механизм стимулирующего действия указанных выше соединений на образование биопленок бактериями в настоящее время неясен. Как отмечалось выше, QS системы ряда бактерий участвуют в регуляции образования биопленок [78; 97; 107; 162; 191]. Мы предположили, что стимулирующее действие исследуемых соединений на образование биопленок могло быть связано с повышенным функционированием в этих условиях QS систем тестируемых бактерий.

По данным литературы QS системы необходимы для формирования зрелых, дифференцированных биопленок *P. aeruginosa*. Мутантные штаммы *P. aeruginosa*, не способные к синтезу сигнальных молекул АГЛ, образуют значительно более тонкие биопленки, чем штаммы дикого типа [97; 107; 162; 298].

Как уже отмечалось, *P. aeruginosa* (включая штамм PAO1) имеет две QS системы, функционирующие с участием АГЛ – LasI-LasR и RhlI-RhlR, гомологи классической LuxI/LuxR системы *V. fischeri*. LasI- и RhlI-синтазы отвечают за синтез 3-охо-C12-HSL и C4-HSL соответственно [41; 71; 107; 314]. Кроме того, штаммы *P. aeruginosa* синтезируют третью сигнальную молекулу, 2-гептил-3-гидрокси-4-хинолон (PQS) [110; 144; 314], которая участвует в контроле ряда свойств *P. aeruginosa*. Функционирование этих регуляторных систем взаимосвязано; все они принимают участие в регуляции формирования биопленок *P. aeruginosa* [107; 110].

Для того чтобы изучить механизм стимуляции образования биопленок субингибиторными концентрациями растительных фенолов, исследовалось влияние трех из них на синтез АГЛ, которые являются сигнальными молекулами QS систем *P. aeruginosa* PAO1.

Для определения количества АГЛ, синтезированных *P. aeruginosa* PAO1, была проведена экстракция супернатантов культур, выращенных в присутствии 4-гидроксибензойной, галловой кислоты, ванилина или без них. Полученные этилацетатные

экстракты АГЛ не концентрировали, чтобы избежать увеличения содержания тестируемых фенольных соединений, что могло бы привести к ингибированию роста используемых *lux*-биосенсоров, позволяющих определить 3-охо-С12-HSL (*E. coli* JLD271/pAL105) и С4-HSL (*E. coli* JLD271/pAL101). Определение АГЛ в каждом эксперименте проводили методом сравнения данных биолюминесценции трех отдельных проб, для каждого варианта этилацетатных экстрактов АГЛ. В качестве контролей использовали штаммы *E. coli* JLD271/pAL106 и JLD271/pAL102, в которых отсутствуют гены, кодирующие LasR и RhIR рецепторные белки LuxR типа, и не реагирующие непосредственно на АГЛ. Эти биосенсоры не были активированы этилацетатными экстрактами АГЛ из культур *P. aeruginosa* PAO1, выращенных в присутствии 4-гидроксибензойной, галловой кислоты или ванилина (данные не показаны). Фоновые значения люминесценции всех биосенсоров (без добавления этилацетатных экстрактов АГЛ или АГЛ-стандарта) в течение всего эксперимента были приблизительно на одном уровне и колебались в разных опытах в пределах от 2 до 5 относительных световых единиц (RLU). Каждый эксперимент проводили в трёх повторностях. Для измерения биолюминесценции использовали Биолум-1 люминометр.

На рис. 8 показаны результаты типичного эксперимента по сравнительному определению АГЛ в этилацетатных экстрактах культур *P. aeruginosa* PAO1, выращенных в присутствии растительных фенольных соединений и без них (с помощью биосенсора *E. coli* JLD271/pAL105, который синтезирует люциферазу при наличии в среде экзогенного 3-охо-С12-HSL). Люминесценция в культуре этого штамма биосенсора возрастала с увеличением концентрации 4-гидроксибензойной, галловой кислоты и ванилина в пределах от 40 до 200–400 мкг/мл и снижалась при более высоких концентрациях. Этот эффект, как представляется, является результатом увеличения синтеза 3-охо-С12-HSL штаммом *P. aeruginosa* PAO1 при действии субингибиторных концентраций фенольных соединений и снижения его при более высоких концентрациях (рис. 8). При использовании биосенсора *E. coli* JLD271/pAL101, который синтезирует люциферазу при наличии в среде экзогенного С4-HSL, не наблюдалось никакого увеличения люминесценции при добавлении этилацетатных экстрактов АГЛ (данные не показаны).

Полученные данные позволяют предположить, что увеличение функционирования LasI-LasR – системы *P. aeruginosa* за счет повышения синтеза АГЛ и стимуляция образования биопленок при действии низких концентраций фенольных соединений взаимосвязаны. Возможно, увеличение синтеза АГЛ и ведет к увеличению образования биопленок при действии фенольных соединений. Для проверки этого предположения необходимы дальнейшие исследования.

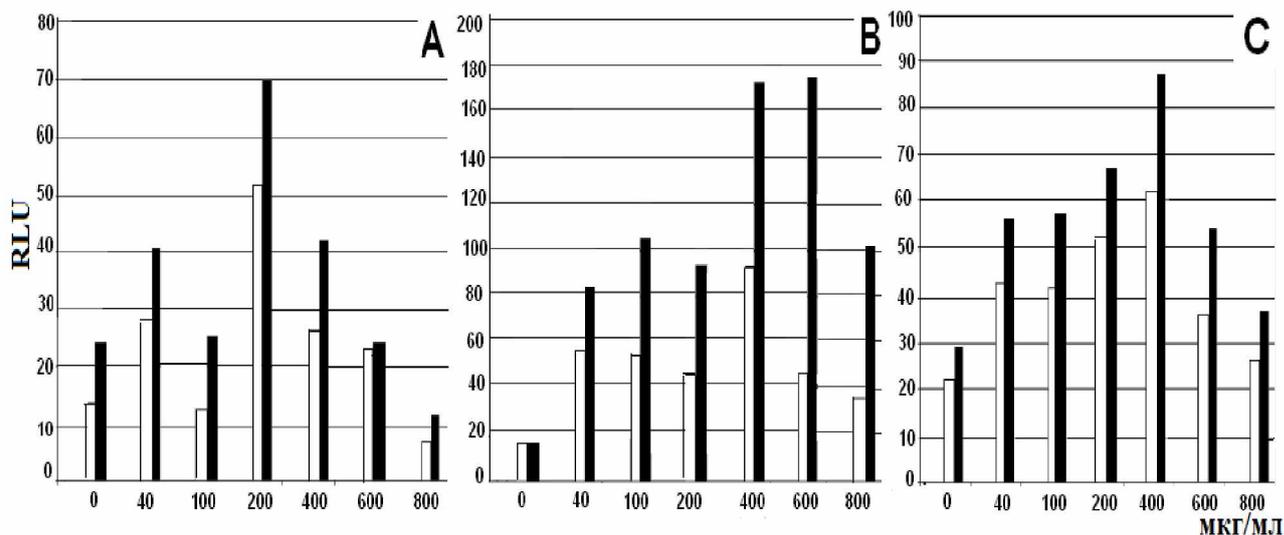


Рис. 8. Значения биолюминесценции биосенсорного штамма *E. coli* JLD271/pAL105 через 4 и 6 часов роста (белые и черные столбцы, соответственно) при добавлении этилацетатных экстрактов АГЛ, полученных из супернатантов культур *P. aeruginosa* PAO1, выращенных в присутствии 4-гидроксибензойной кислоты (А), галловой кислоты (В) и ванилина (С). По оси ординат: RLU – относительные световые единицы. По оси абсцисс – концентрация тестируемого вещества, при которой росла культура *P. aeruginosa* PAO1, мкг/мл.

4.1.3. Действие фенольных соединений на биосенсоры на основе штаммов *Escherichia coli*, используемых для определения N-ацил-гомосеринлактонов

Увеличение люминесценции биосенсором *E. coli* JLD271/pAL105 при низких концентрациях 4-гидроксибензойной, галловой кислоты или ванилина могло бы быть обусловлено способностью этих соединений имитировать АГЛ при взаимодействии с рецептором белком LasR. Это, в свою очередь, могло бы привести к увеличению транскрипции *lux* гена и, как следствие, к повышению люминесценции. Чтобы проверить эту возможность, было изучено непосредственное действие фенольных соединений на экспрессию *lux* генов АГЛ-биосенсоров.

При изучении действия растительных фенольных соединений (4-гидроксибензойной, галловой кислоты или ванилина) на биосенсоры, не было выявлено их специфического эффекта на экспрессию репортерного *lux*-оперона с промотора генов синтаз соответствующих АГЛ, так как люминесценция биосенсоров *E. coli* DH5 α , содержащих репортерные плазмиды pSB401 и pSB536, и *E. coli* JLD271, содержащих плазмиды pAL101, pAL102, pAL103, pAL104, pAL105 и pAL106, в присутствии различных концентраций данных веществ не изменялась (данные не приводятся). Эти соединения не вызывали синтеза пурпурно-фиолетового пигмента виолацеина в АГЛ-биосенсоре *S. violaceum* CV026, т. е. данные соединения не активировали QS систему биосенсора CV026. Также было показано, что исследованные вещества в присутствии АГЛ не ингибировали функционирование QS системы регуляции биосенсоров на основе *lux*-репортерных плазмид и биосенсора *S.*

violaceum CV026. Полученные результаты свидетельствуют о том, что данные соединения не могут замещать АГЛ и взаимодействовать с рецепторными белками LuxR типа.

4.1.4. Определение способности клеток *P. aeruginosa* PAO1 к миграции в присутствии различных концентраций фенольных соединений

Одним из свойств бактерий, важных для формирования биопленок, является их способность мигрировать по полутвердым поверхностям – сворминг (swarming, с английского «роение») [11; 161; 304]. Это одна из форм “социального” поведения бактерий, в регуляции которого участвует QS системы; сворминг играет существенную роль в распространении бактерий в природных условиях. QS регуляция сворминга, предположительно, обеспечивает оптимальное распространение бактериальных клеток, когда популяция становится слишком большой, чтобы обитать на небольшом пространстве в одной экологической нише [171; 225; 257; 304].

Сворминг – один из шести описанных в научной литературе способов транслокации (миграции) бактерий по поверхностям сред (включающих также swimming, gliding, twitching, darting и sliding), связанный с регуляцией плотности клеток в колонии и взаимодействием с поверхностью среды. Тип миграции также зависит от вязкости среды [171; 225; 304]. Миграцию бактерий по поверхностям сред разделяют на несколько различных типов. В среде с низкой вязкостью (обычно среда с 0,3 % агара) и в жидкой среде клетки *P. aeruginosa* и *A. tumefaciens*, демонстрируют свимминг миграцию (swimming), которая зависит от жгутиков [107; 171; 296]. На твердых и полутвердых поверхностях (на средах с 1 % и 0,5 % агара), клетки *P. aeruginosa* демонстрируют два типа движения, связанных с взаимодействием клеток с поверхностью среды – сворминг и твичинг (twitching) миграцию. Было показано, что эти два типа миграции необходимы для начального прикрепления клеток *P. aeruginosa* к поверхности и образования биопленок [107; 132; 255; 296]. Транслокация бактерий по поверхности среды, включая сворминг, свимминг и слайдинг, является одним из факторов вирулентности бактерий. Например, было показано, что процесс клеточной дифференциации при сворминге взаимосвязан с увеличением синтеза факторов вирулентности, таких как уреазы, протеазы, гемолизин [225; 304].

Стимулирующий эффект растительных фенолов на образование биопленки *P. aeruginosa* и *A. tumefaciens* может быть связан с их влиянием на способность клеток *P. aeruginosa* и *A. tumefaciens* к миграции. Ранее было показано, что некоторые антибиотики стимулируют свимминг и сворминг миграцию [200].

Однако в наших экспериментах мы не наблюдали увеличения диаметра зон сворминг (рис. 9), свимминг и твичинг миграции клеток *P. aeruginosa* PAO1 при концентрациях

фенольных соединений (4-гидроксibenзойной кислоты, галловой кислоты, ванилина) в пределах от 40 до 800 мкг/мл. У *A. tumefaciens* C58 не наблюдалось четких зон сворминг и свимминг миграции в этих условиях (данные не приводятся).

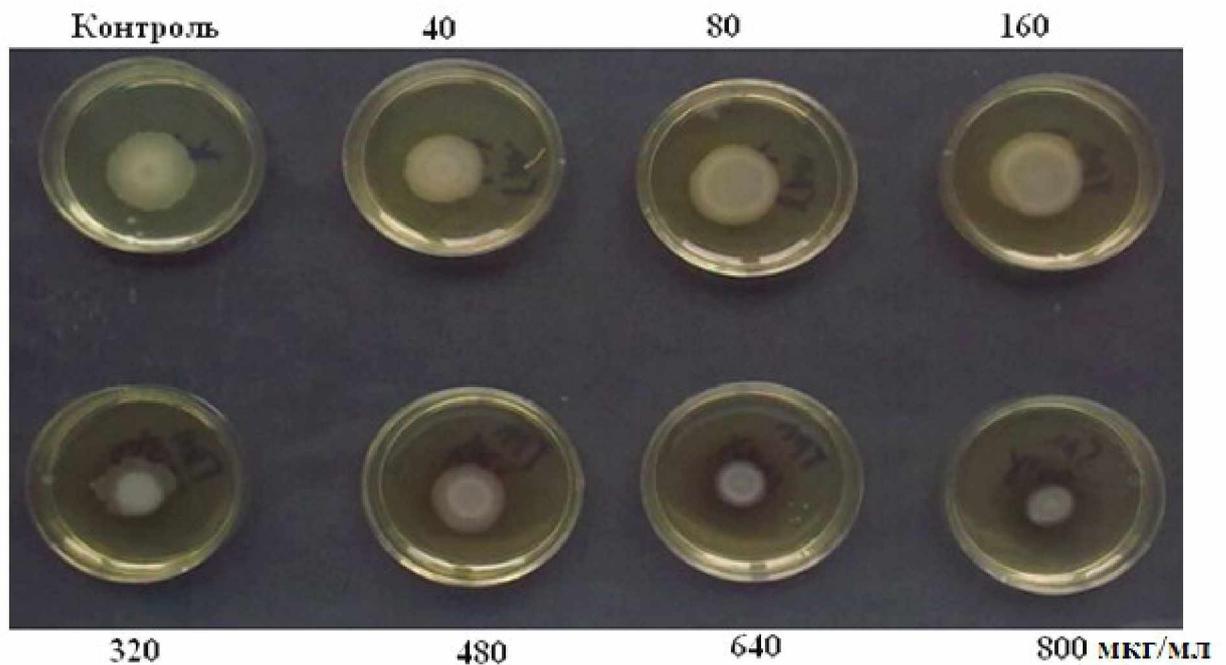


Рис. 9. Сворминг миграция клеток *P. aeruginosa* PAO1 по поверхности среды LA (0,5 % агара), содержащей различные концентрации галловой кислоты (мкг/мл); через 24 часа роста.

Таким образом, стимуляция образования биопленок при концентрациях тестируемых веществ, не подавляющих или слабо подавляющих рост бактерий, не была связана с увеличением способности клеток *P. aeruginosa* к сворминг, свимминг или твитчинг миграции. Диаметры зон миграции *P. aeruginosa* PAO1 становились меньше при высоких концентрациях фенольных соединений. Например, диаметры зон сворминг миграции *P. aeruginosa* PAO1 становились меньше на 12–30 % при наличии в питательной среде 400–800 мкг/мл 4-гидроксibenзойной кислоты, на 50–60 % при наличии таких же концентраций ванилина и на 20–50 % на питательной среде, содержащей 400–800 мкг/мл галловой кислоты (рис. 9). Зоны твитчинг и свимминг миграции становились меньше не более чем на 10–15 % при тех же концентрациях 4-гидроксibenзойной кислоты, ванилина и галловой кислоты (данные не показаны).

Таким образом, можно предположить, что снижение сворминг, твитчинг и свимминг миграции при высоких концентрациях тестируемых веществ могло играть определенную роль в снижении образования биопленок при этих условиях, в качестве дополнения к действию данных веществ на бактериальный рост.

4.2. Действие фитогормонов на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58

Общие свойства соединений, относящихся к фитогормонам, заключаются в том, что они проявляют свой эффект в исключительно малых концентрациях; кроме того они вырабатываются в одних частях растений и действуют на другие их части как регуляторы и координаторы роста и развития [331]. Фитогормоны обладают (в отличие от ферментов) обычно меньшей специфичностью действия на процессы роста и развития, что объясняется разным соотношением фитогормонов между собой, а также разным состоянием работы генов воспринимающих клеток, от которого зависит результат действия гормона [327].

Одной из основных функций салициловой кислоты является активация защитных сил растения в ответ на атаку различных патогенных микроорганизмов (грибов, бактерий, вирусов); она оказывает антимикробное действие. Салициловая кислота и ее производные широко применяются в медицине (аспирин и др.). Индолил-3-уксусная кислота (гетероауксин, широко применяющийся в растениеводстве) является важнейшим природным стимулятором роста растений. Гиббереллиновая кислота – гормон роста растений, стимулирующий деление клеток. Абсцизовая кислота также является регулятором роста растений; она тормозит их рост и развитие, играет важную роль в ответе растений на внешние воздействия [25; 88; 208; 331].

Было исследовано действие этих четырех фитогормонов (рис. 10) на способность *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58 формировать биопленки и на рост планктонных (т.е., неприкрепленных) клеток этих бактерий [25].



Рис. 10. Химические формулы тестируемых фитогормонов.

На рис. 11–14 приведены данные опытов по влиянию указанных растительных гормонов на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58.

Салициловая кислота при действии на *A. tumefaciens* C58 (см. рис. 11 а) практически не влияла на планктонный рост (т.е. на величину ОП₆₀₀ свободно плавающих, неприкрепленных клеток) до концентрации 50 мкг/мл; при дальнейшем повышении концентрации салициловой кислоты планктонный рост начинал снижаться. Биомасса образовавшихся биопленок, измеренная по степени связывания биопленками красителя кристаллического фиолетового, возрастала с увеличением концентрации салициловой кислоты (см. рис. 11 а) и достигала максимума (втрое большей величины по сравнению с контролем без салициловой кислоты) при концентрации фитогормона 100 мкг/мл. При дальнейшем увеличении концентрации салициловой кислоты образование биопленок снижалось (см. рис. 11 а); при 200 мкг/мл тестируемого соединения биомасса биопленок уменьшалась параллельно снижению содержания планктонных клеток.

Штамм *P. aeruginosa* PAO1 был более устойчив к действию салициловой кислоты. В ее присутствии формирование биопленок быстро интенсифицировалось (см. рис. 11 б), а при концентрации салициловой кислоты 1600 мкг/мл и биопленки, и планктонные клетки практически отсутствовали.

При изучении действия салициловой кислоты на способность клеток *P. aeruginosa* PAO1 к сворминг миграции при концентрациях в пределах от 40 до 800 мкг/мл наблюдались те же закономерности, что и в случаях действия ванилина, 4-гидроксibenзойной и галловой кислот (см раздел 4.1.4) – уменьшение диаметра зон сворминг миграции *P. aeruginosa* PAO1 с увеличением концентрации тестируемого вещества в питательной среде.

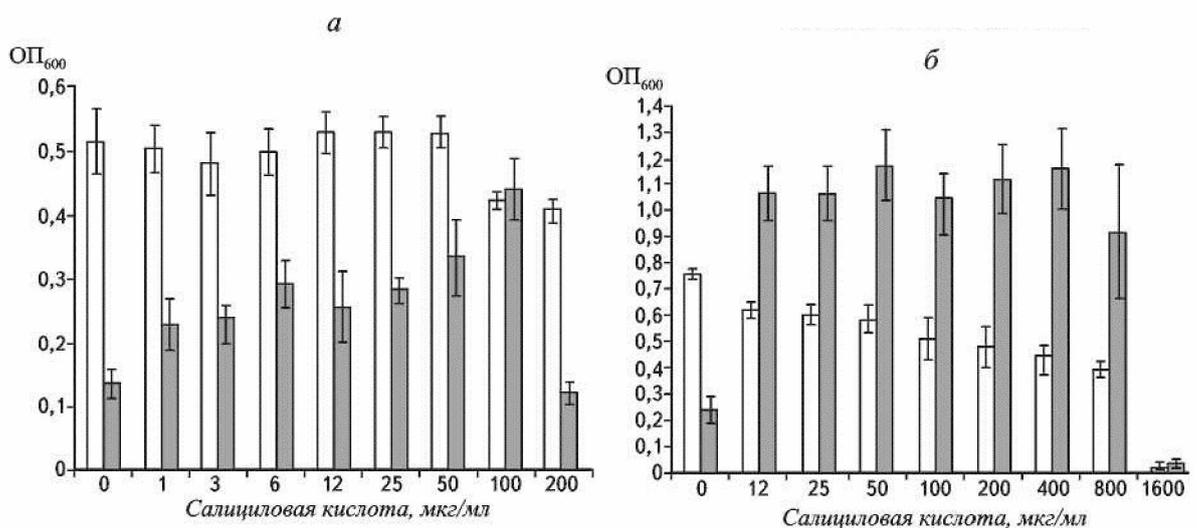


Рис. 11. Действие салициловой кислоты на формирование биопленок и планктонный рост *A. tumefaciens* C58 (а) и *P. aeruginosa* PAO1 (б). Белые столбцы – планктонный рост; темные столбцы – биопленки. По оси ординат: оптическая плотность (ОП) при $\lambda=600$ нм. По оси абсцисс – концентрация тестируемого вещества, мкг/мл.

При действии на бактерии индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) наблюдалась сходная закономерность (см. рис. 12). Планктонный рост *A. tumefaciens* C58 начинал снижаться при

концентрации ИУК 50–100 мкг/мл, при этом биомасса биопленок увеличивалась до максимума, в 2–2,5 раза превышающего их уровень в контрольной культуре без ИУК. При концентрации ИУК 400 мкг/мл образование биопленок *A. tumefaciens* C58 резко сокращалось (см. рис. 12 а). В случае *P. aeruginosa* PAO1 (рис. 12, б) при увеличении концентрации ИУК до 25 мкг/мл наблюдалось стимулирование образования биопленок (в 2 раза по сравнению с контролем); параллельно снижался рост планктонных клеток (ОП₆₀₀) на 30–50 %. Дальнейшее увеличение концентрации ИУК в среде приводило к снижению обоих показателей, а при 800 мкг/мл ИУК рост планктонных клеток и образование биопленок практически отсутствовали (см. рис. 12 б).

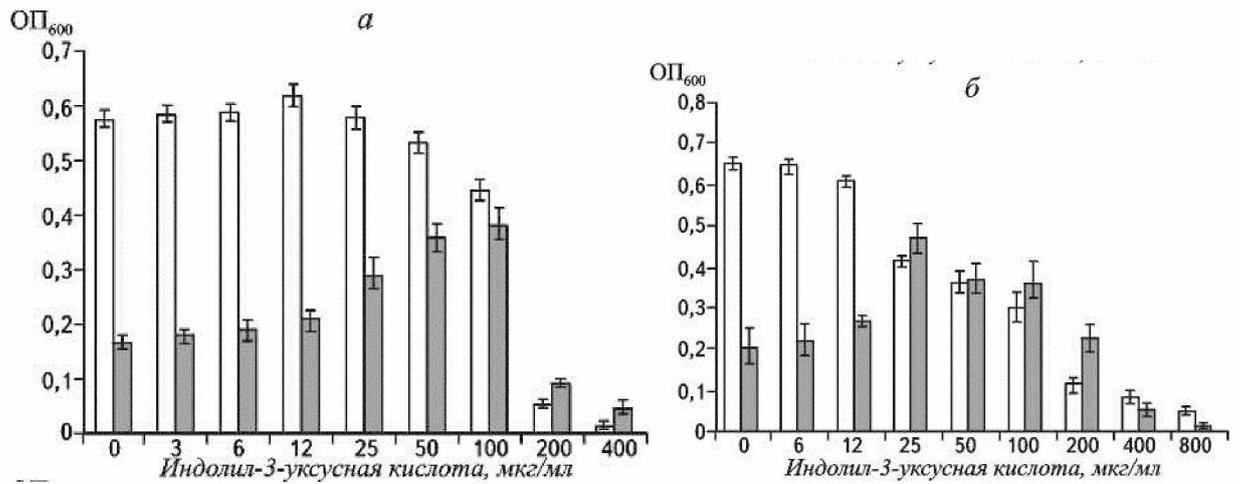


Рис. 12. Действие индолил-3-уксусной кислоты на формирование биопленок и планктонный рост *A. tumefaciens* C58 (а) и *P. aeruginosa* PAO1 (б). Обозначения те же, что на рис. 11.

Абсцизовая кислота в субингибиторных концентрациях также стимулировала образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и *P. aeruginosa* PAO1 (см. рис. 13 а, б) до 2,5 раз и 1,7–2 раза, соответственно. При увеличении концентрации абсцизовой кислоты свыше 200 мкг/мл уровень биопленок снижался (данные не приведены).

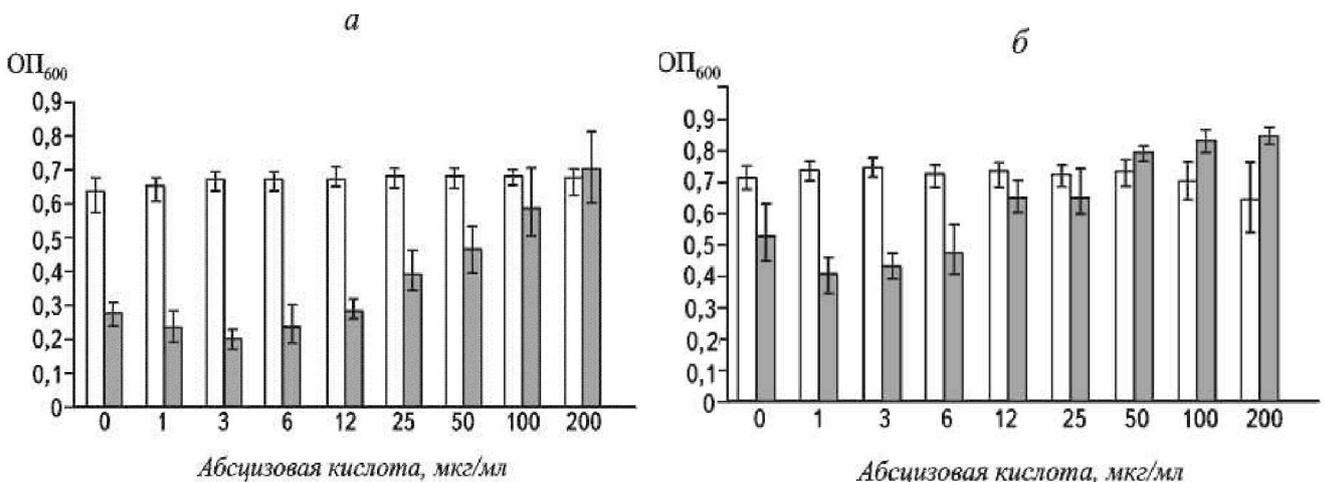


Рис. 13. Действие абсцизовой кислоты на формирование биопленок и планктонный рост *A. tumefaciens* C58 (а) и *P. aeruginosa* PAO1 (б). Обозначения те же, что на рис. 11.

Гиббереллиновая кислота стимулировала формирование биопленок *A. tumefaciens* C58 при повышении ее концентрации в среде до 50–100 мкг/мл (в 2,3 раза); дальнейшее повышение ее концентрации приводило к уменьшению накопления и биопленок, и планктонных клеток (см. рис. 14 а). В случае *P. aeruginosa* PAO1 наблюдалась стимуляция формирования биопленок (в 3 раза) при увеличении концентрации гиббереллиновой кислоты до 200 мкг/мл; планктонный рост при этом снижался (см. рис. 14 б). При более высоких концентрациях гиббереллиновой кислоты в среде образование биопленок и рост планктонных клеток резко уменьшались (данные не приведены).

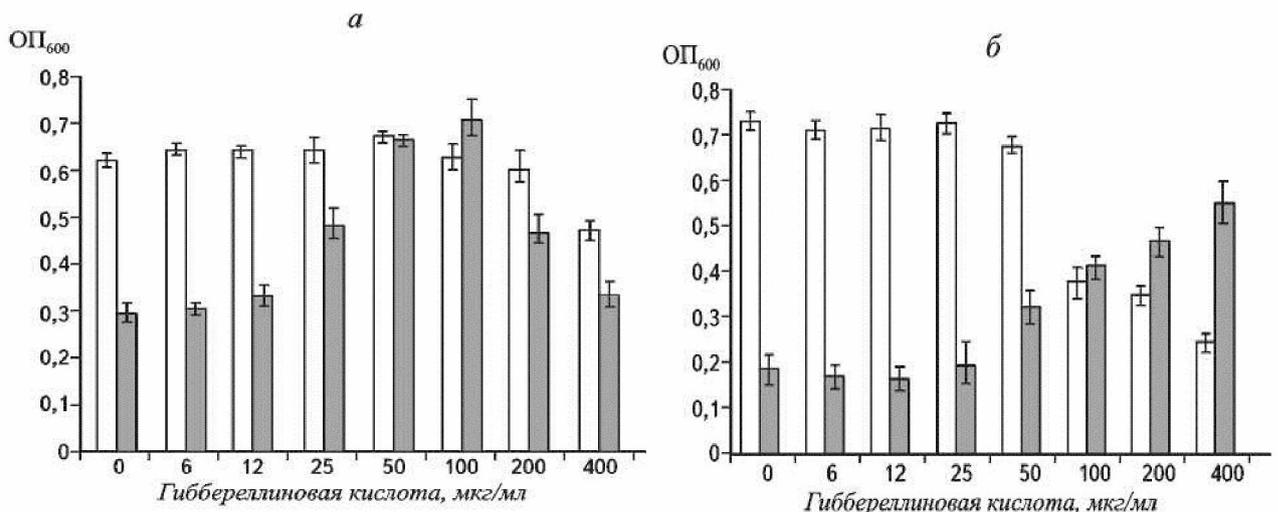


Рис. 14. Действие гиббереллиновой кислоты на формирование биопленок и планктонный рост *A. tumefaciens* C58 (а) и *P. aeruginosa* PAO1 (б). Обозначения те же, что на рис. 11.

Таким образом, мы наблюдали двойной эффект действия на бактерии исследованных соединений: в субингибиторных или слабо подавляющих рост планктонных клеток концентрациях эти вещества стимулировали формирование биопленок, а при более высоких концентрациях ингибировали его.

Полученные нами данные о том, что такой широко используемый в медицине агент, как салициловая кислота, а также другие фитогормоны в субингибиторных концентрациях повышают образование биопленок у *A. tumefaciens* и *P. aeruginosa* и ингибируют его при более высоких концентрациях, важны для медицины (в случае салициловой кислоты) и демонстрируют еще одну особенность взаимоотношений растений и бактерий.

4.3. Действие пероксида водорода и параквата на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58

4.3.1. Образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58 в присутствии пероксида водорода и параквата

На данный момент механизм стимуляции (индукции) образования биопленок при действии фенольных соединений не ясен. Можно было предположить, что он обусловлен общим свойством исследуемых фенольных соединений – их антиоксидантной активностью.

Чтобы проверить это предположение в данной части работе исследовалось влияние окислителей пероксида водорода (H_2O_2) и параквата на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58.

На рис. 15–16 приведены данные опытов по влиянию указанных окислителей на формирование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58. Можно видеть, что в диапазоне увеличения концентрации H_2O_2 от 300 до 1500 мкг/мл происходила стимуляция образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 до 2,5 раз (при 1500 мкг/мл) по сравнению с контролем (без H_2O_2). При этом величина планктонного роста не изменялась до 750 мкг/мл H_2O_2 и уменьшалась ~ в 2,5 раза при 1500 мкг/мл H_2O_2 (рис. 15 А). При дальнейшем повышении концентрации H_2O_2 биомасса образованных биопленок и планктонных клеток резко снижались.

При действии параквата в концентрациях 12–25 мкг/мл не наблюдалось сколько-нибудь заметного увеличения образования биопленок. Образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 снижалось при концентрации параквата 100–800 мкг/мл (Рис. 16 А). До концентрации параквата 25–50 мкг/мл планктонный рост *P. aeruginosa* PAO1 оставался практически неизменным, при более высоких концентрациях уменьшался и резко снижался при концентрации 800 мкг/мл (Рис. 16 А).

Снижение планктонного роста *A. tumefaciens* C58 наблюдалось, начиная с концентрации пероксида водорода 30–40 мкг/мл; при концентрации 75 мкг/мл планктонный рост практически отсутствовал (Рис. 15 В). До концентрации пероксида водорода 20 мкг/мл уровень биопленок *A. tumefaciens* C58 оставался практически неизменным, при более высоких концентрациях уменьшался, и при концентрации 75 мкг/мл биопленки практически отсутствовали (Рис. 15 В). Таким образом, планктонные клетки и биопленки *A. tumefaciens* C58 были существенно более чувствительными к действию пероксида водорода, чем клетки *P. aeruginosa* PAO1. Стимуляции образования биопленок *A. tumefaciens* C58 при субингибиторных концентрациях пероксида водорода не происходило.

До концентрации параквата 100 мкг/мл увеличение образования биопленок *A. tumefaciens* C58 не наблюдалось, а планктонный рост оставался практически неизменным (Рис. 16 В).

Таким образом, исследуя действие на бактерии двух окислителей, пероксида водорода и параквата, мы наблюдали стимуляцию образования биопленок при не подавляющих или слабо подавляющих рост концентрациях только у *P. aeruginosa* PAO1 и только в случае пероксида водорода. Какие механизмы ответственны за эти различия, в настоящее время неясно.

Эти данные показывают, что механизм стимуляции, по-видимому, не связан с антиоксидантной активностью.

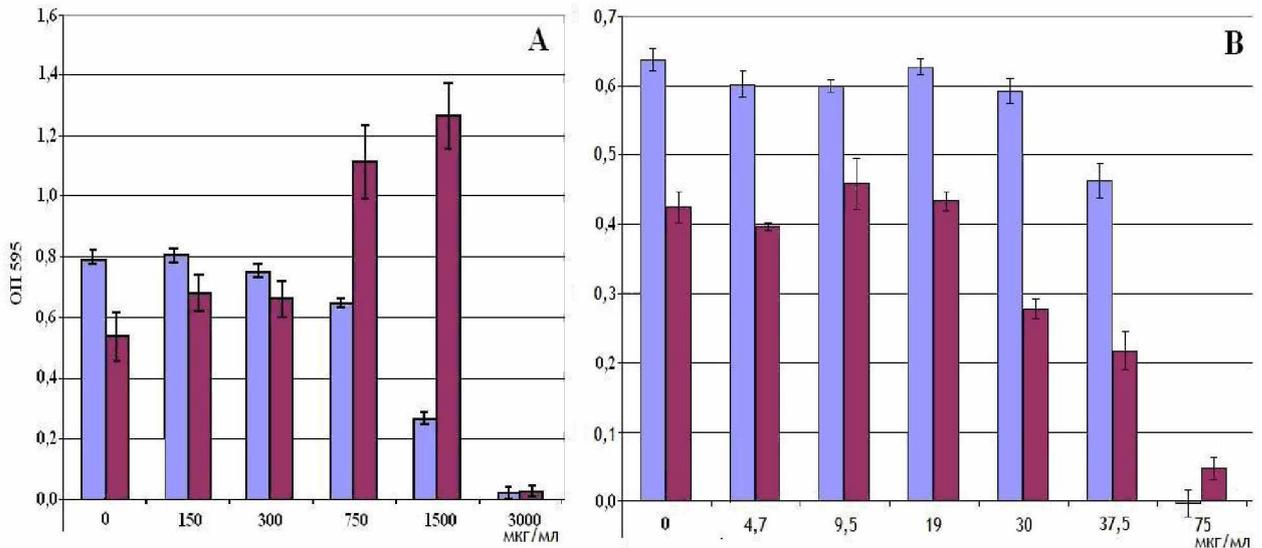


Рис. 15. Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост: А - *P. aeruginosa* PAO1; В – *A. tumefaciens* C58. Биопленки – коричневые столбцы, планктонный рост – синие столбцы. По оси ординат: оптическая плотность при $\lambda=595$ нм (OP₅₉₅). По оси абсцисс – концентрация пероксида водорода, мкг/мл.

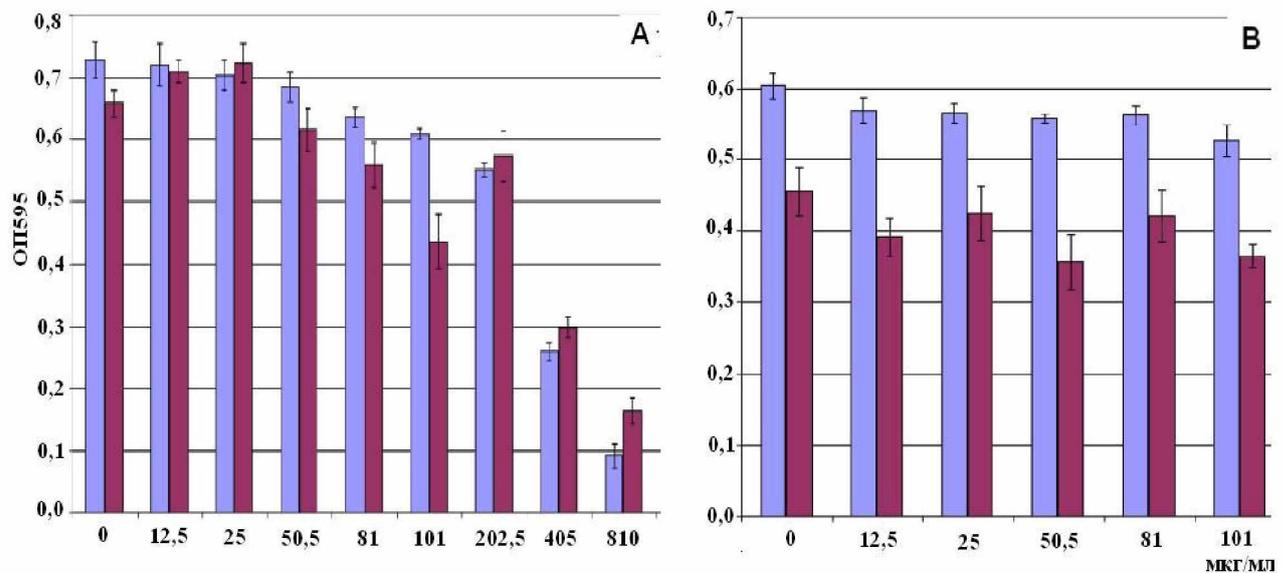


Рис. 16. Влияние параквата на образование биопленок и планктонный рост: А – *P. aeruginosa* PAO1; В – *A. tumefaciens* C58. Обозначения те же, что на рис. 15.

4.3.2. Влияние гена *aiiA*, кодирующего гомосеринлактоназу, на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1

Как уже отмечалось, в регуляции формирования биопленок многих бактерий участвуют QS системы, использующие АГЛ в качестве сигнальных молекул, например, они необходимы для формирования зрелых, дифференцированных биопленок *P. aeruginosa* [93; 107; 145; 314].

Перспективным подходом для изучения роли QS систем в регуляции клеточных процессов является использование ферментов, разрушающих АГЛ – N-ацил-гомосеринлактоназ (АГЛ-лактоназ) и ацилаз [197; 253; 328]. Были получены данные о том, что введение в клетки *P. aeruginosa* PAO1 плазмиды, содержащей клонированный ген АГЛ-лактоназы *aiiA*, сильно снижало содержание АГЛ и уменьшало продукцию некоторых факторов вирулентности (эластазы, рамнолипидов, пиоцианина, цианида и др.) [197; 220; 255].

Использование генов, кодирующих ферменты деградации АГЛ, представляется особенно целесообразным в случаях, когда бактерия синтезирует несколько АГЛ и содержит более чем одну систему QS регуляции, т.к. различные АГЛ могут частично заменять друг друга при взаимодействии с рецепторными белками. Подобный подход был использован только для нескольких бактерий. Многие вопросы, связанные с действием АГЛ-лактоназ в клетках, остаются недостаточно изученными, в частности действие на образование биопленок.

Поэтому представляло интерес проверить, зависит ли эффект стимуляции образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 при действии H_2O_2 от QS систем, использующих АГЛ в качестве сигнальных молекул. С этой целью исследовалось влияние введения гетерологичного гена АГЛ-лактоназы *aiiA* в клетки *P. aeruginosa* PAO1 на образование биопленок при действии H_2O_2 .

С помощью конъюгации в клетки *P. aeruginosa* PAO1 были введены плазмиды pME6863 (несет ген *aiiA*) и векторная плаزمида pME6000 (см. Таблица 2). Селекцию трансконъюгантов проводили на среде с ампициллином (200 мкг/мл) и 200 мкг/мл тетрациклин гидрохлорида. Такая высокая концентрация тетрациклин гидрохлорида была использована потому, что клетки PAO1 исходно были устойчивы к этому антибиотику; введение плазмид, содержавших ген устойчивости к тетрациклину, повышало общую устойчивость трансконъюгантов до уровня более высокого, чем суммарная резистентность штамма донора (*E. coli* S17-1 / pME6863 или *E. coli* S17-1 / pME6000 – см. Таблица 2) и штамма реципиента (*P. aeruginosa* PAO1). Присутствие гена *aiiA* в клетках PAO1 было

подтверждено с помощью ПЦР (см. рис. 17), с использованием специфических праймеров для этого гена (подобраны по последовательности гена *aiiA*, AF397400; последовательности праймеров приведены в таблице 3).

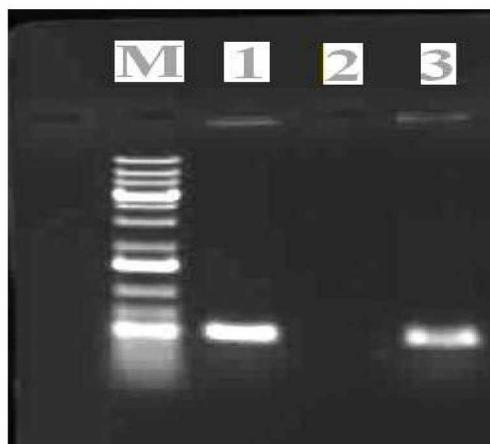


Рис. 17. Гель-электрофорез ПЦР-продукта гена *aiiA* с АПА-F и АПА-R праймерами.
1-матрица – *E. coli* S17-1 / pME6863;
2-матрица – *P. aeruginosa* PAO1;
3-матрица – *P. aeruginosa* PAO1 / pME6863;
М – маркер 1kb (Fermentas).

Полученные штаммы с соответствующими плазмидами были проверены на синтез АГЛ. При анализе на чашках с биосенсором *C. violaceum* CV026 клетки *P. aeruginosa* PAO1, несущие плазмиду pME6863, не обнаруживали синтеза АГЛ, в то время как клетки с векторной плазмидой pME6000 активно синтезировали АГЛ (рис. 18). Эти данные показывают, что экспрессия гена АГЛ-лактоназы приводила к деградации синтезируемого клетками С4-HSL. При использовании сенсора *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 в случае клеток *P. aeruginosa* PAO1 с плазмидой pME6863 мы наблюдали небольшую продукцию АГЛ, т.е. некоторое количество основной сигнальной молекулы QS системы *P. aeruginosa* PAO1 3-охо-С12-HSL в культуре присутствовало (данные не приводятся), что согласуется с результатами полученными ранее в работах Molina L. et all и Reimmann C. et all [220; 255].

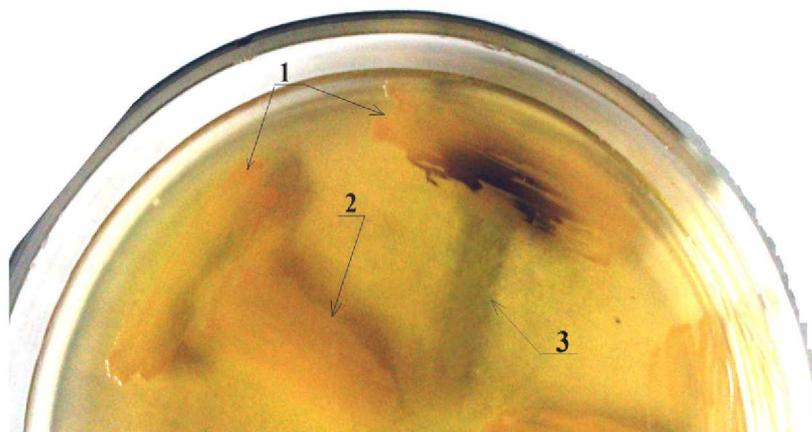


Рис. 18. Определение синтеза АГЛ с использованием биосенсора *C. violaceum* CVO26.
1 – *C. violaceum* CVO26; 2 – *P. aeruginosa* PAO1 / pME6863; 3 – *P. aeruginosa* PAO1.

Эксперименты по изучению действия H_2O_2 на штаммы *P. aeruginosa* PAO1 с указанными плазмидами проводились на среде LB без тетрациклин гидрохлорида, т.е. в тех же условиях, что и для исходного штамма PAO1. Предварительно было проверено, что плазмиды pME6863 и pME6000 стабильно сохранялись в клетках на этой среде, по крайней мере, в течение двух суток роста.

При действии H_2O_2 на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 / pME6000 наблюдалась та же закономерность, что и в случае исходного штамма *P. aeruginosa* PAO1, т.е. формирование биопленок стимулировалось (до 2,3 раза) в условиях, когда происходило некоторое снижение планктонного роста по сравнению с контролем (рис. 19 и 20).

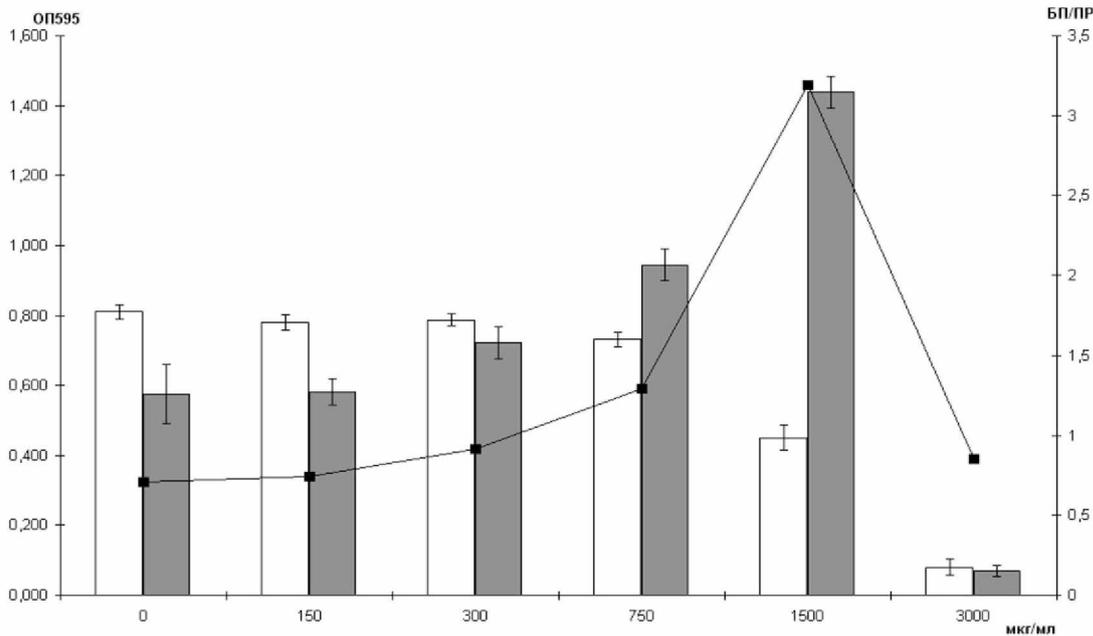


Рис. 19. Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост *P. aeruginosa* PAO1. Биопленки – темные столбцы, планктонный рост – светлые столбцы. Кривая показывает отношение биомассы биопленок к планктонному росту (БП/ПР). По осям ординат: слева – оптическая плотность при $\lambda=595$ нм (ОП₅₉₅), справа – отношение биомассы биопленочных и планктонных бактерий (БП/ПР). По оси абсцисс – концентрация пероксида водорода, мкг/мл.

Однако когда было исследовано действие H_2O_2 на образование биопленок штаммом PAO1, содержащим плазмиду pME6863, мы не наблюдали этого эффекта (рис. 21). Эти данные показывают, что эффект стимуляции формирования биопленок при действии концентраций H_2O_2 , слабо влияющих на планктонный рост, зависел от функционирования QS систем PAO1, использующих АГЛ в качестве сигнальных молекул. Следует отметить при этом, что в случае штаммов *P. aeruginosa* PAO1, содержащих и не содержащих ген *aiaA*, отношение биомассы образованных биопленок к планктонному росту увеличивалось в интервале от 250 до 750 и от 125 до 375 – 500 мкг/мл H_2O_2 соответственно, т.е. процесс

образования биопленок был менее чувствителен к действию H_2O_2 , чем планктонный рост, в обоих штаммах (рис. 19–21).

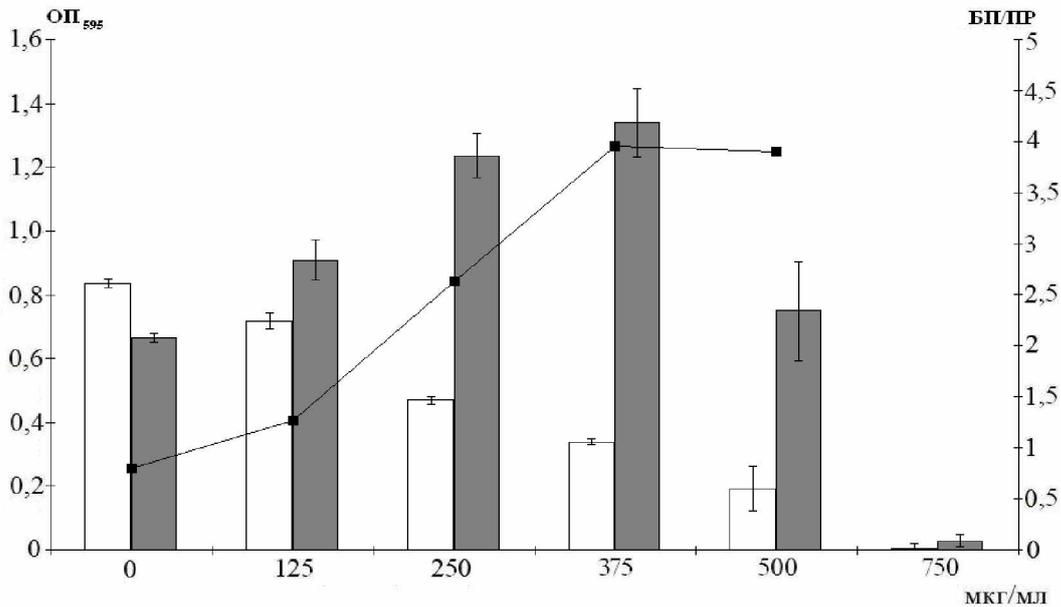


Рис. 20. Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост *P. aeruginosa* PAO1 / pME6000. Обозначения те же, что на рис. 19.

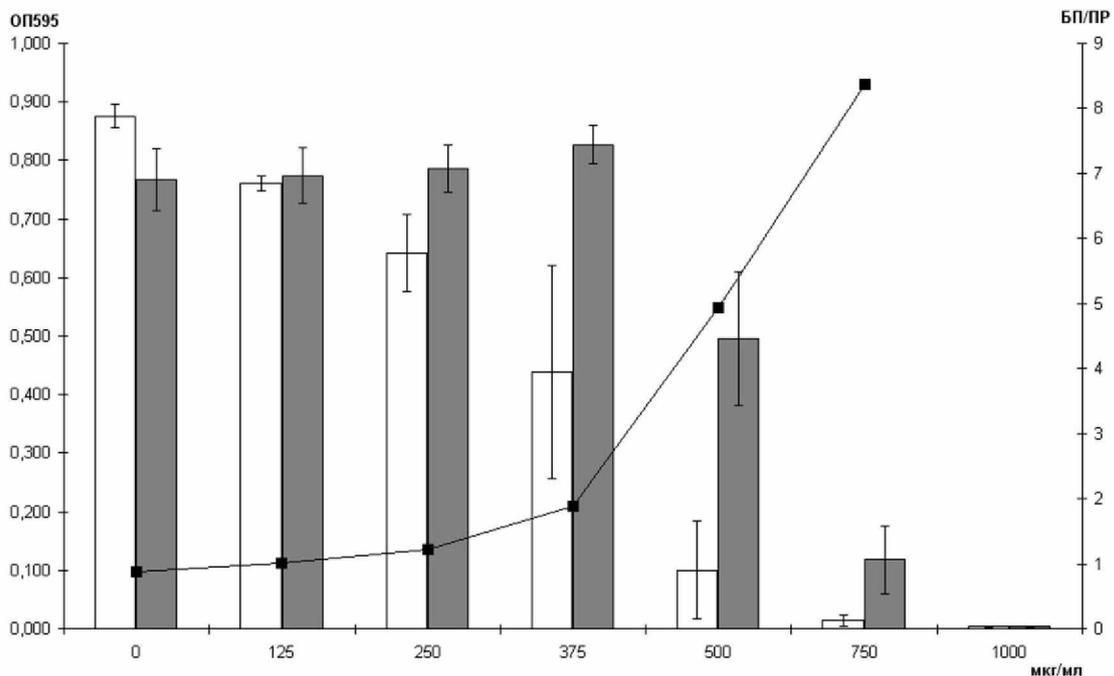


Рис. 21. Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост *P. aeruginosa* PAO1 / pME6863. Обозначения те же, что на рис. 19.

Неожиданным для нас было наблюдение, что штамм *P. aeruginosa* PAO1 / pME6863, в котором было подавлено функционирование Las- и Rhl- QS систем вследствие деградации АГЛ АГЛ-лактоназой, демонстрировал увеличение уровня биопленок в контроле без H_2O_2

по сравнению с уровнем биопленок в изогенном штамме, несущем векторную плазмиду рМЕ6000. В 7 из 8 проведенных экспериментов, в которых сравнение биопленок в этих штаммах проводилось в одном и том же опыте, это увеличение варьировалось от 1,5 до 3 раз (рис. 22). В одном опыте уровень биопленок в этих двух штаммах был практически одинаковым. В настоящее время мы не можем объяснить, почему снижение содержания АГЛ в культуре не вызывало снижения формирования биопленок, что казалось логичным. Было отмечено, что взаимоотношения Las- и Rhl- QS систем могут быть сложными [102; 162; 314]. Не исключено, что отсутствие C4-HSL при наличии некоторого количества не деградировавшего полностью 3-охо-C12-HSL приводит к отсутствию репрессивного действия Rhl- системы на какой-то из многих процессов, ведущих к формированию биопленок. В работе Reimmann C. et all было показано, что введение в клетки *P. aeruginosa* PAO1 плазмиды, содержащей клонированный ген *aiiA*, не влияло на адгезию клеток к абиотической (поливинилхлорид) поверхности, которая является первым этапом образования биопленок [255].

Таким образом, согласно нашим данным, стимуляция образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 наблюдалась только при действии H_2O_2 и функционировании QS систем, но не в условиях подавления QS систем регуляции.

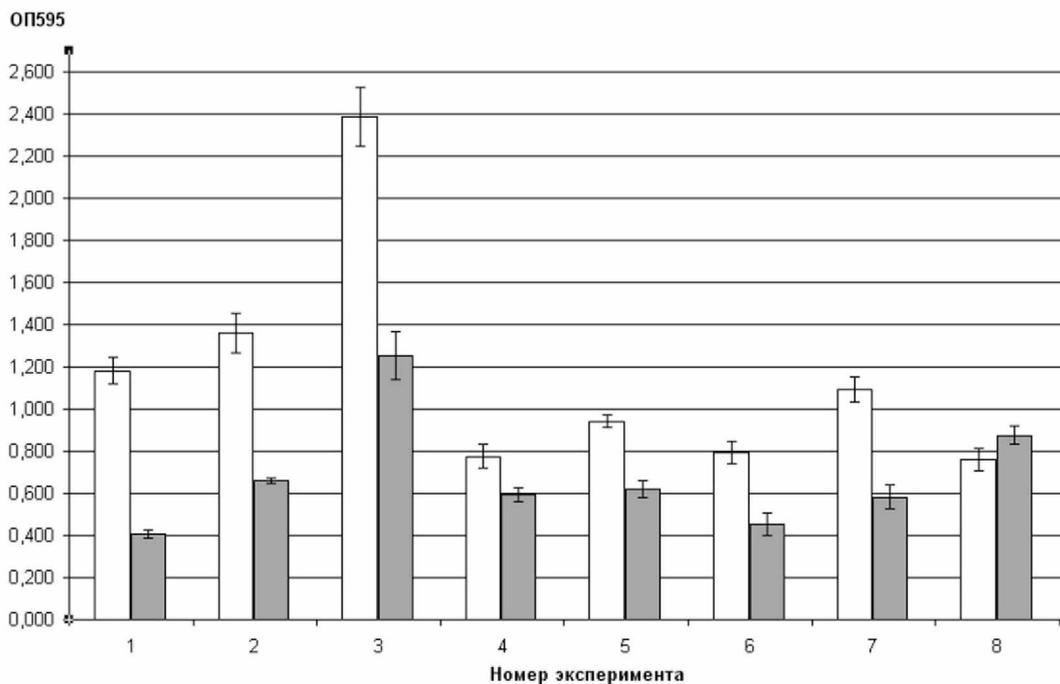


Рис. 22. Сравнение уровней образования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 / pME6863 (светлые столбцы) и *P. aeruginosa* PAO1 / pME6000 (темные столбцы).

4.4. Действие пероксида водорода на формирование биопленок *Burkholderia cenocepacia* 370

Еще одним модельным объектом для изучения влияния пероксида водорода на образование биопленок была бактерия *Burkholderia cenocepacia* 370. Бактерии комплекса *Burkholderia cepacia* широко распространены в природе, они обитают в различных экологических нишах – их выделяют из почвы, воды, ризосферы растений и др. Некоторые штаммы этого комплекса, в том числе, *B. cenocepacia*, вызывают внутрибольничные инфекции, главным образом, у людей, больных муковисцидозом (кистозным фиброзом), хроническим гранулематозом и у пациентов со сниженным иммунитетом. Бактерии *B. cenocepacia* содержат две QS системы регуляции (CepI/CepR, CsiI/CsiR), которые используют АГЛ в качестве сигнальных молекул и участвуют в контроле вирулентности. Было показано, что в большинстве случаев при легочных инфекциях больных муковисцидозом бактерии комплекса *B. cepacia* участвуют в инфекционном процессе вместе с *P. aeruginosa*. Бактерии комплекса *B. cepacia* синтезируют мало АГЛ, обычно это N-октаноил-гомосеринлактон (C8-HSL) и в значительно меньшем количестве N-гексаноил-гомосеринлактон (C6-HSL), *P. aeruginosa* синтезирует намного больше АГЛ. Добавление к *B. cepacia* очищенной от клеток среды, на которой росла до высокой плотности популяции культура *P. aeruginosa*, приводило к увеличению синтеза факторов патогенности – 2-кратному увеличению синтеза протеаз и 7-кратному сидерофоров. Т.е., *B. cepacia* может использовать АГЛ, синтезированные *P. aeruginosa* [6; 32; 35; 53; 118; 192; 257; 324].

Штамм *B. cenocepacia* 370 является клиническим изолятом; он идентифицирован в Государственном научном центре по антибиотикам и НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН. Штамм обнаруживал потенциальные факторы патогенности: гемолитическую, внеклеточную протеазную и липазную активности, а также хитинолитическую активность, но был слабо вирулентен при испытаниях на мышах [6].

При действии H_2O_2 на образование биопленок *B. cenocepacia* 370 наблюдалась та же закономерность, что и в случае штамма *P. aeruginosa* PAO1, т.е. формирование биопленок стимулировалось в условиях, когда происходило некоторое снижение планктонного роста по сравнению с контролем. При этом наблюдаемые значения уровней формирования биопленок *B. cenocepacia* 370 были существенно ниже по сравнению с аналогичными значениями для *P. aeruginosa* PAO1.

На рис. 23 приведены данные опыта по влиянию H_2O_2 на формирование биопленок *B. cenocepacia* 370. Можно видеть, что уровень образования биопленок повышается до 10 раз при увеличении концентрации пероксида водорода до 20 мкг/мл. Планктонный рост с

увеличением концентрации H_2O_2 постепенно снижается; наивысший уровень биомассы биопленок наблюдается при снижении показателя роста планктонных клеток (значения OP_{595}) приблизительно вдвое по сравнению с контролем. При увеличении концентрации до 60 мкг/мл происходит резкое снижение обоих показателей, фактически до нуля.

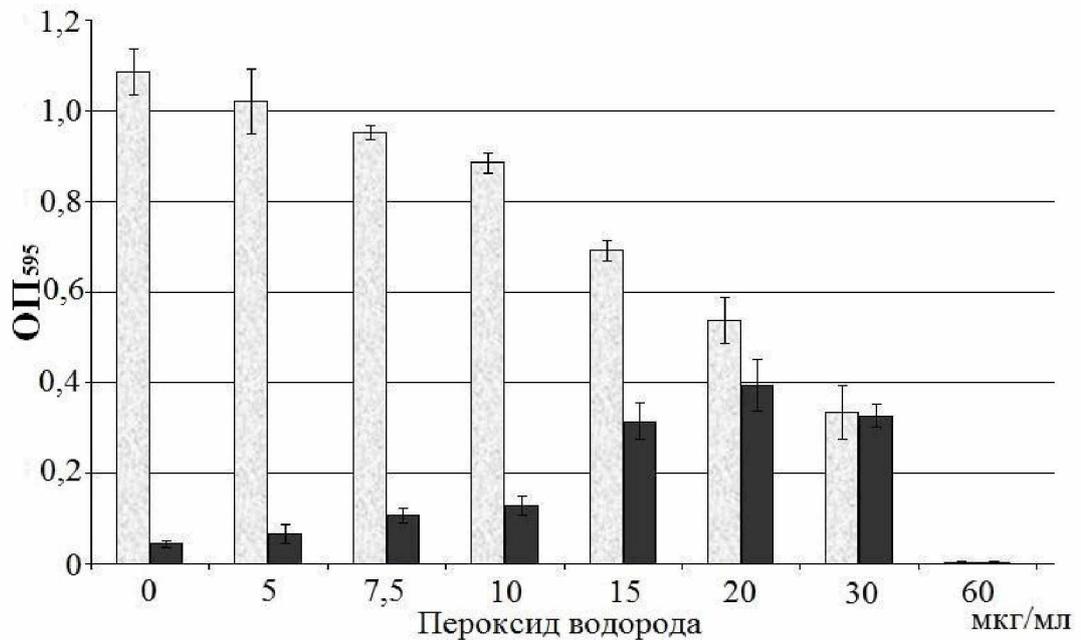


Рис. 23. Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост *B. ceposerasia* 370. Биопленки – темные столбцы, планктонный рост – светлые столбцы. По оси ординат: оптическая плотность при $\lambda=595$ нм (OP_{595}). По оси абсцисс – концентрация пероксида водорода, мкг/мл.

Как и в случае *P. aeruginosa* PAO1, исследовалось влияние введения гетерологичного гена АГЛ-лактоназы *aiiA* в клетки *B. ceposerasia* 370 на образование биопленок при действии H_2O_2 . При введении в клетки *B. ceposerasia* 370 конъюгацией плазида рМЕ6863, содержащей этот ген, мы столкнулись с трудностями, т.к. селекцию трансконъюгантов нужно было проводить на среде с тетрациклин гидрохлоридом, а штамм-реципиент оказался высоко резистентным к антибиотику – до концентрации 300 мкг/мл. В конечном итоге нам удалось подобрать концентрацию тетрациклин гидрохлорида для селекции трансконъюгантов – от 600 до 900 мкг/мл. В среду при селекции клеток, получивших плазмиду рМЕ6863, добавляли также ампициллин 200 мкг/мл для контрселекции штамма донора (*E. coli* S17-1/ рМЕ6863 – см. Таблица 2).

Присутствие гена *aiiA* в клетках *B. ceposerasia* 370 было подтверждено с помощью ПЦР (см. рис. 24).

Полученный штамм *B. ceposerasia* 370 с плазмидой рМЕ6863 был проверен на синтез АГЛ. При анализе на чашках с биосенсором *C. violaceum* CV026, способным узнавать С8-

HSL и C6-HSL, синтезируемые *B. ceposerasia* 370, штамм, несущий плазмиду pME6863, не обнаруживал синтеза АГЛ, в то время как клетки исходного штамма *B. ceposerasia* 370 синтезировали АГЛ (рис. 25). Эти данные показывают, что экспрессия гена АГЛ-лактоназы приводила к деградации синтезируемого клетками C8-HSL и C6-HSL. Продукция АГЛ штаммом *B. ceposerasia* 370 была очень невелика, что соответствует литературным данным о синтезе АГЛ клетками бактерий комплекса *B. serasia* [6].

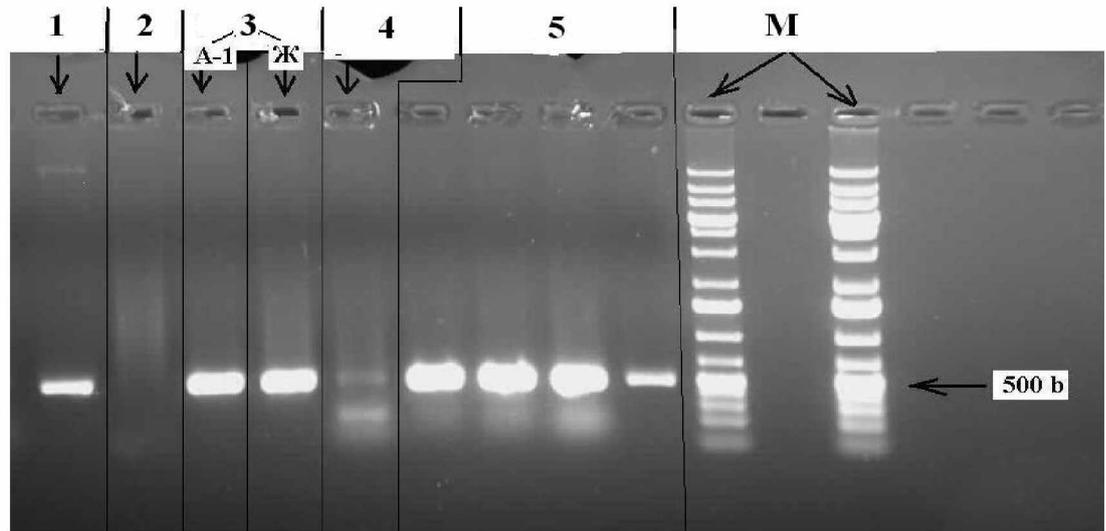


Рис. 24. Гель-электрофорез ПЦР-продукта гена *aiiA* с АПА-F и АПА-R праймерами. 1-матрица – плазида pME6863; 2-матрица – *B. ceposerasia* 370; 3-матрица – *B. ceposerasia* 370 / pME6863 (вариант А-1 и Ж); 4-матрица – *E. coli* S17-1 / pME6000; 5-матрица – *E. coli* S17-1 / pME6863; М-маркер 1kb (Fermentas).

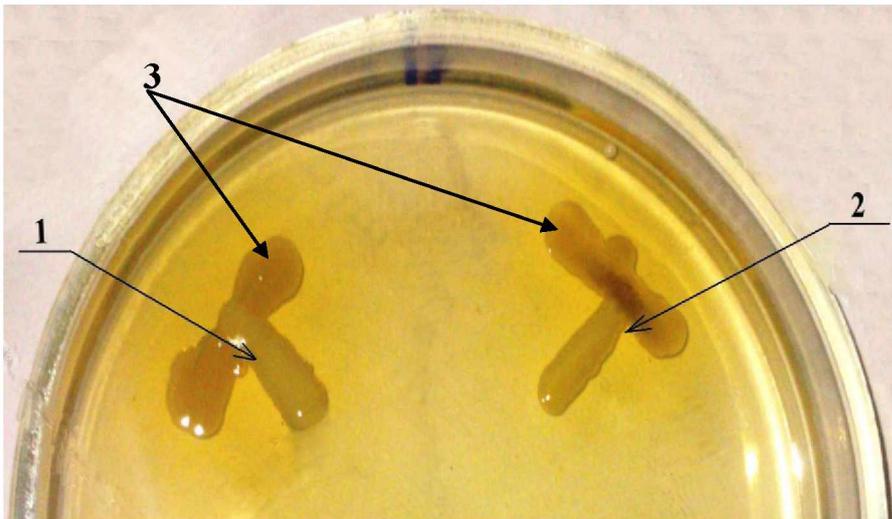


Рис. 25. Определение синтеза АГЛ с помощью биосенсора *C. violaceum* CVO26.

1 – *B. ceposerasia* 370 / pME6863;
2 – *B. ceposerasia* 370;
3 – *C. violaceum* CVO26.

При использовании сенсора *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 в случае клеток *B. ceposerasia* 370 с плазмидой pME6863 мы наблюдали уменьшение продукции АГЛ по сравнению с исходным штаммом (рис. 26), т.е. основная сигнальная молекула QS системы *B. ceposerasia* 370 C8-HSL в культуре присутствовала, хотя количество её было снижено. Согласно расчету, проведенному с помощью программы TotalLab, площадь окрашивания (гидролиза X-gal)

вокруг лунок в агаризованной среде (содержат культуры тестируемых штаммов) была приблизительно в 1,5–2 раза ниже в случае штамма *B. cepose* 370 / pME6863 (клон 1 и 2, см. рис. 26) по сравнению с исходным штаммом *B. cepose* 370.

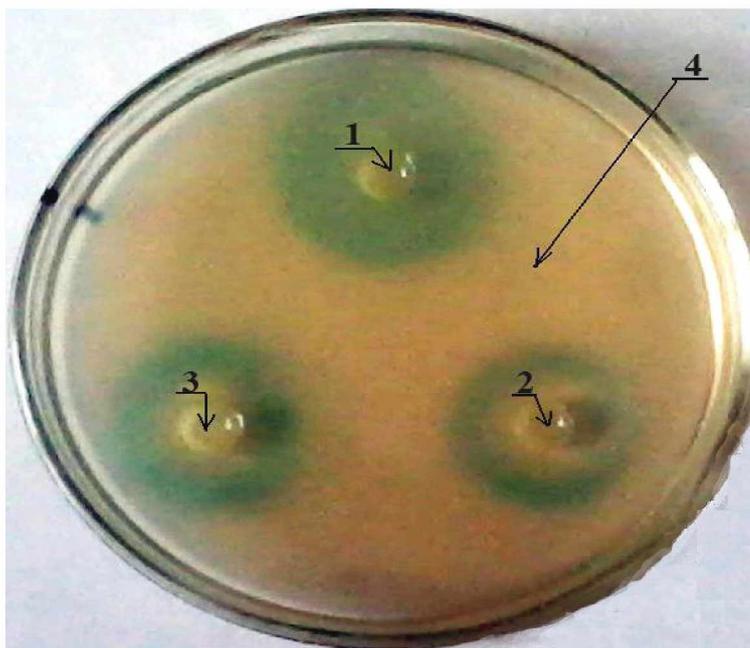


Рис. 26. Определение синтеза АГЛ с помощью биосенсора *A. tumefaciens* NT1/pZLR4. 1 – лунка с культурой *B. cepose* 370; 2 – лунка с культурой *B. cepose* 370 / pME6863 клон 1; 3 – лунка с культурой *B. cepose* 370 / pME6863 клон 2; 4 – *A. tumefaciens* NT1/pZLR4.

Однако когда было исследовано действие H_2O_2 на образование биопленок штаммом *B. cepose* 370, содержащим плазмиду pME6863, мы наблюдали ту же закономерность, что и в случае исходного штамма *B. cepose* 370, т.е. формирование биопленок также стимулировалось в условиях субингибиторных концентраций пероксида водорода, когда происходило некоторое снижение планктонного роста по сравнению с контролем (см. рис. 27).

Таким образом, в отличие от данных, полученных с *P. aeruginosa* PAO1 / pME6863, присутствие в клетках *B. cepose* 370 гена гомосеринлактоназы AiiA не снимало полностью эффекта стимуляции образования биопленок при действии низких концентраций H_2O_2 , хотя при этом и уменьшало эффект стимуляции.

При этом по данным, полученным сотрудниками Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН, присутствие этой плазмиды приводило к снижению гемолитической, внеклеточной протеазной активностей и сворнинг миграции клеток *B. cepose* 370, что свидетельствовало о связи регуляции этих клеточных процессов с QS системами *B. cepose* 370, функционирующими с участием АГЛ сигнальных молекул.

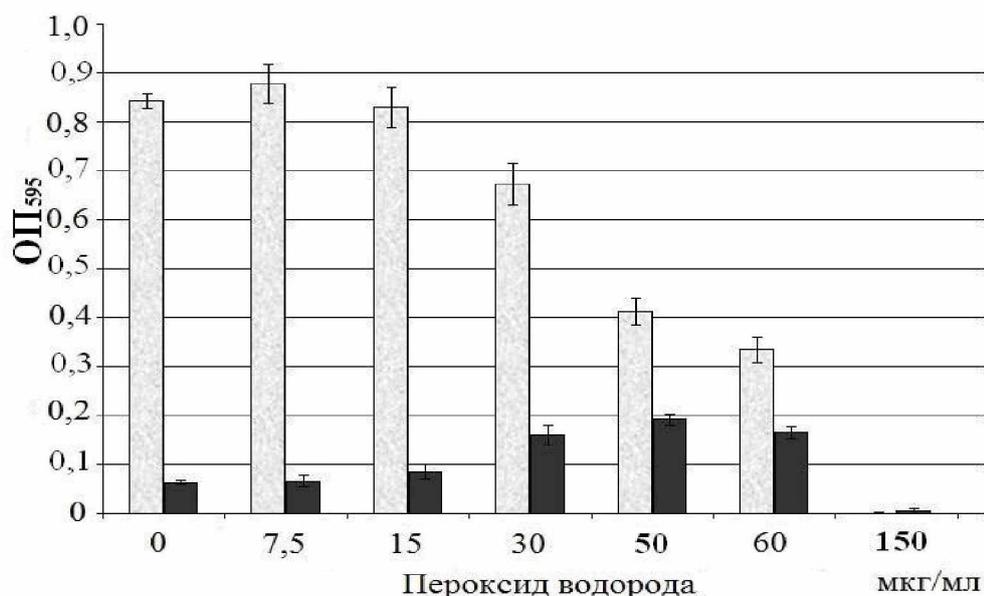


Рис. 27. Влияние пероксида водорода на образование биопленок и планктонный рост *B. cepeloserasia* 370 / pME6863. Обозначения те же, что на рис. 23.

4.5. Действие летучих органических соединений (ЛОС), продуцируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, и индивидуальных ЛОС на формирование биопленок и зрелые биопленки фитопатогенной бактерии *A. tumefaciens* C58

В последние годы внимание исследователей привлекли данные о том, что бактерии способны синтезировать летучие органические соединения (ЛОС, Volatile organic compounds – VOCs), подавляющие рост бактерий и грибов и оказывающие модулирующее действие на рост растений [103; 166; 239; 246; 261]. К настоящему времени было идентифицировано более чем 200 микробных ЛОС, но ни одно из них не может быть рассмотрено как вещество исключительно микробного происхождения или как специфическое для определенных видов микроорганизмов [180]. Эти соединения характеризуются относительно низкой молекулярной массой (<300 Da), высоким давлением паров и липофильными свойствами. ЛОС, синтезируемые ризосферными бактериями и грибами, участвуют в их взаимодействии с патогенными микроорганизмами, а также с растениями-хозяевами и представляют новый источник соединений с антибиотической и стимулирующей рост растений активностями [68; 117; 157; 312].

ЛОС являются веществами, передающими химическую информацию (англ. «infochemicals», т.е. химическими вещества, которые обеспечивают взаимодействие внутри и между организмами), т.к. они встречаются в биосфере в широком диапазоне концентраций и могут действовать на больших расстояниях [261; 180; 312]. Таким образом, они могут оказывать серьезное воздействие и на близлежащие организмы, и на развитие организмов в экосистеме. Предполагают, что бактерии-антагонисты, продуцирующие летучие вещества с

антимикробной активностью, могут функционировать как природные фумиганты, чей потенциал биоконтроля тесно связан с продукцией ЛОС [103; 117; 125; 166].

Недавно было показано, что ризосферные бактерии способны сохранять и продуцировать ЛОС внутри растений и что ЛОС, образуемые ризосферными штаммами *P. fluorescens* B-4117 и *S. plymuthica* IC1270, резко подавляли рост фитопатогена *Agrobacterium* и могли участвовать в подавлении болезни корончатых галлов у растений томата [103]. Поскольку в ризосфере была обнаружена АГЛ-зависимая коммуникация между бактериальными клетками разных видов и родов [303; 305], большой интерес представляет факт, что ЛОС могут служить не только как важная альтернатива антибиотикам в биоконтроле различных фитопатогенов, но и проявлять себя как ингибиторы QS систем, использующих АГЛ в качестве сигнальных молекул [96; 103].

Для штаммов *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* B-4117 и штаммов бактерий рода *Serratia plymuthica* IC1270 и *S. proteamaculans* 94 были определены компоненты газовой смеси летучих веществ с помощью масс-спектрометрического анализа (таб. 4) в совместной работе Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН с сотрудниками Иерусалимского университета (Израиль) [246]. Было выяснено, что в наибольшем количестве бактериями синтезируется диметилдисульфид (ДМДС), а также ряд кетонов и алкенов, а именно 2-нонанон, 2-гептанон, 2-ундеканон и 1-ундецен. Результаты анализа методом хроматографии микроэкстракционно-газовой фазы над твердофазной поверхностью и масс-спектрометрии (англ. headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric – HS-SPME-GC/MS analysis) показали, что у *S. plymuthica* IC1270 основным синтезируемым компонентом газовой смеси ЛОС является диметилдисульфид (ДМДС), у этого штамма определили также наличие в небольших количествах диметилтрисульфида. У *S. proteamaculans* 94 основным компонентом также является ДМДС, наряду с небольшими количествами 2-гептанона и др.; у *P. chlororaphis* 449 – 1-ундецен, также у этого штамма определили наличие 2-нонанона, 2-ундеканона и в небольших количествах ДМДС, 2-гептанона, метилтиолацетата. У *P. fluorescens* B-4117 основным компонентом также является 1-ундецен, кроме того у этого штамма обнаружили в небольших количествах ДМДС, метилтиолацетат и метантиол (см. Таблицу 4, рис. 28). Все перечисленные штаммы синтезируют газовые смеси летучих веществ, которые оказывали ингибирующее действие на бактерии, грибы, дрозофил и нематоды [246].

Показано, что ДМДС эффективно подавлял рост штамма *A. tumefaciens* C58, в то время как 1-ундецен не показывал такой активности, даже когда использовали очень высокие дозы [96; 103].

Продукция ЛОС является новым, слабо изученным аспектом конкурентных отношений микроорганизмов и может быть важным фактором биологического контроля защиты растений [119]. В связи с этим представляло интерес исследовать, как действуют газовые смеси летучих веществ (общий пул), синтезируемых бактериями, и индивидуальные ЛОС на формирование биопленок фитопатогенных бактерий и уже образованные биопленки.

Таблица 4. Процент конкретных ЛОС (% площади пика определенного соединения), содержащихся в газовой смеси ЛОС, от всех ЛОС (от суммарной площади пиков) испускаемых в окружающую среду штаммами *P. chlororaphis* 449, *S. proteamaculans* 94, *S. plymuthica* IC1270 и *P. fluorescens* B-4117 после 24 часов роста на среде LA (по данным работ Chernin L. et al, Dandurishvili N. et al и Popova A.A. et al [96; 103; 246]).

Время удерживания, мин	Обнаруженные соединения	% к общему пулу ЛОС			
		<i>P. chlororaphis</i> 449	<i>S. proteamaculans</i> 94	<i>S. plymuthica</i> IC1270	<i>P. fluorescens</i> B-4117
11.2	Бутанол-1	1,4	nd	-	-
12.7	Изопентанол	nd	2,2	-	-
13.0	Диметилдисульфид	≤ 0,1	68,7	53	≤ 0,2
15.7	2-Гептанон	≤ 0,1	1,5	nd	nd
17.8	Диметилтрисульфид	-	-	2,4	nd
18.5	1-Ундецен	64,5	nd	-	94,8
19.3	2-Нонанон	14,4	nd	-	-
22.6	2-Ундеканон	12,0	nd	-	-

«nd» – не определяется; «-» – не определяли.

В данной части работы исследовалось действие газовых смесей летучих веществ (ЛВ) ризосферных и почвенных бактерий родов *Pseudomonas* и *Serratia* и индивидуальных ЛОС (ДМДС, 2-нонанон, 2-ундеканон и 1-ундецен) (рис. 28), которые синтезируются этими штаммами в большем количестве, по сравнению с другими ЛОС, на образование биопленок и зрелые биопленки фитопатогенной бактерии *A. tumefaciens* C58. Хотя исследуемые бактерии не синтезируют 2-гептанон в больших количествах, было интересно сравнить его действие с действием двух других кетонов - 2-нонанона и 2-ундеканона. В работе был использован метод выращивания колони-биопленок (анг. colony-biofilms assay) на мембранных фильтрах [215]. Данный метод позволял определять количество клеток в биопленке на фильтре (количество колониеобразующих единиц – КОЕ), при действии ЛОС, по которому оценивали эффективность действия этих ЛОС.

На рис. 29 приведены данные опытов по влиянию смеси (общего пула) ЛВ бактериальных штаммов *S. proteamaculans* 94, *P. chlororaphis* 449, *P. fluorescens* B-4117, *S.*

plymuthica IC1270 на образование биопленок *A. tumefaciens* C58. Штаммы *P. chlororaphis* 449 и *S. plymuthica* IC1270 были выделены из ризосферы растений, штамм *P. fluorescens* В-4117 – из почвы, штамм *S. proteamaculans* 94 – из испорченного мяса в холодильной установке. Мы использовали штамм *S. proteamaculans* 94 в связи с тем, что штаммы этого вида обитают также в почве и ризосфере растений.

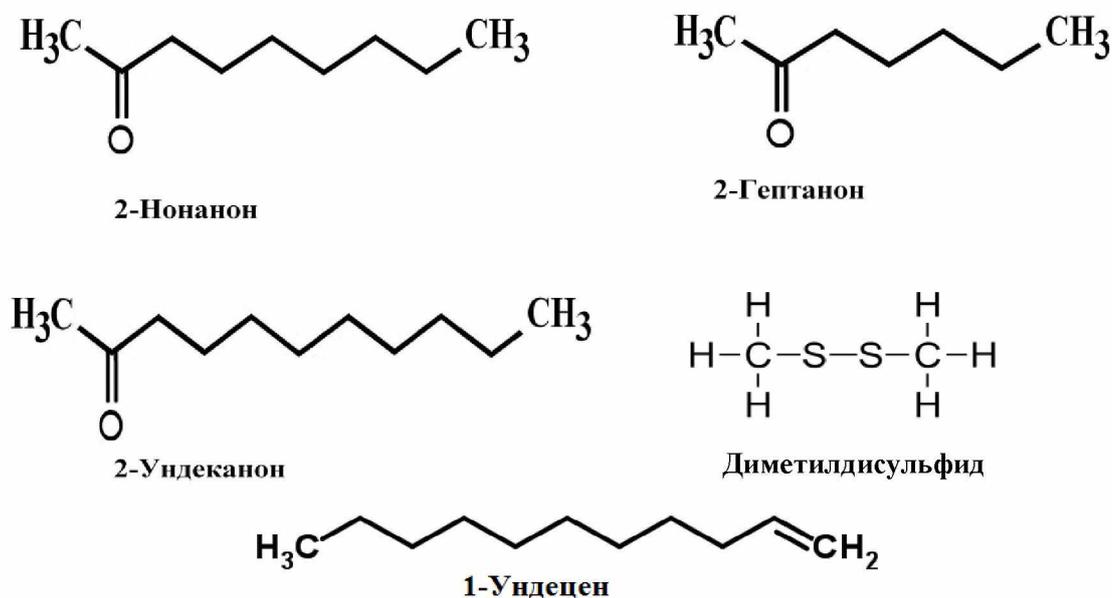


Рис. 28. Химические формулы летучих органических соединений синтезируемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*.

Можно видеть, что лучше всего подавляют образование биопленок *A. tumefaciens* C58 общий пул летучих веществ, синтезируемых штаммами *P. fluorescens* В-4117 и *P. chlororaphis* 449, ~ в 1700 и 3,2 раза соответственно, по сравнению с контролем (без штаммов, продуцирующих ЛВ). Общий пул ЛВ, выделяемый штаммом *S. proteamaculans* 94, действуют слабо, уменьшая образование биопленок только ~ в 1,3 раза, а летучие вещества штамма *S. plymuthica* IC1270 не оказывали влияния на формирование биопленки *A. tumefaciens* C58 (рис. 29).

На рис. 30 приведены данные по действию общего пула ЛВ, синтезируемых изучаемыми штаммами бактерий, на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Только в случае газовой смеси ЛВ *P. fluorescens* В-4117 наблюдается существенный эффект – гибель бактерий в уже образованных биопленках ~ в 3,2 раза по сравнению с контролем (без штаммов, продуцирующих ЛВ). Общий пул летучих веществ, выделяемых штаммами *P. chlororaphis* 449 и *S. plymuthica* IC1270, препятствуют дальнейшему увеличению числа бактерий в биопленке *A. tumefaciens* C58, поддерживая его на уровне контроля (количество КОЕ до подсева штаммов-продуцентов ЛВ, 48 часов роста); ЛВ, синтезируемые штаммом *S. proteamaculans* 94, не оказывают эффекта на бактерии в биопленке *A. tumefaciens* C58.

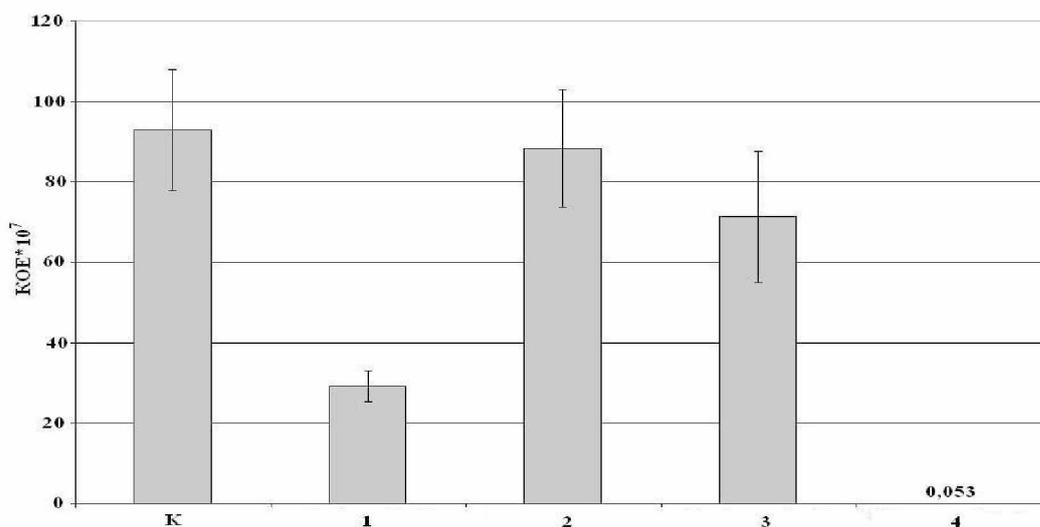


Рис.29. Влияние газовых смесей (общего пула) летучих веществ, синтезируемых бактериальными штаммами, на образование биопленок *A. tumefaciens* C58. По оси ординат – количество колониобразующих единиц (КОЕ*10⁷). По оси абсцисс - газовые смеси ЛВ синтезируемые: 1 – *P. chlororaphis* 449; 2 – *S. plymuthica* IC1270; 3 – *S. proteamaculans* 94; 4 – *P. fluorescens* B-4117; К – контроль без бактерий-продуцентов ЛВ, 48 часов роста.

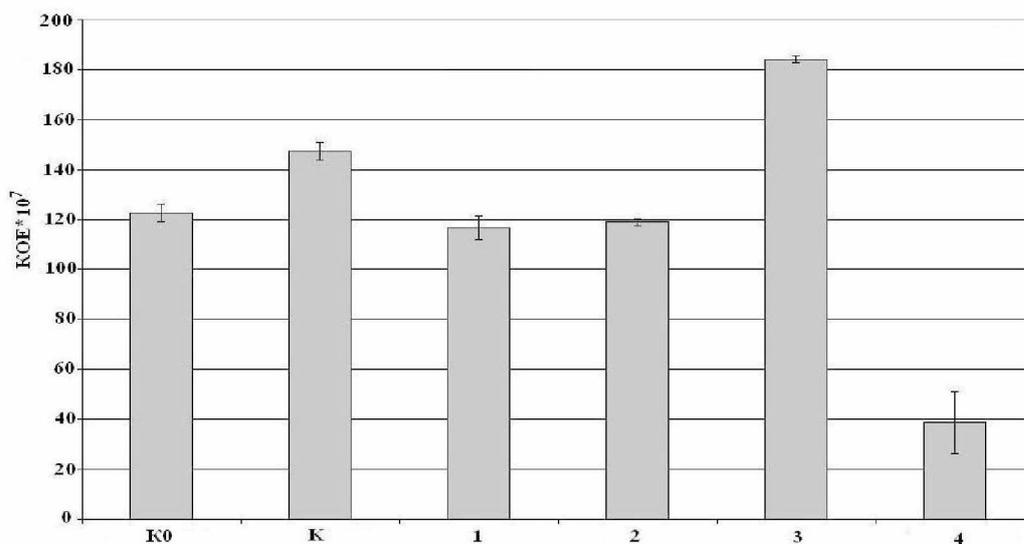


Рис. 30. Влияние газовых смесей (общего пула) летучих веществ, синтезируемых бактериальными штаммами, на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Обозначения те же, что на рис. 29 за исключением: К0 – контроль без бактерий-продуцентов ЛВ, 48 часов роста; К – контроль без бактерий-продуцентов ЛОС, 72 часа роста.

Следующим этапом работы было исследование действия индивидуальных ЛОС, синтезируемых данными бактериями в больших количествах в газовой смеси ЛОС по сравнению с другими ЛОС в этой смеси, а именно: ДМДС, 2-нонанона, 2-ундеканона и 1-ундецена. Было исследовано также действие 2-гептанона, синтезируемого в меньшем количестве штаммами *P. chlororaphis* 449 и *S. proteamaculans* 94.

На рис. 31 – 34 приведены данные опытов по влиянию указанных соединений на образование биопленок и на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Можно видеть, что кетоны и ДМДС способны подавлять образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и убивать бактерии

в зрелых биопленках, причем гибель бактерий, живущих в уже образованных биопленках, происходила при более высоких количествах ЛОС, чем ингибирование образования биопленок.

2-Нонанон оказывал действие на образование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58 при более низких количествах, чем другие ЛОС; так уже в количестве 5 мкмоль он подавлял образование биопленок *A. tumefaciens* C58 ~ в 1,5 раза по сравнению с контролем (без добавления 2-нонанона), а при дальнейшем повышении количества 2-нонанона, в диапазоне от 10 до 20 мкмоль, уровень формирования биопленок *A. tumefaciens* C58 резко снижался, ~ от 5 до 200 раз, соответственно (рис. 31 А). При действии 2-нонанона в диапазоне от 15 до 35 мкмоль количество бактерий в зрелых биопленках *A. tumefaciens* C58 уменьшалось ~ в 5,5 раз по сравнению с контролем; при дальнейшем повышении количества 2-нонанона гибель бактерий, находящихся в зрелых биопленках *A. tumefaciens* C58, резко увеличивалась (~ в 800 раз при добавлении 50 мкмоль 2-нонанона) (рис. 31 В).

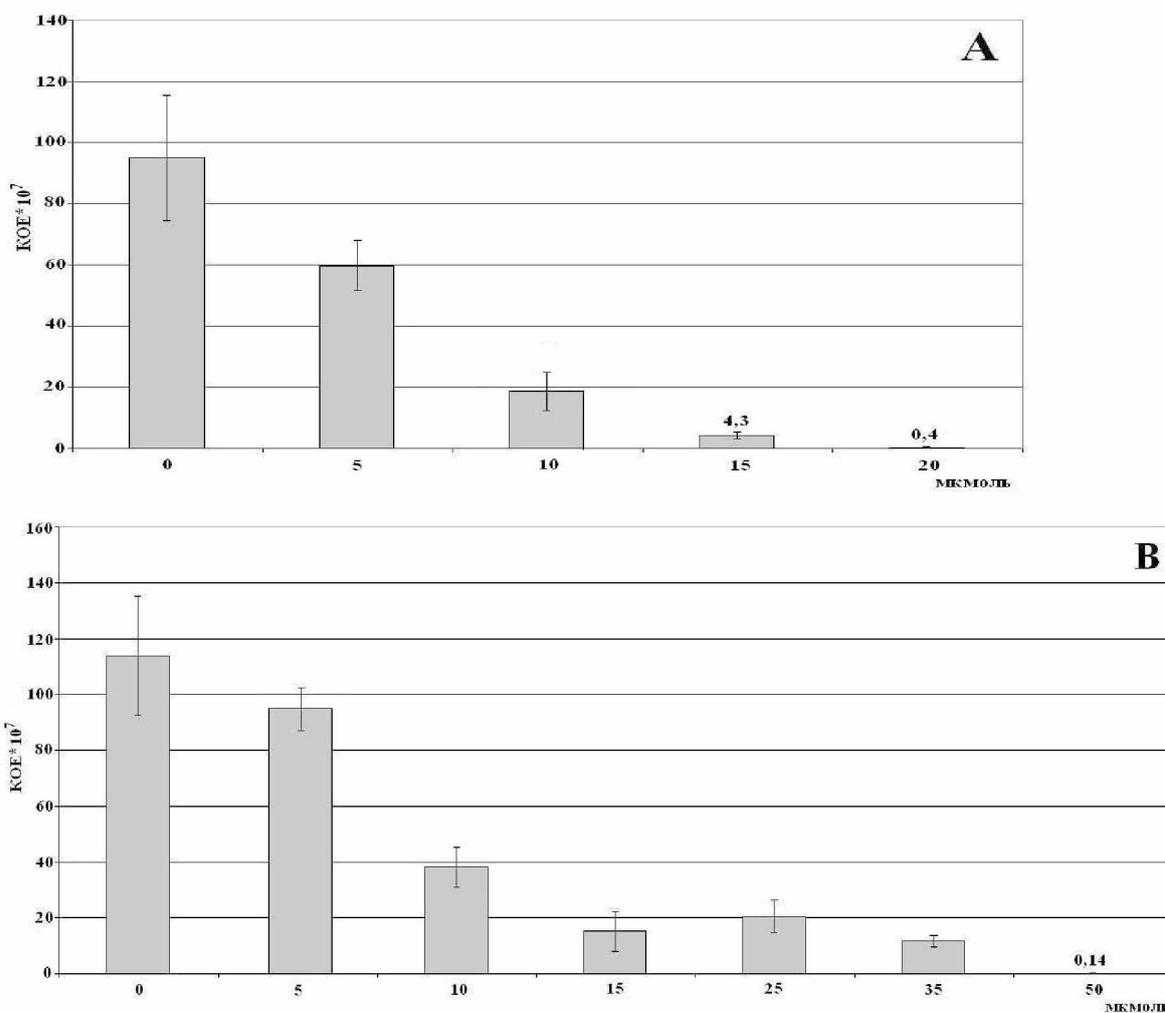


Рис. 31. Влияние 2-нонанона: **А** – на образование биопленок *A. tumefaciens* C58; **В** – на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. По оси ординат – количество колониеобразующих единиц (КОЕ*10⁷), по оси абсцисс – количество вносимого вещества, мкмоль.

Сходно действовали 2-гептанон и ДМДС: при 50 мкмоль и 100 мкмоль подавляли образование биопленок *A. tumefaciens* C58 ~ в 3,5 и 1,5 раза, соответственно, по сравнению с контролем (без добавления ЛОС); эффект резко увеличивается при дальнейшем повышении количеств этих соединений (~ в 1200 и более раз при 100 – 150 мкмоль 2-гептанона и ~ в 25000 и более раз при 200 – 400 мкмоль ДМДС) (рис. 32-А и 33-А). При действии 2-гептанона и ДМДС на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58 количество живых клеток в них снижалось (рис. 31-В и 33-В). Следует отметить, что в случае 2-нонанона, 2-гептанона и ДМДС, гибель бактерий, живущих в составе зрелых биопленок *A. tumefaciens* C58, происходила при более высоких количествах ЛОС, чем снижение уровня образования биопленок (рис. 31-А,В; 32-А,В; 33-А,В).

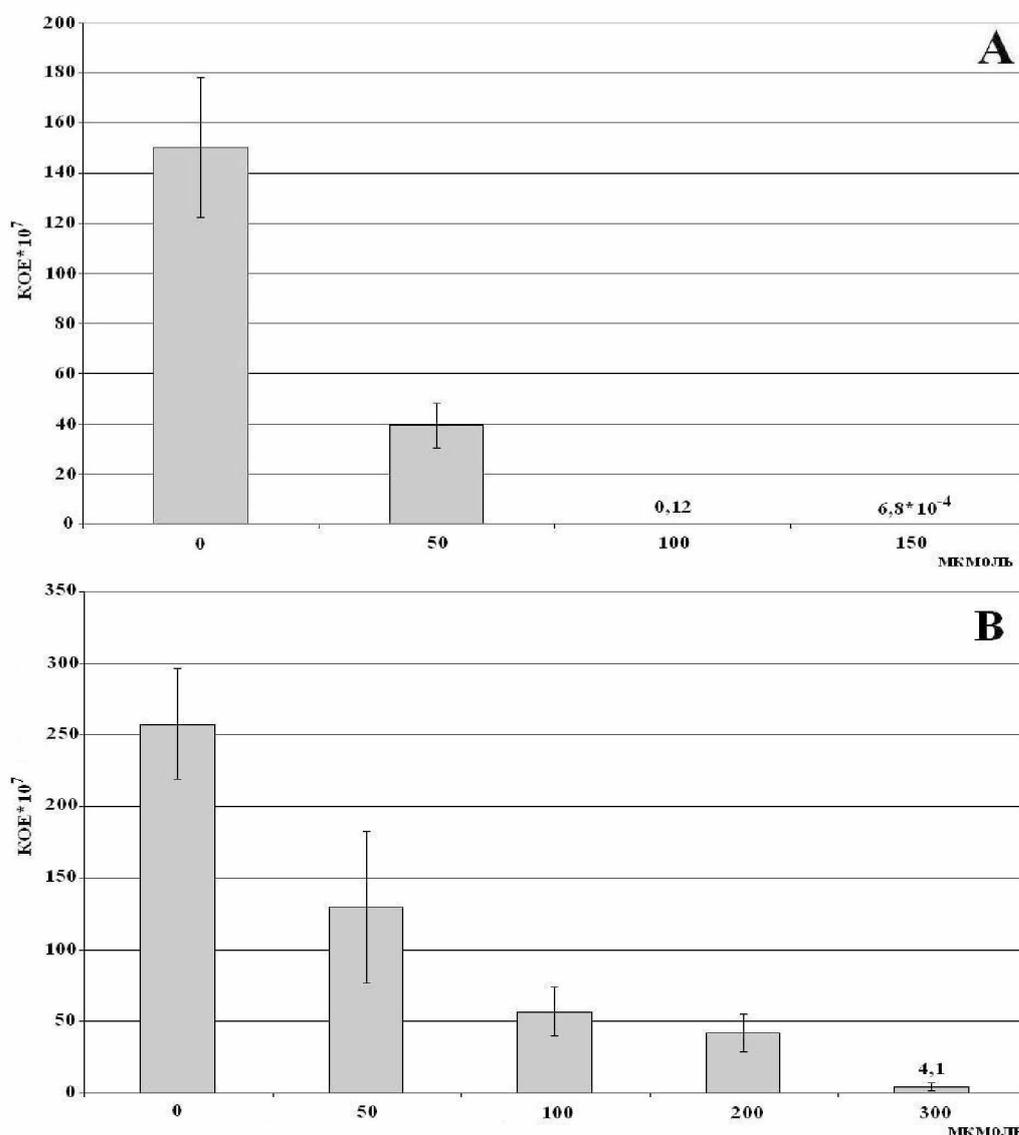


Рис.32. Влияние 2-гептанона: **А** – на образование биопленок *A. tumefaciens* C58; **В** – на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Обозначения те же, что на рис. 31.

При действии 2-ундеканона (25 мкмоль) образование биопленок *A. tumefaciens* C58 уменьшалось в 2,5 раза. Дальнейшее увеличение его количества приводило к снижению

уровня образованных биопленок приблизительно в 4,5 раза по сравнению с контролем (без добавления 2-ундеканона), причем в диапазоне количеств от 50 до 400 мкмоль биомасса биопленок не изменялась (рис. 34 А). Такую же закономерность мы наблюдали в случае действия 2-ундеканона на уже образованные биопленки: при 100 мкмоль 2-ундеканона количество живых клеток в составе зрелых биопленок уменьшалось в 4,5–6 раз сравнительно с контролем, и затем сохранялось на одном уровне в диапазоне количеств этого кетона до 600 мкмоль (рис. 34 В). В настоящее время механизм подобного типа действия 2-ундеканона остается неясным. Возможно, большие количества 2-ундеканона изменяют матрикс биопленок и каналы в нем таким образом, что это соединение больше не может проникнуть внутрь биопленок и клетки в ней остаются живыми. Для объяснения этого эффекта необходимы дальнейшие исследования.

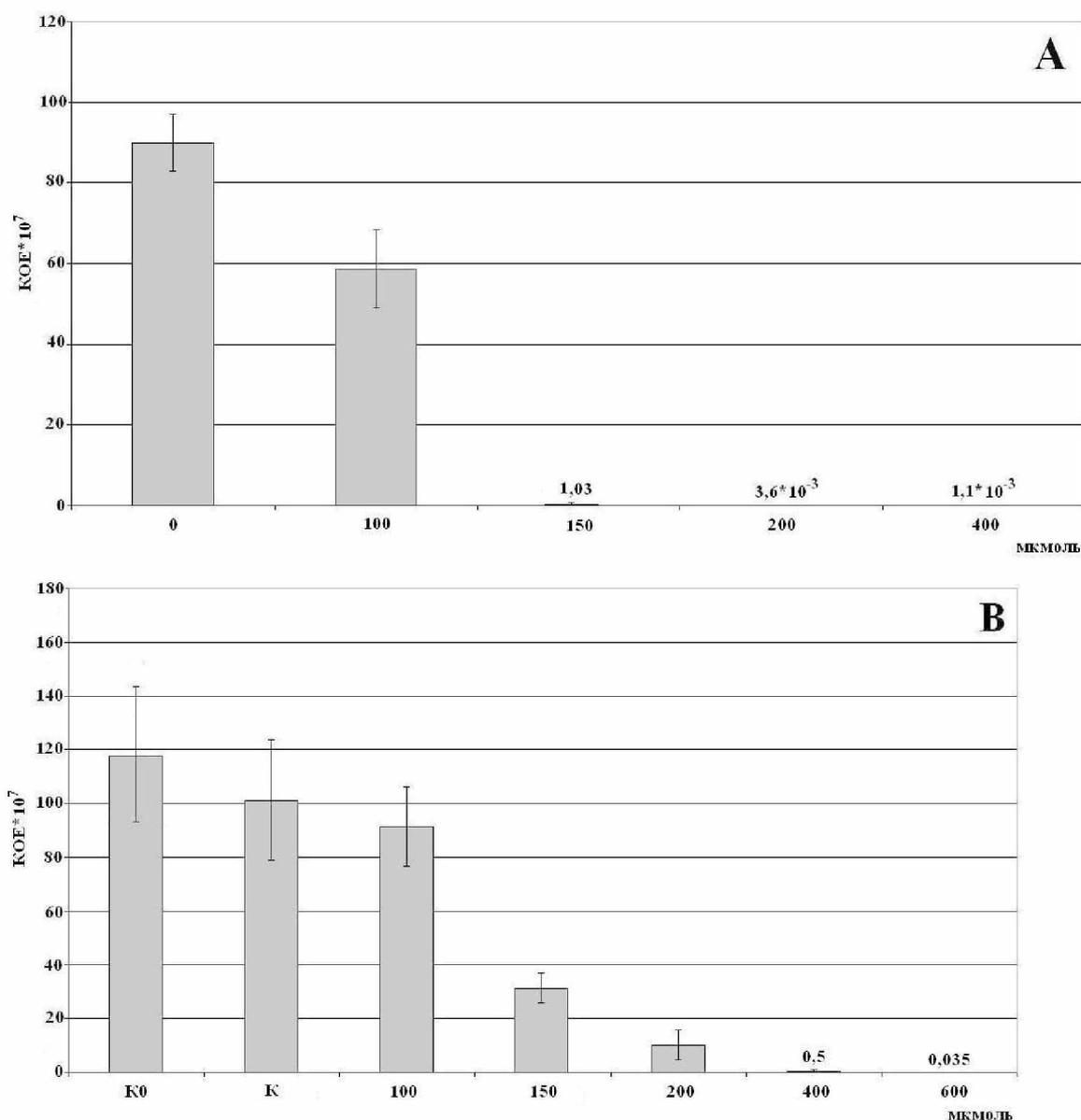


Рис. 33. Влияние ДМДС: **А** – на образование биопленок *A. tumefaciens* C58; **В** – на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Обозначения те же, что на рис. 31 за исключением: К0 – контроль без ДМДС, 48 часов роста; К – контроль без ДМДС, 72 часа роста.

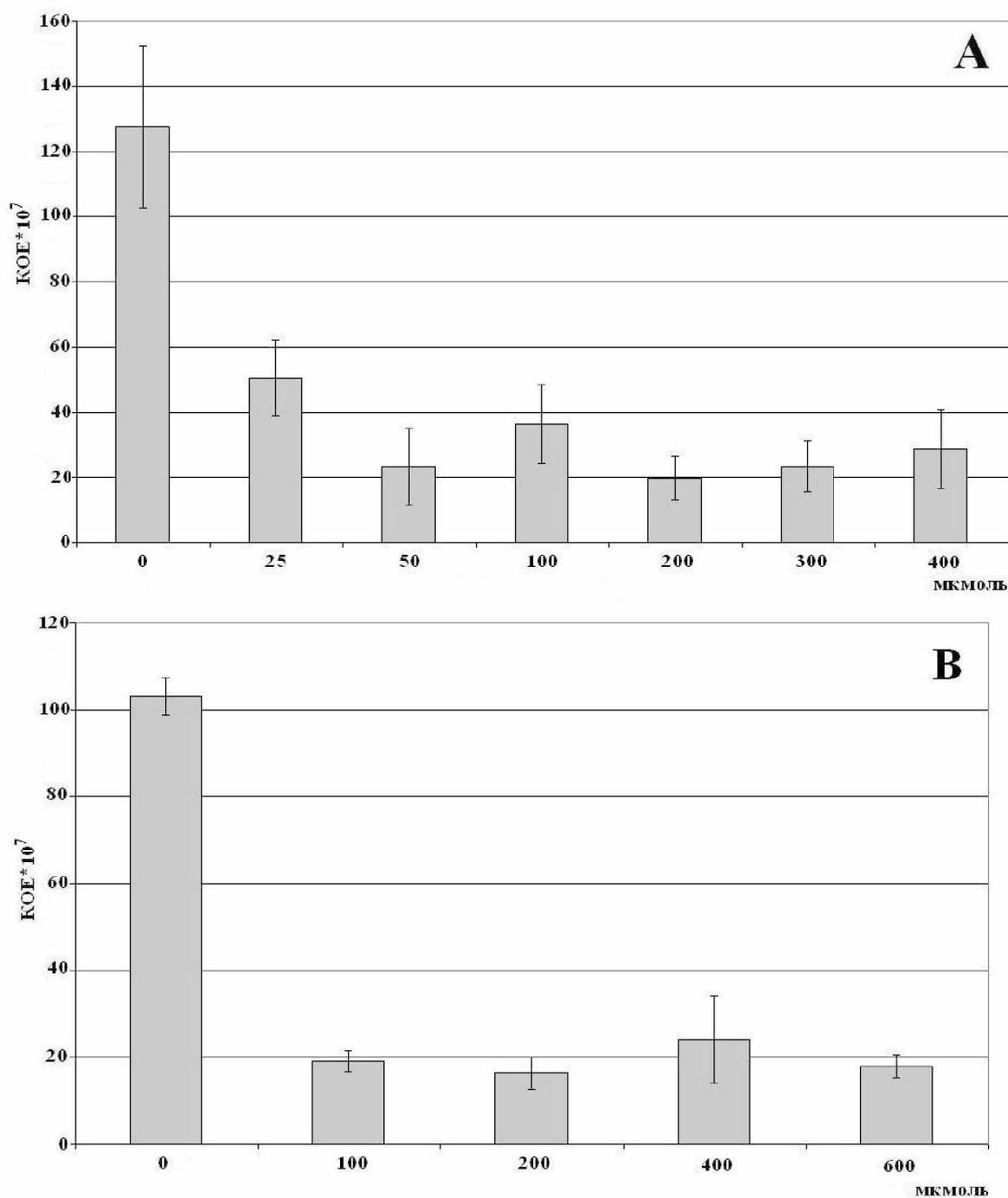


Рис. 34. Влияние 2-ундеканона: **А** – на образование биопленок *A. tumefaciens* C58; **В** – на зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58. Обозначения те же, что на рис. 31.

Было выяснено, что 1-ундецен, синтезируемый штаммами *P. fluorescens* В-4117 и *P. chlororaphis* 449 в большем количестве по сравнению с другими ЛОС этих штаммов, действовал слабо или вовсе не оказывал действия на формирование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58, даже при больших количествах этого вещества (до 800 мкмоль) (данные не приводятся), хотя именно газовые смеси ЛВ этих штаммов лучше всего действовали на формирование биопленок и зрелые биопленки *A. tumefaciens* C58 (рис. 29; 30).

4.5.1. Определение действия ЛОС на функционирование Quorum Sensing систем регуляции

Способность ЛОС подавлять образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и убивать бактерии в зрелых биопленках могла быть связана с их влиянием на функционирование Quorum Sensing систем регуляции. Так, ранее в работе Chernin L. et all [96] было показано, что газовые смеси ЛВ, выделяемые штаммами *P. fluorescens* B-4117, *S. plymuthica* IC1270 и отдельно ДМДС (основное ЛОС, образуемое штаммом *S. plymuthica* IC1270) способны ингибировать функционирование QS систем. 1-Ундецен (основное ЛОС штамма *P. fluorescens* B-4117) не проявлял данного эффекта даже при достижении количества в 750 мкмоль [96]. Причем, было показано, что наблюдаемый эффект ингибирования QS систем при действии ЛОС является следствием подавления способности растущих бактерий производить АГЛ, а не результатом прямой инактивации АГЛ этими соединениями.

Для того чтобы определить непосредственное действие ЛОС, образуемых тестируемыми бактериями и подавляющих рост микроорганизмов [246] – 2-нонанона, 2-гептанона и 2-ундеканона – на функционирование QS системы, были использованы следующие АГЛ-биосенсоры: *E. coli* DH5 α / pSB401, *E. coli* JLD271 / pAL105 и *E. coli* JLD271 / pAL101 (более подробно о биосенсорах см. Материалы и методы раздел 4). Предварительно было определено влияние концентрации добавленных АГЛ, узнаваемых использованными *lux*-биосенсорами, и времени инкубации культур с АГЛ на индукцию QS-ответа, т.е. на величину биолюминесценции. Люминесценцию сенсоров в присутствии определенных количеств ЛОС и соответствующего АГЛ-стандарта, и люминесценцию контроля (культура содержит АГЛ-стандарт, но не содержит ЛОС), измеряли через определенный промежуток времени. Было установлено, что снимать результаты опытов лучше всего при выращивании культур с АГЛ в течение 6 часов, когда величина люминесценции достаточно высока, но еще не выходит на плато. Затем было необходимо определить, как влияют исследуемые кетоны на жизнеспособность клеток сенсорных штаммов; было целесообразно использовать такие количества вносимых в пробу кетонов, которые не подавляли или слабо подавляли рост клеток, чтобы разделить эти два эффекта. Очевидно, что при гибели основного количества клеток сенсорных штаммов будет наблюдаться резкий спад биолюминесценции, определяемой репортерным *lux*-опероном, уже за счет гибели бактерий, а не в результате подавления QS-ответа. В качестве сигнальных молекул в работе использовали различные экзогенные АГЛ-стандарты, подобранные таким образом, чтобы проявлялась наибольшая специфичность их взаимодействия с рецепторными белками рассматриваемых QS систем штаммов биосенсоров.

При использовании репортерного штамма *E. coli* JLD271 / pAL105, содержащего компоненты LasI-LasR QS системы *P. aeruginosa* (ген рецепторного регуляторного белка *lasR*, взаимодействующего с АГЛ, и ген синтазы АГЛ *lasI* со вставкой репортера *lux*-оперона), в среду вносили N-3-оксо-додеканойл-гомосеринлактон (3-охо-C12-HSL), в качестве специфичного для этой QS системы АГЛ-стандарта [201]. Определяли люминесценцию биосенсора в контроле (в отсутствие ЛОС) и при действии различных количеств ЛОС, а также количество колониеобразующих единиц (КОЕ) в контроле и при действии ЛОС. По полученным данным, приняв во внимание данные о гибели клеток биосенсора (если таковая наблюдалась в конкретных условиях), судили о действии ЛОС на функционирование QS систем регуляции.

При конечной концентрации АГЛ-стандарта 0,25 мкг/мл и при наличии в этой тестируемой пробе 1 мкмоль 2-нонанона количество выросших за 6 часов опыта клеток составляло ~ 100 % от контроля; в то же время, уровень биолюминесценции снижался в среднем до 46 % от контроля – см. Таблица 5 (пример эксперимента) и рис. 35. Т.е. QS-ответ был приблизительно в 2 раза более чувствителен к действию 2-нонанона, чем жизнеспособность клеток штамма *E. coli* JLD271 / pAL105. При добавлении к культуре 2 мкмоль 2-нонанона уровни люминесценции биосенсора колебались в разных опытах в пределах от 21,5 до 47,3 %, от контроля, но при этом число КОЕ уменьшалось и составляло 54,1–70,1 % от контроля, соответственно, т.е. и в этом случае экспрессия репортерного гена реагировала на добавление кетона в большей степени, чем жизнеспособность клеток биосенсора. При более высоких количествах 2-нонанона, вносимых в культуру, наблюдалась почти полная гибель клеток биосенсора.

Сходная картина наблюдалась при действии на биосенсор 2-гептанона (5 мкмоль): отсутствие подавления выживаемости клеток и уменьшение уровня биолюминесценции репортерного штамма до 47 % от контроля без 2-гептанона (рис. 35).

Несколько иная картина наблюдалась при использовании 2-ундеканона (5 мкмоль): биосенсор был более чувствителен к нему и количество КОЕ/мл снижалось и составляло ~ 50 % от контроля, однако и в этом случае уровень биолюминесценции ингибировался в большей степени, до 20 % от контроля (рис. 35).

Таким образом, степень подавления биолюминесценции при действии трех указанных кетонов на биосенсор *E. coli* JLD271 / pAL105 была существенно бóльшей, чем влияние кетонов на выживаемость клеток (рис. 35).

Таблица 5. Действие 2-нонанона на биолюминесценцию биосенсора *E. coli* JLD271 / pAL105.

№ опыта	БЛк*	БЛлос**	$\frac{БЛлос}{БЛк},$ %	КОЕк	КОЕлос	$\frac{КОЕлос}{КОЕк},$ %
1	56801	33304	58,6	$218 \cdot 10^7$	$215 \cdot 10^7$	98,6
2	67073	31101	46,4	$196 \cdot 10^7$	$198 \cdot 10^7$	101
3	84964	28676	33,8	$117 \cdot 10^7$	$121 \cdot 10^7$	103,4

*БЛк – значение биолюминесценции сенсора *E. coli* JLD271 / pAL105, в условных световых единицах, через 6 часов роста, с добавлением 3-охо-С12-HSL в качестве АГЛ-стандарта с конечной концентрацией 0,25 мкг/мл, но без добавления 2-нонанона – используется как контроль;

** БЛлос – значение биолюминесценции сенсора *E. coli* JLD271 / pAL105, в условных световых единицах, через 6 часов роста, с добавлением 3-охо-С12-HSL, в качестве АГЛ-стандарта с конечной концентрацией 0,25 мкг/мл, и с добавлением 2-нонанона.

КОЕк – количество колониеобразующих единиц на мл (КОЕ/мл) сенсора *E. coli* JLD271 / pAL105, через 6 часов роста, с добавлением 3-охо-С12-HSL, но без добавления 2-нонанона – используется как контроль;

КОЕлос – число КОЕ/мл сенсора *E. coli* JLD271/pAL105, через 6 часов роста, с добавлением 3-охо-С12-HSL и 2-нонанона.

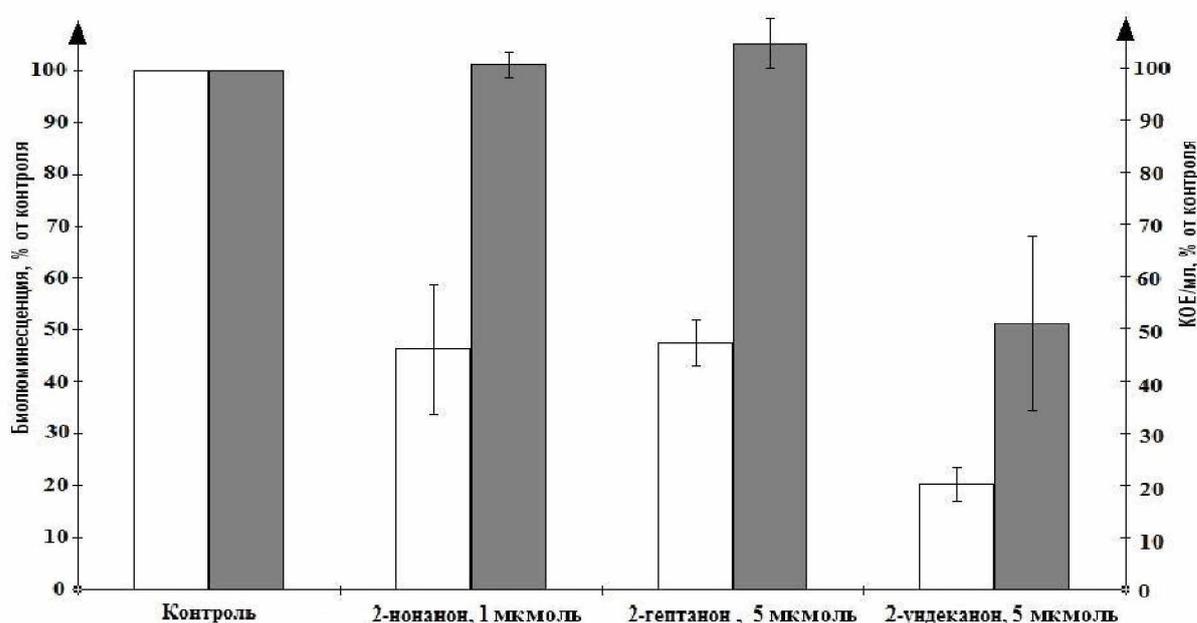


Рис. 35. Действие кетонов на биолюминесценцию биосенсора *E. coli* JLD271 / pAL105.

Белые столбцы – уровень биолюминесценции репортерного штамма, (относительные единицы) в % от контроля; черные столбцы – КОЕ/мл репортерного штамма, в % от контроля. По оси абсцисс – количество вещества, внесенного в культуру биосенсора, мкмоль; Контроль – в присутствии 3-охо-С12-HSL, без добавления кетонов.

Вторым *lux*-биосенсором был штамм *E. coli* JLD271 / pAL101, сконструированный на основе компонентов RhlI/RhlR QS системы *P. aeruginosa*. Специфичным АГЛ для этой QS

системы *P. aeruginosa* является N-бутаноил-гомосеринлактон (C4-HSL), который мы вносили в культуру в качестве АГЛ-стандарта с конечной концентрацией 0,25 мкг/мл [201]. При использовании 2-нонанон и 2-гептанон в тех же количествах, что и при действии на биосенсор *E. coli* JLD271 / pAL105, они не оказывали в этом случае заметного влияния на жизнеспособность клеток и уровень биолюминесценции (рис. 36). Однако, при внесении в культуру 5 мкмоль 2-ундеканона наблюдалось снижение уровня люминесценции до 30 % от контроля, при том, что жизнеспособность клеток сенсора оставалась такой же, как в контроле.

Таким образом, существенное влияние на QS-ответ в случае этой QS системы из трех тестируемых кетонов оказывал только 2-ундеканон (рис. 36). Увеличение количества кетонов, вносимых в культуру биосенсора, приводило к резкому уменьшению выживаемости клеток данного биосенсора.

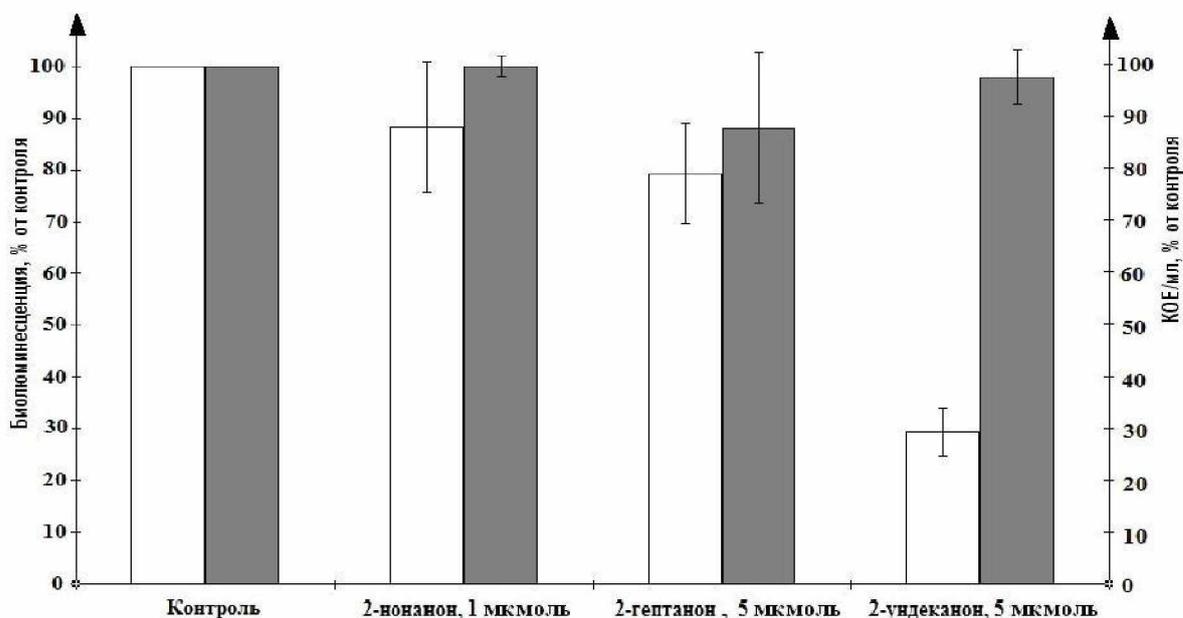


Рис. 36. Действие кетонов на биолюминесценцию биосенсора *E. coli* JLD271 / pAL101. Обозначения те же, что и на рис. 35 за исключением: Контроль – в присутствии C4-HSL, без добавления кетонов.

Третьим репортерным штаммом, использованным в экспериментах по изучению действия кетонов на функционирование QS систем, был *lux*-биосенсор *E. coli* DH5 α / pSB401, полученный на основе компонентов LuxI-LuxR QS системы *V. fischeri*. Этот сенсор содержит ген рецепторного белка *luxR* и ген синтазы АГЛ *luxI* со вставкой *lux*-оперона; он наиболее чувствителен к АГЛ C6-HSL – C8-HSL, включая АГЛ, содержащие оксогруппы [315]. В качестве АГЛ-стандарта к культуре биосенсора мы вносили N-октаноил-гомосеринлактон (C8-HSL) с конечной концентрацией 0,25 мкг/мл. Были использованы те же количества кетонов, что и в случае биосенсоров на основе LasI-LasR и RhlI-RhlR QS систем. В

присутствии 2-нонанона уровень биолюминесценции биосенсора снижался до 28 % от уровня контроля, однако, и выживаемость клеток при его действии уменьшалась до ~ 40 % от контроля. Эффект 2-гептанона на уровень биолюминесценции был более выраженным: снижение уровня биолюминесценции до 14 % от контроля без 2-гептанона, при уменьшении выживаемости до 55 % от контроля (рис. 37).

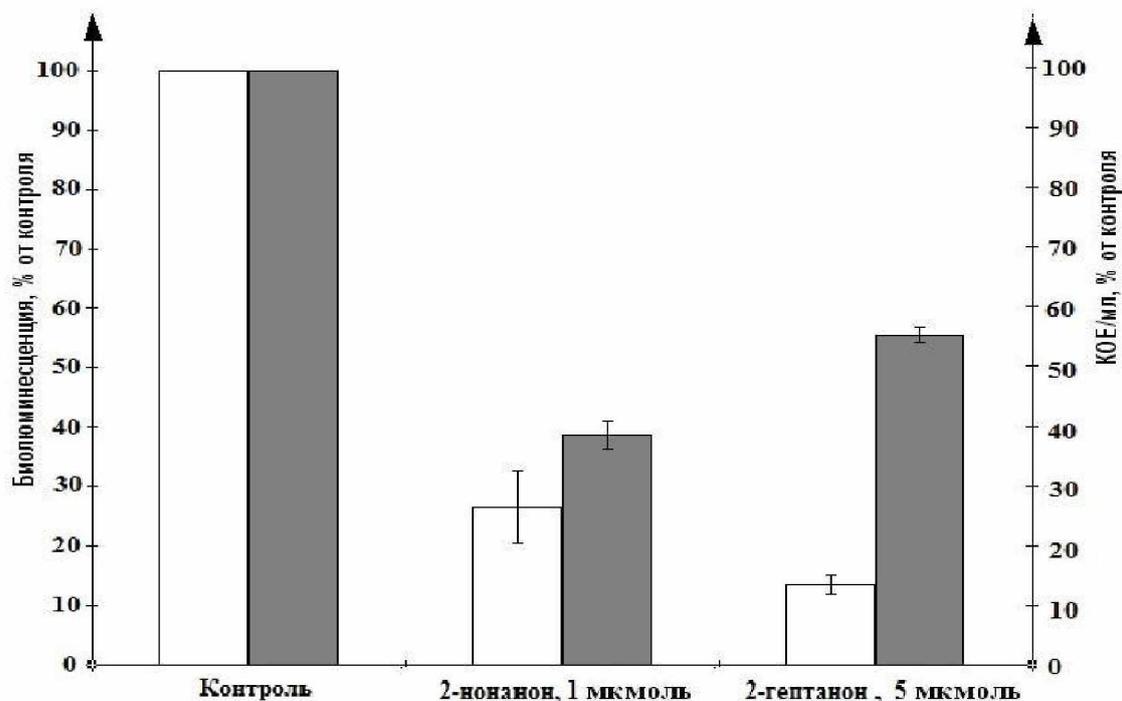


Рис. 37. Действие кетонов на биолюминесценцию биосенсора *E. coli* JLD271 / pSB401. Обозначения те же, что и на рис. 35 за исключением: Контроль – в присутствии C8-HSL, без добавления кетонов.

При увеличении количества 2-нонанона и 2-гептанона, вносимого в культуру биосенсора, больше 2 мкмоль и 5 мкмоль соответственно наблюдалась почти полная гибель клеток биосенсора. При использовании 2-ундеканона биосенсор *E. coli* DH5 α / pSB401 оказался крайне чувствительным, клетки при добавлении в культуру этого кетона практически все погибали; причина этого различия в чувствительности к 2-ундеканону с клетками других биосенсоров неясна. Таким образом, при действии двух кетонов, 2-нонанона и 2-гептанона, мы наблюдали ту же зависимость, что и в случае других сенсоров – снижение QS-ответа в большей степени, чем выживаемости клеток.

В конечном итоге, обобщая результаты работы, можно видеть, что природные летучие кетоны, синтезируемые бактериями, могут взаимодействовать с QS системами, включающими АГЛ в качестве сигнальных молекул, и снижать эффективность их функционирования. Показано, что при количествах кетонов, не оказывающих бактерицидного действия или слабо влияющих на выживаемость штаммов-биосенсоров,

указанные кетоны могут модулировать QS-ответ, подавляя экспрессию *lux*-репортерного оперона в большей степени, чем жизнеспособность клеток этих штаммов. Подавление экспрессии репортерного *lux*-оперона происходит, по-видимому, в результате ингибирования транскрипции оперона с промотора гена синтазы АГЛ. Эти эффекты зависят от уровня выживаемости биосенсоров и, как мы показали, лучше всего проявляются в условиях, когда кетоны слабо подавляют или не подавляют рост клеток. При этом наблюдались некоторые различия в чувствительности к кетонам биосенсоров, содержащих компоненты разных QS систем. Ни в одном случае не было обнаружено стимуляции кетонами экспрессии репортерного *lux*-оперона. Мы не определяли, влияют ли кетоны непосредственно на АГЛ. Однако, в ранее опубликованной работе [96] было показано, что при «Quorum Quenching» эффекте общего пула ЛОС, выделяемых штаммом *P. chlororaphis* 449, в котором содержались значительные количества кетонов 2-нонанона и 2-ундеканона, не происходило прямой инактивации АГЛ.

Можно предположить, что подавление QS регуляции продуцируемыми ЛОС является еще одной стороной конкурентной борьбы бактерий вместе с ингибиторным действием ЛОС на их рост и жизнеспособность. Это свойство бактерий может быть важным для взаимодействия бактерий в почве и ризосфере растений, для защиты растений от фитопатогенных бактерий. Вполне возможно, что ЛОС играют существенную роль и во взаимоотношениях микроорганизмов микрофлоры человека.

4.5.2. Определение влияния мутаций в генах, кодирующих порины OmpF и OmpC, на чувствительность клеток *E. coli* к ЛОС

Мембраны микроорганизмов, наряду с другими функциями, эффективно защищают клетки от неблагоприятного влияния внешней среды. Как известно, в проникновении различных низкомолекулярных соединений в клетки бактерий и в выведении их из клеток участвуют порины – белки клеточной стенки бактерий, обладающие способностью образовывать заполненные водой поры (каналы) и способствующие неспецифическому прохождению через внешнюю мембрану (ВМ) веществ с относительно невысокой молекулярной массой [50]. Так, например, было показано, что мутанты *E. coli*, дефектные по поринам (OmpF или OmpC, или по обоим), более устойчивы к ионам серебра [198; 250]. Среди поринов ВМ бактерий доминируют так называемые неспецифические порины, предназначенные для пассивной диффузии гидрофильных молекул с молекулярной массой не более 600 Да. В случае *E. coli*, например, они представлены тремя типами белков: OmpF, OmpC, а также PhoE порином. Как правило, в клетке существуют различные популяции поринов с высокой степенью гомологии на уровне первичной структуры, но с различным

диаметром пор. Клетка регулирует проницаемость ВМ посредством экспрессии поринов с меньшим или большим диаметром пор в ответ на изменение условий и воздействие различных факторов внешней среды [26; 50; 240].

Порины представляют собой специфическую группу интегральных мембранных белков с необычной пространственной структурой. Порины относятся к β -структурированным мембранным белкам, которые в ВМ грамотрицательных бактерий существуют в виде тримеров, устойчивых к действию денатурирующих агентов и протеолитических ферментов. Особенности структуры и поверхностная локализация в клетке обуславливают участие поринов в осуществлении динамической связи между бактериями и окружающей средой. В процессе проявления своей мультифункциональной активности эти белки включаются в поддержание структурной целостности клетки, связывание различных веществ, адгезию к другим клеткам и регуляцию транспорта, как питательных веществ, так и бактерицидных агентов [26; 50]. Порообразующие белки давно привлекают внимание исследователей как мультифункциональные компоненты ВМ бактериальных клеток, играющие важную роль во взаимоотношениях бактерий с организмом хозяина [50; 198; 240].

Представляло интерес определить, участвуют ли порины в проникновении в клетку исследуемых нами ЛОС, образуемых бактериями. Для ответа на этот вопрос было исследовано влияние мутаций в генах, кодирующих порины, на чувствительность клеток *E. coli* к ЛОС. Было проведено сравнительное изучение непосредственного действия индивидуальных ЛОС (ДМДС, 2-нонанона, 2-гептанона, 2-ундеканона) на мутантные штаммы *E. coli* К-12, лишенные поринов, и на штамм дикого типа (таб. 2).

С этой целью ночные культуры штаммов *E. coli* К-12 разводили в 10 раз средой LB и подращивали в течение 4 часов с добавлением в среду различных количеств ЛОС или без них, затем производили высев культур и через 24-48 часов подсчитывали количество колониеобразующих единиц (КОЕ). Предполагалось, что если порины участвуют в транспорте ЛОС в клетки или в связывании этих веществ, то мутанты, лишенные поринов, будут более устойчивыми к действию ЛОС. Определяли отношение числа КОЕ в контроле (без добавления ЛОС) к числу КОЕ при действии определенного количества конкретного ЛОС. На основании полученных данных судили о влиянии мутаций в генах, кодирующих порины OmpF и OmpC, на чувствительность клеток *E. coli* к данным ЛОС.

Были получены предварительные данные о том, что мутантные штаммы, лишенные поринов OmpF или обоих поринов (*E. coli* К-12 МН1471 и *E. coli* К-12 ТК821 соответственно), были более устойчивыми к действию 50 мкмоль ДМДС, по сравнению со штаммом дикого типа (*E. coli* К-12 МС4100); при этом эффект влияния мутаций на

выживаемость клеток штаммов колебался в разных опытах в пределах от 1,7 до 3 раз (Таблица 6). Выживаемость клеток мутантного штамма, лишённого порина OmpC (*E. coli* K-12 МН225), при действии 50 мкмоль ДМДС, была приблизительно на уровне штамма дикого типа (данные не приводятся).

Таблица 6. Действие ДМДС на штаммы *E. coli* K-12.

№ опыта	КОЕк*	КОЕлос**	$\frac{КОЕлос}{КОЕк}, \%$
		50 мкмоль	
<i>E. coli</i> K-12 МС4100 <i>ompR</i> ⁺ <i>ompF</i> ⁺ <i>ompC</i> ⁺			
1	108*10 ⁷	5,5*10 ⁷	5,1
2	78*10 ⁷	5,2*10 ⁷	6,7
3	93*10 ⁷	5,4*10 ⁷	5,8
<i>E. coli</i> K-12 МН1471 <i>ompR</i> ⁺ <i>ompF</i> ⁻ <i>ompC</i> ⁺			
1	134*10 ⁷	15,95*10 ⁷	12
2	57*10 ⁷	11,1*10 ⁷	19,5
<i>E. coli</i> K-12 ТК821 <i>ompR</i> ⁺ <i>ompF</i> ⁻ <i>ompC</i> ⁻			
1	87*10 ⁷	9,75*10 ⁷	11,2
2	62*10 ⁷	8,4*10 ⁷	13,5

КОЕк* – КОЕ/мл штаммов *E. coli* K-12, посеянных через 4 часа роста, без добавления ДМДС – используется как контроль;

КОЕлос** – КОЕ/мл штаммов *E. coli* K-12, посеянных через 4 часа роста, с добавлением ДМДС (50 мкмоль).

Эти данные свидетельствуют в пользу того, что порины с одной стороны могут принимать участие в связывании ЛОС и/или в транспорте ЛОС в клетку, поскольку чувствительность клеток штамма дикого типа *E. coli* K-12 к действию ДМДС больше, чем чувствительность мутантных штаммов, лишённых поринов OmpF, OmpC или обоих поринов. Однако, т.к. эффект мутаций не очень велик, можно предположить, что наблюдаемые эффекты не связаны напрямую с взаимодействием поринов с ЛОС или порины не обеспечивают основной путь транспорта ЛОС в клетку. С другой стороны наблюдаемые эффекты при действии ДМДС, могут быть объяснены изменениями структуры внешней мембраны клеток мутантных штаммов, лишённых поринов OmpF, OmpC или обоих поринов, так как известно, что пориновые белки обладают многофункциональностью, например, они участвуют в поддержании структурной целостности клетки.

Была начата работа по изучению действия 2-нонанона, 2-ундеканона и 2-гептанона на мутантные штаммы *E. coli* K-12, лишённые поринов, и на штамм дикого типа. Однако пока не получено убедительных данных о влиянии мутаций в генах, кодирующих порины OmpF и OmpC, на чувствительность клеток штаммов *E. coli* K-12 к данным ЛОС, требуются дальнейшие эксперименты.

V. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как выяснилось в последние два десятилетия, бактериальные биопленки являются основным типом существования бактерий в природных условиях, обеспечивающим выживание бактерий при действии неблагоприятных факторов окружающей среды. Способность патогенных бактерий формировать биопленки представляет серьезнейшую проблему антибактериальной терапии, т.к. бактерии, живущие в биопленках, как правило, проявляют многократно повышенную резистентность к действию различных антимикробных препаратов и иммунной защите организма. Поэтому разработка средств борьбы с биопленками является актуальнейшей проблемой медицины. Этому вопросу и изучению закономерностей и генетического контроля образования биопленок посвящено большое количество исследований, проводимых в лабораториях и компаниях различных стран, работающих в области общей, медицинской, сельскохозяйственной микробиологии и биотехнологии.

В настоящей работе были исследованы закономерности действия соединений различной химической природы на образование биопленок грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* PAO1, *A. tumefaciens* C58 и *B. cepacia* 370. В последнее время большое внимание уделяется изучению действия на микроорганизмы веществ растительного происхождения, которые обладают антимикробной и антиоксидантной активностью. Однако, в отношении действия этих соединений на образование биопленок бактерий и зрелые, уже сформированные биопленки данных очень мало. Следует отметить важность изучения этого вопроса, т.к. образование биопленок способствует инфекции фитопатогенных бактерий, с одной стороны, и выживанию бактерий, ассоциированных с растениями и ингибирующих рост фитопатогенов, с другой. Кроме того, ряд веществ растительного происхождения используются в медицине в качестве фитопрепаратов, поэтому важно понимать их действие на планктонно-растущие и живущие в биопленках бактерии.

Нами было исследовано влияние на бактерии ряда фенольных соединений, образуемых растениями, растительных гормонов и пероксида водорода, который, кроме того, что является известным антисептиком и применяется в медицине, синтезируется растениями в ответ на инфекцию фитопатогенных микроорганизмов [266; 319]. Что касается использованных объектов исследования, *A. tumefaciens* является типичным фитопатогеном, вызывающим образование опухолей на растениях, а *P. aeruginosa* и *B. cepacia*, известные как условно патогенные для человека бактерии, могут также обитать в почве и, по крайней мере, *P. aeruginosa*, может проявлять себя также как фитопатогенная бактерия.

В первой части работы было исследовано действие на образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58 семи растительных фенолов, а также коричной кислоты, которая не является фенольным соединением, но может быть предшественником для некоторых из них. Феномен, который нас особенно заинтересовал – повышение уровня образования биопленок обеих бактерий при действии субингибиторных и/или слабо подавляющих рост концентраций фенольных соединений. Эта закономерность проявлялась в присутствии всех указанных соединений, независимо от их структуры. Обычно наивысший уровень образования биопленок при действии этих веществ достигался при уменьшении планктонного роста на 30 – 50 % от значений контроля.

Стимуляция образования биопленок (она может быть названа также индукцией образования биопленок) при низких концентрациях в среде фенольных соединений, подавляющих рост бактерий, несомненно, выгодна бактериям при их взаимодействии с растениями (например, в ризосфере), обеспечивая им возможность выживания при неблагоприятных условиях. Это может быть полезной стратегией защиты растительных патогенов от антибактериального действия фенольных соединений, образуемых растениями. Например, было показано, что природное полифенольное соединение розмариновая кислота обладает пониженной активностью против биопленки *P. aeruginosa*, по сравнению с ее активностью в отношении планктонных клеток данной бактерии [145; 306]. Эта особенность поведения бактерий является для них полезным приспособлением, которое, по-видимому, возникло в ходе совместной эволюции микро- и макроорганизмов, взаимодействующих в различных природных условиях.

При более высоких концентрациях фенольных соединений биомасса образованных биопленок снижалась. Ингибирование образования биопленок при этих количествах указанных соединений связано, по-видимому, главным образом с неспецифическим ингибированием роста бактерий. Это следует из того факта, что в большинстве наших экспериментов резкое уменьшение формирования биопленок происходило параллельно снижению роста планктонных клеток бактериальной популяции; тем не менее, не исключено и специфическое воздействие указанных соединений на образование биопленок.

Механизм стимулирующего действия указанных выше соединений на образование биопленок бактериями в настоящее время неясен. Формирование биопленок является многоступенчатым мультифакторным процессом, и эти вещества могут влиять на несколько мишеней. Мы предположили, что стимулирующее действие исследованных соединений на образование биопленок могло быть связано с повышенным функционированием в этих условиях QS систем тестируемых бактерий, которые, как известно, участвуют в регуляции образования биопленок у ряда бактерий. Это предположение было проверено в

экспериментах по действию трех фенольных соединений (4-гидроксibenзойной, галловой кислоты и ванилина) на синтез АГЛ, сигнальных молекул QS систем *P. aeruginosa* PAO1, с использованием специфических *lux*-биосенсоров. Действительно, оказалось, что в присутствии этих фенольных соединений при их концентрациях, которые повышали уровень образования биопленок, происходило увеличение синтеза N-3-оксо-додеканоил-гомосеринлактон (3-охо-C12-HSL), сигнальной молекулы основной LasI-LasR QS системы *P. aeruginosa*. Это позволяет предположить, что в регуляции стимуляции образования биопленок участвует LasI-LasR QS системы *P. aeruginosa* PAO1. Интересно, что увеличения синтеза N-бутаноил-гомосеринлактона (C4-HSL), сигнальной молекулы второй QS системы этой бактерии, RhlI-RhlR, при действии фенольных соединений не было обнаружено.

Другим фактором, важным для образования биопленок и зависимым от QS систем, является способность клеток мигрировать по поверхности среды (motility), а именно сворминг (swarming) и твитчинг (twitching). Однако, на эти свойства *P. aeruginosa* субингибиторные концентрации фенольных соединений не влияли; таким образом, стимуляция образования биопленок в этих условиях не была связана с увеличением миграции бактерий по поверхности среды этих двух типов – первым этапом образования биопленок.

Относительно непосредственных механизмов, обуславливающие стимуляцию образования биопленок при действии субингибиторных или слабо подавляющих рост концентраций растительных фенолов, можно было предположить, что это действие фенолов связано с их общей характеристикой – антиоксидантной активностью, ингибирующей окислительный стресс и тем самым защищающей клеточные структуры от повреждений. Было показано, что антиоксидантное действие фенольных соединений может осуществляться с одновременным участием нескольких молекулярных механизмов: прямого ингибирования активных форм кислорода (АФК) в окружающей среде и цитоплазме; снижения продукции АФК за счет хелатирования металлов, включая ионы железа; стимуляции экспрессии генов, участвующих в антиоксидантном действии, малыми дозами АФК, образующимися при аутоокислении фенольных соединений [260].

Однако, мы наблюдали эффект стимулирования образования биопленок также и при действии окислителя (пероксида водорода).

Эффект индукции образования биопленок фенольными соединениями может быть связан с их способностью функционировать как сигнальные молекулы в растительно-микробных взаимодействиях. Например, показано, что они являются индукторами *nod* гена симбиоза бобовых с ризобиями; играют роль в индукции *GmGin1* гена в грибах для установления симбиоза растений с эндомикоризными грибами арбускулярного типа и др.

[208]. Фитопатогены *A. tumefaciens*, *Dickeya dadantii*, *Pseudomonas syringae* и ряд других отвечают на фенольные соединения индукцией экспрессии генов вирулентности, что полезно для этих бактерий [80; 303]. Сообщалось также о том, что фенольные соединения регулируют экспрессию (ингибируют или индуцируют) T3SS генов у *P. aeruginosa* через GacA/GacS систему (необходима для продукции экзоферментов и вторичных метаболитов, а также важна для образования биопленки *P. aeruginosa*) [303]. Возможно, что экспрессия каких-то генов, продукты которых участвуют в образовании биопленок, также регулируются фенольными соединениями. Необходимы дальнейшие эксперименты для выяснения этого вопроса.

Суммируя полученные данные по действию фенольных соединений на бактерии, следует отметить, что растительные фенолы действуют на бактерии двумя путями: при более высоких концентрациях они ингибируют рост планктонных и биопленочных бактерий, защищая растения от фитопатогенных бактерий, в то время как при более низких концентрациях они повышают способность бактерий формировать биопленки, могут увеличивать синтез АГЛ и факторов вирулентности бактерий.

Стимуляция формирования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58 наблюдалась также при низких концентрациях гормонов растений – салициловой, абсцизовой, индолил-3-уксусной и гиббереллиновой кислот. Несколько неожиданным для нас было наблюдение, что индолил-3-уксусная кислота существенно подавляет рост бактерий в сравнительно невысоких концентрациях – 200 мкг/мл для *A. tumefaciens* C58 и 25-200 мкг/мл для *P. aeruginosa* PAO1. Таким образом, это соединение может действовать двояко - как фитогормон, стимулирующий рост растений, и как средство для конкурентной борьбы микроорганизмов. Известно, что фитогормоны салициловая кислота, жасмоновая кислота и этилен участвуют в защитных реакциях растений против фитопатогенов. Абсцизовая кислота (гормон тормозящий рост растений), а также гормоны роста растений ауксин (индолил-3-уксусная кислота), гиббереллиновая кислота, цитокинины и брассиностероиды также недавно были признаны в качестве важных участников иммунитета растений. Поэтому, действие на гормональные пути и изменение гормонального гомеостаза может быть эффективной стратегией, с помощью которой микроорганизмы вносят изменения в иммунитет организма-хозяина [88; 303; 306; 331]. Известно, что многие бактерии, ассоциированные с растениями, могут синтезировать заметные количества фитогормонов (ауксинов, гиббереллинов, цитокинов и др.), необходимые им как для собственного развития, так и для взаимодействия с растениями и другими почвенными микроорганизмами [88; 290; 327; 331].

Эффект стимуляции образования биопленок при действии субингибиторных концентраций растительных фенолов и фитогормонов был показан нами впервые; он определяет новую сторону взаимодействия растений и бактерий.

Далее, было рассмотрено влияние на образование биопленок окислителя – пероксида водорода. Представляло интерес выяснить, будут ли при действии этого окислителя на образование биопленок наблюдаться те же закономерности, что и при действии фенольных соединений, обладающих антиоксидантной активностью (хотя некоторые полифенолы могут проявлять при определенных концентрациях прооксидантную активность) [260]. Оказалось, что пероксид водорода в субингибиторных или слабо подавляющих рост бактерий концентрациях также повышает образование биопленок *P. aeruginosa*. Та же закономерность наблюдалась и при изучении образования биопленок у *B. cenocepacia* 370 в присутствии пероксида водорода, но не у *A. tumefaciens* C58, т.е. у агробактерии имелись, по-видимому, какие-то отличия в регуляции формирования биопленок, возможно, связанные с различиями в составе матрикса или системах коммуникаций этих бактерий. Известно, что основными компонентами матрикса биопленки *A. tumefaciens* являются такие экзополисахариды как целлюлоза, униполярный полисахарид, циклические β -глюканы и др., в то время как у *P. aeruginosa* – альгинат, Psl- и Pel- экзополисахариды [22; 100; 122; 186; 288].

Для выяснения зависимости стимуляции образования биопленок от QS систем регуляции был использован метод введения в клетки бактерий гетерологичного гена *aiiA* (ген гомосеринлактоназы AiiA из *Bacillus*). С помощью специфических биосенсоров было подтверждено действие этого фермента – отсутствие синтеза C4-HSL и существенное снижение синтеза 3-охо-C12-HSL клетками *P. aeruginosa*. Результатом введения гена *aiiA* было отсутствие стимуляции образования биопленок у этой бактерии при субингибиторных и слабо подавляющих рост концентрациях пероксида водорода, что подтверждает зависимость этого эффекта от QS систем регуляции. В случае введения гена *aiiA* в клетки *B. cenocepacia* 370 стимуляция образования биопленок сохранялась, но величина эффекта снижалась. Можно предположить следующие объяснения этого факта: 1) как показал анализ с использованием биосенсора *A. tumefaciens* NT1/pZLR4, клетки *B. cenocepacia* 370 синтезируют еще некоторое количество N-октаноил-гомосеринлактона; возможно, его хватает для регуляции стимуляции образования биопленок, хотя эффект уменьшается в результате уменьшения количества синтезированного АГЛ и снижения функционирования систем QS регуляции; 2) возможно, другие системы QS регуляции *B. cenocepacia* иной природы ответственны за этот феномен. По крайней мере, для одной из них (BDSF-направляемой QS системы) показана роль в контроле образования биопленок [109].

Каков же механизм стимулирующего действия концентраций H_2O_2 , слабо подавляющих рост бактерий, на формирование биопленок? Как известно, действие H_2O_2 на клетки вызывает оксидативный стресс, в результате которого повреждаются различные клеточные компоненты – липиды мембран, белки, нуклеиновые кислоты и др. При оксидативном стрессе индуцируется синтез большого количества белков, обеспечивающих защиту клеток, таких, как каталазы, алкил-гидропероксид редуктазы, супероксиддисмутазы. Основным регулятором, осуществляющим глобальную регуляцию ответа на оксидативный стресс, является белок OxyR; недавно было показано, что его мишени включают до 56 генов [156; 310]. Биопленки более устойчивы к действию пероксида водорода и могут защищать бактерии от воздействия H_2O_2 [141; 207]. Поэтому среди белков, индуцируемых в ответ на оксидативный стресс, могут быть те, которые участвуют в образовании биопленок.

Показано, что при оксидативном стрессе OxyR требуется для регуляции миграции клеток по поверхности среды (сворминг, swarming), которая способствует образованию биопленок, и участвует в регуляции синтеза рамнолипидов, необходимых для формирования биопленок *P. aeruginosa* [123; 310]. Действие на биопленки *P. aeruginosa* PAO1 H_2O_2 приводило к появлению мукоидных вариантов, которые продуцируют в 2-6 раз больше альгината (альгинат входит в состав матрикса биопленок). Т.е. стимуляция образования биопленок в присутствии H_2O_2 - это механизм защиты бактерий от действия пероксида водорода [79; 156; 244].

При формировании биопленок при действии H_2O_2 важна QS регуляция: было показано, что устойчивость *P. aeruginosa* к H_2O_2 в биопленках зависит от QS систем [79; 141; 310]. Если QS регуляция блокирована мутациями в генах QS систем или ингибиторами QS систем, устойчивость биопленок (как и планктонных клеток) к H_2O_2 снижается. QS системы позитивно регулируют экспрессию многих факторов, участвующих в образовании биопленок: синтез полисахаридов (экспрессия *pel* оперона), синтез альгината, внеклеточной ДНК (компонент матрикса биопленок), рамнолипидов и др. [107; 209].

Таким образом, приведенные данные показывают, почему может происходить стимуляция формирования биопленок в присутствии H_2O_2 и почему она зависит от QS систем. Эти данные, по-видимому, не исчерпывают всех механизмов влияния H_2O_2 на образование биопленок. Необходимы дальнейшие эксперименты для выяснения этого вопроса.

Было показано, что пероксид водорода не эффективен против уже сформированной микробной биоплёнки *P. aeruginosa*: биополимеры матрикса биопленки адсорбируют большие количества выделяемой каталазы, и пероксид водорода не успевает проникнуть вглубь биопленки, разлагаясь на ее поверхности без вреда для бактерий [174]. Мы также не наблюдали заметного действия H_2O_2 на зрелые биопленки *P. aeruginosa* (данные не приводятся).

Стимуляция формирования биопленок при субингибиторных концентрациях антибактериальных агентов была показана ранее для ряда антибиотиков с различной структурой и разными механизмами действия на клетки бактерий, например, аминогликозидов, тетрациклина, β -лактаминового антибиотика имипенема и др. [150; 168; 200; 233]. По данным Hoffman et al. (2005), *arr* ген *P. aeruginosa* (от aminoglycoside response regulator - кодирует c-di-GMP фосфодиэстеразу, которая деградирует c-di-GMP и снижает внутриклеточные концентрации c-di-GMP) важен для стимуляции образования биопленок в присутствии субингибиторных концентраций аминогликозидов; у мутантов *P. aeruginosa* по этому гену стимуляции образования биопленок в этих условиях не происходило. Молекулярный механизм ответа клеток на тобрамицин включает изменения в уровне c-di-GMP, который играет существенную роль в регуляции образования биопленок. Пока неясно, можно ли с помощью этого механизма объяснить стимуляцию образования биопленок при действии субингибиторных концентраций других соединений [150].

С помощью технологии микрочипов (microarray technology) было идентифицировано 34 гена, которые были индуцированы или репрессированы в биопленках *P. aeruginosa* при действии имипенема в субингибиторных концентрациях. Среди них экспрессия пяти генов, вовлеченных в альгинатный метаболизм (*algD*, *algG*, *algJ*, *algF* и *algA*), была индуцирована более чем в 10 раз. Синтез альгината и формирование биопленок *P. aeruginosa* были также увеличены; этот факт указывает на то, что индукция биопленок *P. aeruginosa* в ответ на действие субингибиторных концентраций имипенема, очевидно, предполагает положительную регуляцию биосинтеза альгината [168; 233].

С другой стороны, субингибиторные дозы диклоксациллина (β -лактаминный антибиотик узкого спектра действия класса пенициллинов), напротив, угнетали формирование биоплёнок *S. epidermidis* и *S. haemolyticus* [92]. В отношении антибиотиков другой группы, макролидов (например, эритромицин, азитромицин, кларитромицин), было показано, что действие их субингибиторных концентраций приводило к снижению формирования и стабильности биопленок бактерий *H. influenzae*, *P. aeruginosa* и др. [44; 227; 279; 320], а также к ингибированию QS систем, образованию пилей, жгутиков и миграции бактерий по поверхности среды, т.е. свойств, важных для формирования биопленок [38; 168].

Однако затем было обнаружено, что макролидный антибиотик азитромицин в суббактериостатических концентрациях может стимулировать формирование биопленок бактерий *Dietzia* sp. и *Kocuria* sp. При этом добавление азитромицина или рифампицина после завершения этапа обратимой адгезии приводило к снижению или отсутствию эффекта стимуляции образования биопленок [36; 168]. Описаны и другие примеры повышения образования биопленок при действии макролидных антибиотиков у грамположительных и грамотрицательных бактерий. По-видимому, этот феномен тонко регулируется условиями среды, концентрацией антибактериального агента, состоянием культур бактерий и зависит также от антибиотика и исследуемых штаммов бактерий [168].

В работах Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов ИМГ РАН было обнаружено, что увеличение формирования биопленок *P. aeruginosa* PAO1 происходит в присутствии в среде субингибиторных концентраций лекарственных препаратов нитрофурановой природы и доноров NO [324].

Стимуляцию образования биопленок малыми дозами различных веществ можно отнести к более общему феномену, который принято обозначать термином «гормезис (hormesis)». Этот термин означает «стимулирующее действие умеренных доз стрессоров; стимуляцию какой-либо системы организма внешними воздействиями, имеющими силу, недостаточную для проявления вредных факторов». Термин введен С. Зонтманом и Д. Эрлихом в 1943 г. [84]. Эта особенность характерна, например, для антибиотиков; показано, что антибиотики в высоких дозах подавляют рост бактерий или убивают их, но в низких, субингибиторных дозах функционируют как сигнальные молекулы, модулируя транскрипцию генов, действуя на большое количество клеточных процессов [89; 150; 168; 200; 233; 279; 315]. Соединения с антибактериальной активностью, включая и изученные в нашей работе, по-видимому, также могут выступать как сигнальные молекулы, действуя на экспрессию генов, участвующих в процессах формирования биопленок.

Разнообразие химических соединений, вызывающих стимуляцию (индукцию) образования бактериальных биопленок у различных бактерий, дает основание предполагать, что в регуляции этого феномена играет роль глобальный ответ на клеточный стресс, а не какой-то единичный механизм. С этим согласуются данные о том, что в регуляции индукции образования биопленок при субингибиторных дозах антибиотиков участвуют глобальные регуляторы c-di-GMP и ppGpp [74; 150; 168].

Данные о стимуляции образования биопленок при действии антибактериальных агентов важны для медицины: стимуляция формирования биопленок патогенными бактериями может способствовать их выживанию после лечения с применением антибактериальных средств, когда низкие концентрации этих препаратов остаются в

организме человека; в результате возможен рецидив заболевания, поэтому необходимо полное уничтожение патогенной микрофлоры при лечении [82; 89; 139; 145].

Этот вывод относится и к нашим результатам, полученным с растительными фенолами и фитогормонами. Как уже указывалось, фенольные соединения, включая те, действие которых было исследовано в настоящей работе, являются компонентами многих медицинских растений, используемых в фитотерапии. Интерес к комплексным фитопрепаратам увеличивается, исследуется состав фенольных компонентов в них и действие индивидуальных соединений (антиоксидантное, антимикробное и др.). Поэтому особенности действия различных фенольных соединений на образование биопленок, которые мы показали, должны учитываться при разработке и введении в медицинскую практику новых препаратов растительного происхождения. Это же верно и при использовании гормона фенольной природы салициловой кислоты. Полученные данные следует учитывать также и при использовании повсеместно применяемого антисептика – пероксида водорода.

В последней части работы было исследовано действие на образование биопленок и на зрелые биопленки летучих органических соединений, выделяемых бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*. Впервые было обнаружено, что штаммы *P. chlororaphis* и *P. fluorescens* могут подавлять образование биопленок *A. tumefaciens* в результате синтеза летучих соединений, и один из штаммов, *P. fluorescens* B-4117, убивает клетки в составе зрелой биопленки. Индивидуальные ЛОС - ДМДС, кетоны (2-нонанон, 2-гептанон, 2-ундеканон) – подавляли образование биопленок *A. tumefaciens* C58 и убивали бактерии в уже образованной биопленке. Стимуляции образования биопленок при действии этих веществ не наблюдалось. Здесь также прослеживалась корреляция с QS регуляцией. Ранее было показано (в совместной работе сотрудников Лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов и Иерусалимского университета), что пул летучих веществ, образуемых указанными штаммами, и отдельно ДМДС подавляют функционирование QS систем регуляции бактерий [96]. В данной работе было обнаружено ингибирующее действие кетонов на экспрессию генов QS систем. И, хотя исследование проводилось на биосенсорах, сконструированных на основе *E. coli*, и эффекты были невелики, тем не менее, они свидетельствуют в пользу того, что изученные ЛОС могут оказывать влияние и на QS регуляцию, которая участвует в контроле образования биопленок.

Биопленки бактерий, ассоциированных с растениями и патогенных для растений, играют значительную роль во взаимодействии микроорганизмов с растениями в ризосфере. Полученные данные, показывающие роль ЛОС в антагонистических отношениях микроорганизмов, должны поэтому учитываться при разработке новых методов

биологического контроля заболеваний растений, вызванных микробными фитопатогенами. Ранее предположили, что ДМДС, который обычно продуцируется некоторыми растениями, в том числе видами *Allium* и *Brassica*, играет естественную роль в защите растений, действуя как фумигант [183]. Под торговой маркой PALADIN™ недавно начали тестирование ДМДС в качестве нового предпосадочного почвенного фумиганта. Была показана активность ДМДС в контроле фитопатогенных грибов, почвенных патогенов и нематод. Помимо ДМДС, некоторые другие ЛОС, продуцируемые ризосферными бактериями, в том числе коммерчески доступные летучие антимикробные соединения, могут обеспечить фунгистатические и бактериостатические эффекты в почве [83; 103; 119; 166]. Наряду с этим было показано, что некоторые ЛОС способны убивать *Drosophila melanogaster* (используется в качестве модельного насекомого), что предполагает дополнительную потенциальную роль ЛОС, в качестве защитников растений от насекомых [157; 246]. Полученные в работе результаты расширяют эти наблюдения и указывают на потенциал некоторых групп ЛОС, испускаемых ризосферными и другими микроорганизмами, в защите растений, в том числе экономически важных сельскохозяйственных культур, от микробных патогенов растений. Однако, для подтверждения этого потенциала и для того чтобы выявить химические процессы, лежащие в основе наблюдаемых эффектов, необходимы дальнейшие исследования действия ЛОС, продуцируемых микроорганизмами, на широкий спектр целевых организмов в природной среде.

VI. ВЫВОДЫ

1. Показано, что растительные фенольные соединения и фитогормоны в субингибиторных или слабо подавляющих бактериальный рост концентрациях стимулируют образование биопленок у бактерий *P. aeruginosa* PAO1 и *A. tumefaciens* C58.
2. Обнаружено, что синтез N-3-оксо-додеканоил-гомосеринлактона клетками *P. aeruginosa* PAO1 увеличивается при концентрации в среде фенольных соединений от 40 до 400 мкг/мл. Эти данные свидетельствуют в пользу возможной взаимосвязи между стимуляцией образования биопленок и функционированием QS Las-системы *P. aeruginosa* PAO1. Фенольные соединения не активировали экспрессию генов синтаз АГЛ в биосенсорах, т.е. они не были способны замещать АГЛ при взаимодействии с рецепторными белками LuxR типа.
3. Способность клеток *P. aeruginosa* PAO1 к сворминг, свимминг и твитчинг миграции не изменяется или уменьшается в присутствии растительных фенолов при различных концентрациях данных веществ.
4. Пероксид водорода в субингибиторных или слабо подавляющих бактериальный рост концентрациях стимулирует образование биопленок *P. aeruginosa* PAO1 и *B. cenocepacia* 370. Введение в клетки плазмиды pME 6863, содержащей клонированный гетерологичный ген гомосеринлактоназы, деградирующей АГЛ, приводит к отсутствию эффекта стимуляции формирования биопленок у *P. aeruginosa* PAO1 и его уменьшению у *B. cenocepacia* 370. Эти данные показывают, что стимулирование образования биопленок в присутствии пероксида водорода зависит от функционирования QS систем регуляции этих бактерий.
5. Впервые показано на модели *A. tumefaciens* C58, что летучие органические вещества, образуемые бактериями родов *Pseudomonas* и *Serratia*, подавляют образование биопленок и вызывают гибель клеток в уже сформированных биопленках. Кроме того, ЛОС могут подавлять функционирование QS систем регуляции бактерий.

VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Н.В., Степанова Т.В., Толордава Э.Р. Разработка средств борьбы с биоплёнками: влияние препарата «Лапрот» (на основе человеческого лактоферрина) и антибиотика ципрофлоксацина на рост и процесс образования биоплёнок бактериями *Pseudomonas aeruginosa in vitro* // Медицинский алфавит. Лаборатория. 2010. №3: С. 4-9.
2. Афиногенова А.Г., Даровская Е.Н. Микробные биоплёнки ран: состояние вопроса // Травматология и ортопедия России. 2011. №3: С. 119–125.
3. Бехало В.А., Бондаренко В.М., Сысолятина Е.В., Нагурская Е.В. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток, входящих в состав «медицинских биопленок» // Микробиология. 2010. № 4: С. 97–107.
4. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В., Орлова О.Г. и др. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл // Журн. микробиол. 2010. № 6: С. 66–70.
5. Бухарин О.В., Чуркина Л.Н., Перунова Н.Б. и др. Влияние антистафилококкового антибиотика батумина на биоплёнкообразование микроорганизмов // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. № 2: С. 8–12.
6. Веселова М.А., Липасова В.А., Зайцева Ю.В. Мутанты *Burkholderia cenocepacia* с измененным синтезом N-ацил-гомосеринлактонов, сигнальных молекул Quorum Sensing регуляции // Генетика. 2012. Т. 48, № 5: С. 608-616.
7. Винник Ю.С., Перьянова О.В., Онзуль Е.В., Теплякова О.В. Микробные биопленки в хирургии: механизмы образования, лекарственная устойчивость, пути решения проблемы // Новости хирургии. 2010. Т. 18. №6: С. 115-125.
8. Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Романова Н.И., Цирульникова О.М. Госпитальная микрофлора и биопленки. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2012. Т. XIV. № 3: С. 83–91.
9. Голуб А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клинический микробиологический журнал. 2012, Т. 14. № 1: С. 23-29.
10. Доброхотский, О.Н. Хомяков Ю.Н., Хомякова Т.И. Эпидемиологическое значение биоплёнок в технических системах // Жизнь без опасностей. Здоровье. Профилактика. Долголетие. 2008. № 4: С. 78–80.
11. Зайцева Ю.В., Волошина П.В., Лиу Х., и др. Участие глобальных регуляторов GtrS, RpoS и Quorum Sensing системы SplIR в регуляции формирования биопленок у *Serratia plymuthica* // Генетика. 2010., Т. 46: С. 616-621.

12. Зигангирова Н.А., Гинцбург А.Л. Мишень специфический поиск антивирулентных препаратов для лечения хронических инфекций // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. 2011. № 4: С. 107–115.
13. Караев З.О., Мамедова Л.Р. Влияние лекарственных препаратов на образование биопленок *Candida albicans* // Проблемы медицинской микологии. 2010. № 3: С. 10–12.
14. Козлов Р.С., Голуб А.В. Катетер-ассоциированные инфекции кровотока: предупредить или лечить? // Клиническая Микробиология Антимикробная Химиотерапия. 2010. Т. 12. №1: С. 23-30.
15. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Кутырев В.В. Бактериальная биопленка и особенности ее образования у возбудителя чумы и других патогенных иерсиний // Проблемы особо опасных инфекций. 2011. вып. 110: С. 5-11.
16. Липасова В.А., Атамова Э.Э., Веселова М.А., Тарасова Н.Н., Хмель И.А. Экспрессия гена N-ацил-гомосеринлактоназы *aiiA* влияет на свойства ризосферного штамма *Pseudomonas Chlororaphis* 449 // Генетика. 2009. Т. 45. №1: С. 38-42.
17. Льюис К. Персистирующие клетки и загадка выживания биоплёнок // Биохимия. 2005. Т. 70. №2: С. 327-336.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование // Москва. 1984. Издательство «Мир».
19. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стратегия управления бактериальным биопленочным процессом. // Журнал Инфектологии. 2012. Т. 4. № 3: С. 5-15.
20. Маянский А.Н., Чеботарь И.В., Руднева Е.И., Чистякова В.П. *Pseudomonas aeruginosa*: характеристика биопленочного процесса // Мол. ген. микробиол. вирусол. 2012. № 1: С. 3–8.
21. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. Издательство «Мир». 1976.
22. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. 2007. Т. 76. № 2: С. 149–163.
23. Плакунов В.К., Николаев Ю.А. Микробные биопленки: перспективы использования при очистке сточных вод // Вода: химия и экология. 2008. № 2: С. 11–13.
24. Плакунов В.К., Стрелкова Е.А., Журина М.В. Персистенция и адаптивный мутагенез в биоплёнках // Микробиол. 2010. Т. 79. №4: С. 447-458.
25. Плюта В.А., Липасова В.А., Кузнецов А.Е., Хмель И.А. Действие салициловой, индолил-3-уксусной, гиббереллиновой и абсцизовой кислот на образование биопленок бактериями *Agrobacterium tumefaciens* C58 и *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Биотехнология. 2012. № 3: С. 53-58.
26. Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Вострикова О.П., Хоменко В.А., Соловьева Т.Ф. Бактериальные порины как перспективные антигены для диагностики и

- вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний // Вестник ДВО РАН. 2004. № 3: С. 35—44.
27. Пронина Е.А., Швиденко И.Г., Шуб Г.М., Шаповал О.Г. Влияние электромагнитного излучения на частотах молекулярного спектра поглощения и излучения кислорода и оксида азота на адгезию и образование биопленок *P. aeruginosa* // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 6: С. 61–64.
28. Пуриш Л. М., Асауленко Л. Г., Абдулина Д. Р., Васильев В. Н., Иутинская Г. А. Роль экзополимерного комплекса в формировании биопленки на поверхности стали коррозионно-агрессивными бактериями // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 3: С. 294–301.
29. Пыльник С.В., Дик И.Г. Моделирование потребления субстрата биопленкой на поверхности частично погруженного вращающегося диска // Теоретические основы химической технологии. 2011. Т. 45. №1: С. 15–22.
30. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Смирнова Т.А., Андреев А.Л., Диденко Л.В., Гинцбург А.Л. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунол. 2006. № 4: С. 38–42.
31. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина // Журн. микробиол. 2011. № 3. С. 99–109.
32. Романова Ю.М., Степанова Т.В., Нестеренко Л.Н., и др. Персистенция бактерий *Burkholderia cenocepacia in vivo* в зависимости от их способности к образованию биопленок // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2009. №4: С. 29–33.
33. Скоробогатых Ю.И., Перунова Н.В., Курлаев П.П., Бухарин О.В. Экспериментальное изучение комбинации ципрофлоксацина с окситоцином на образование биоплёнок условно-патогенными бактериями // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. 2010. № 6: С. 3–7.
34. Смирнова А.Т., Диденко Л.В., Романова Ю.М., Азизбемян Р.Р. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиология. 2010. Т. 79. №4: С. 435 – 446.
35. Степанова Т.В., Романова Ю.М., Алексеева Н.В. и др. Разработка средств борьбы с биопленками: изучение воздействия полисахаридных лиаз на матрикс биопленок, образуемых *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cenocepacia* // Мед. алфавит. Лаборатория. 2010. № 1: С. 47–51.

36. Стрелкова Е.А., Журина М.В., Плакунов В.К., Беляев С.С. Стимуляция антибиотиками процесса формирования бактериальных биоплёнок // Микробиология. 2012. Т. 81. № 2; С. 282–285.
37. Тец Г.В. Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биоплёнок с антибиотиками (экспериментальное исследование): автореф. дис. канд. мед. наук // Санкт-Петербург. 2007. С. 23
38. Тец В.В., Артеменко Н.К., Заславская Н.В., Тец Г.В. Особенности действия азитромицина на бактериальные биопленки возбудителей пневмоний // Антибиотики и химиотерапия. 2007. Т. 52. №6: С. 9–12.
39. Тец В.В., Кнорринг Г.Ю., Артеменко Н.В. и др. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии // Антибиотики и химиотерапия. 2004. Т. 49. №12: С. 9–13.
40. Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Правдин В.Г. и др. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения // Фундаментальные исследования. 2012. №1: С. 184-192.
41. Хмель И.А. Quorum Sensing регуляция экспрессии генов, фундаментальные и прикладные аспекты, роль в коммуникации бактерий // Микробиология. 2006. Т. 75. С. 457-464.
42. Хмель И.А., Кокшарова О.А., Радциг М.А. Антибактериальные эффекты ионов серебра: на рост грамотрицательных бактерий и образование биопленок // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2009. №4: С. 27–31.
43. Хмель И.А., Метлицкая А.З. Quorum Sensing регуляция экспрессии генов — перспективная мишень для создания лекарств против патогенности бактерий // Мол. биология. 2006. Т. 40. №2: С. 195–210.
44. Хренов П.А., Честнова Т.В. Обзор методов борьбы с микробными биоплёнками при воспалительных заболеваниях // Вестник новых медицинских технологий. 2013. №1 - Электронное издание.
45. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий // Клин микробиол и антимикроб химиотер. 2012. Т. 14. №1: С. 51–58.
46. Чеботарь И.В., Погорелов А.Г., Яшин В.А., Гурьев Е.Л., Ломинадзе Г.Г. Современные технологии исследования бактериальных биопленок // Современные технологии в медицине. 2013. Т. 5. №1: С. 14-20.
47. Честнова Т.В., Серегина Н.В. Особенности существования бактерий в составе биопленок на примере уропатогенных кишечных палочек // Вестн. новых мед. технологий. 2010. Т. 17. № 4: С. 28-30.

48. Шпаков А.О. Сигнальные молекулы бактерий непептидной природы QS-типа // Микробиология. 2009. Т. 78. №2: С. 163–175.
49. Abdel-Mawgoud A.M., Lepine F., Deziel E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86 (5). P. 1323–1336.
50. Achouak W., Heulin T., Pages J.M. Multiple facets of bacterial porins // FEMS Microbiol. Lett. 2001. V. 199. P. 1–7.
51. Aguirre-Ramírez M., Medina G., González-Valdez A., Grosso-Becerra V., Soberón-Chávez G. The *Pseudomonas aeruginosa* rmlBDAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhlR and the alternative sigma factor σ^S // Microbiology. 2012. V. 158 (Pt 4). P. 908-916.
52. Akunna J.C. Jefferies C. Performance of family size sequencing batch reactor and rotating biological contactor units treating sewage at various operating conditions // Wat. Sci. Technol. 2000. V. 41 (1). P. 97.
53. Allan N.D., Kool C., Sokol A., Beveridge T.J. Putative virulence factors are released in associated with membrane vesicles from *Burkholderia cepacia* // Can. J. Microbiol. 2003. V. 49. P. 613–624.
54. Allison K.R., Brynildsen M.P., Collins J.J. Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them // Curr. Opin. Microbiol. 2011. V. 14. P. 593–598.
55. Almeida A.A., Farah A., Silva D.A., Nunan E.A., Gloria M.B. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria // J Agric Food Chem. 2006. V. 54. P. 8738-8743.
56. Ambrosi C., Tiburzi F., Imperi F., Putignani L., Visca P. Involvement of AlgQ in transcriptional regulation of pyoverdine genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J Bacteriol. 2005. 187 (15). P. 5097-5107.
57. An S., Wu J., Zhang L.H. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain // Appl. Environ. Microbiol. 2010. V. 76 (24). P. 8160–8173.
58. Antoiani D., Bocci P, Maciag A., Raffaelli N., Landini P. Monitoring of diguanylate cyclase activity and of cyclic-di-GMP biosynthesis by whole-cell assays suitable for high-throughput screening of biofilm inhibitors // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 85 (4). P. 1095–1104.
59. Asally M., Kittisopikul M., Rue P., et al. Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012. V. 109. P. 18891–18896.
60. Ata A., Betteridge J., Schaub E., et al. Microbial reactions on 7 α -hydroxyfrullanolide and evaluation of biotransformed products for antibacterial activity // Chem. Biodivers. 2009. V. 6. P. 1453—1462.

61. Attila C., Ueda A., Wood T.K. 5-Fluorouracil reduces biofilm formation in *E. coli* K-12 through global regulator AriR as an antivirulence compound // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 82 (3). P. 525–533.
62. Aviram M. Introduction to paraoxonases // *J Lipids.* 2012. V. 2012. P. 687273. doi: 10.1155/2012/687273.
63. Azeredo J., Sutherland I.W. The use of phages for the removal of infectious biofilms // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. V. 9 (4). P. 261–266.
64. Bais H.B., Fall R., Vivanco J.M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 307–319.
65. Banin E., Brady K.M., Greenberg E.P. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm // *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. V. 72 (3). P. 2064–2069.
66. Baron, C. Antivirulence drugs to target bacterial secretion systems // *Curr. Opin. Microbiol.* 2010. V. 13 (1). P. 100–105.
67. Barraud N., , Schleheck D., Klebensberger J., et al. Nitric oxide signaling in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191 (23). P. 7333–7342.
68. Barret M., Morrissey J.P., O'Gara F. Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence // *Biol. Fertil. Soils.* 2011. V. 47. P. 729–743.
69. Bassler B.L., Losick R. Bacterially speaking // *Cell.* 2006. V. 125. P. 237–246.
70. Batrakov S.G., Rodionova T.A., Esipov S.E., et al. A novel lipopeptide, an inhibitor of bacterial adhesion, from the thermophilic and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* strain 603 // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1634. P. 107–115.
71. Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Jakobsen T.H., et al. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during lung infection of cystic fibrosis patients // *PLoS One.* 2010. V. 5 (4). P. e10115.
72. Blango M.G., Mulvey M.A. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54 (5). P. 1855–1863.
73. Bodini S.F., Manfredini S., Epp M., Valentini, S., Santori F. Quorum sensing inhibition activity of garlic extract and p-coumaric acid // *Lett Appl Microbiol.* 2009. V. 49. P. 551–555.
74. Boehm A., Steiner S., Zaehring F., et al. Second messenger signaling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress // *Mol. Microbiol.* 2009. V. 72. P. 1500–1516.
75. Bogino P.C., Oliva Mde L., Sorroche F.G., Giordano W. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations // *Int J Mol Sci.* 2013. V. 14 (8). P. 15838–15859.

76. Bordi C., Lamy M.C., Ventre I., et al. Regulatory RNAs and the HptB/RetS signalling pathways fine-tune *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis // Mol. Microbiol. 2010. V. 76. P. 1427–1443.
77. Borlee B., Goldman A.D., Murakami K., et al. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix // Mol. Microbiol. 2010. V. 75 (4). P. 827–842.
78. Brackman G., Cos P., Maes L., Nelis H.J., Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo* // Antimicrob Agents Chemother. 2011. V. 55. P. 2655-2661.
79. Breidenstein E.B., de la Fuente-Núñez C., Hancock R.E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance // Trends Microbiol. 2011. V. 19. P. 419-426.
80. Brencic A., Eberhard A., Winans S.C. Signal quenching, detoxication and mineralization of vir gene-inducing phenolics by the VirH2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* // Mol Microbiol. 2004. V. 51. P. 1103–1115.
81. Bryan R., Feldman M., Jawetz S.C., et al. The effects of aerosolized dextran in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection // J. Infect. Dis. 1999. V. 179 (6). P. 1449–1458.
82. Bryers J.D. Medical biofilms // Biotechnol. Bioeng. 2008. V. 100 (1). P. 1–18.
83. Cabrera J.A., Wang D., Gerik J.S., Gan J. Spot drip application of dimethyl disulfide as a post-plant treatment for the control of plant-parasitic nematodes and soilborne pathogens in grape production // Pest Manag Sci. 2013. doi: 10.1002/ps.3666.
84. Calabrese E., Baldwin L. Defining hormesis // Hum Exp Toxicol. 2002. V. 21. P. 91-97.
85. Calfee M., Shelton J., McCubrey J., Pesci E. Solubility and bioactivity of the *Pseudomonas* quinolone signal are increased by a *Pseudomonas aeruginosa*-produced surfactant // Infect. Immun. 2005. V. 73. P. 878-882.
86. Camilli A., Bassler B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways // Science. 2006. V. 311. P. 1113–1116.
87. Camps J., Pujol I., Ballester F., Joven J., Simó J.M. Paraoxonases as potential antibiofilm agents: their relationship with quorum-sensing signals in gram-negative bacteria // Antimicrob. Agents. Chemother. 2011. V. 55 (4). P. 1325–1331.
88. Cao F.Y., Yoshioka K., Desveaux D. The roles of ABA in plant-pathogen interactions // J. Plant Res. 2011. V. 124. P. 489—499.
89. Cargill J.S., Upton M. Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* // J Clin Pathol. 2009. V. 62. P. 1112-1116.

90. Carson L., Gorman S.P., Gilmore B.F. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* // FEMS Immunol Med Microbiol. 2010. V. 59 (3). P. 447–455.
91. Cegelski L., Pinkner J.S., Hammer N.D., et al. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation // Nat. Chem. Biol. 2009. V. 5 (12). P. 913–919.
92. Cerca N., Martins S., Sillankorva S., et al. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms // Appl Environ Microbiol. 2005. V. 71. P. 8677-8682.
93. Chandler J.R., Duerkop B.A., Hinz A., et al. Mutational analysis of *Burkholderia thailandensis* quorum sensing and self-aggregation // J Bacteriol. 2009. V. 191. P. 5901-5909.
94. Chauhan A., Lebeaux D., Decante B., et al. A rat model of central venous catheter to study establishment of long-term bacterial biofilm and related acute and chronic infections // PLoS One. 2012. V. 7: e37281.
95. Chemani C., Imberty A., de Bentzmann S., et al. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands // Infect. Immun. 2009. V. 77 (5). P. 2065–2075.
96. Chernin L., Toklikishvili N., Ovadis M., et al. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles // Environ Microbiol Rep. 2011. V. 3 (6). P. 698-704.
97. Christensen L.D., Moser C., Jensen P.Ø., et al. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on biofilm persistence in an *in vivo* intraperitoneal foreign-body infection model // Microbiology. 2007. V. 153 (Pt.7). P. 2312–2320.
98. Cleary J., Lai L.C., Shaw R.K., et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin // Microbiology. 2004. V. 150 (Pt.3). P. 527– 538.
99. Coleman J.P., Hudson L.L., McKnight S.L., et al. *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase // J Bacteriol. 2008. V. 190 (4). P. 1247-1255.
100. Colvin K.M., Gordon V.D., Murakami K., et al. The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa* // PLoS Pathog. 2011. V. 7: e1001264.
101. Cos P., Tote K., Horemans T., Maes L. Biofilms: an extra hurdle for effective antimicrobial therapy // Curr. Pharm. Des. 2010. V. 16. P. 2279–2295.
102. Croda-García G., Grosso-Becerra V., Gonzalez-Valdez A., Servín-González L., Soberón-Chávez G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR // Microbiology. 2011. V. 157 (Pt.9). P. 2545-2555.

103. Dandurishvili N., Toklikishvili N., Ovadis M., et al. Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants // J. Appl. Microbiol. 2011. V. 110. P. 341-352.
104. Danhorn T., Hentzer M., Givskov M., Parsek M.R., Fuqua C. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR–PhoB regulatory system // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 4492–4501.
105. Davies D.G., Marques C.N. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms // J. Bacteriol. 2009. V. 191 (5). P. 1393–1403.
106. Demidyuk I.V., Kalashnikov A.E., Gromova T.Y., et al. Cloning, sequencing, expression, and characterization of protealysin, a novel neutral proteinase from *Serratia proteamaculans* representing a new group of thermolysin-like proteases with short N-terminal region of precursor // Protein Expr Purif. 2006. V. 47. P. 551–561.
107. De Kievit T.R. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Environ. Microbiol. 2009. V. 11 (2). P. 279—288.
108. de Lima Pimenta A., Chiaradia-Delatorre L.D., Mascarello A., et al. Synthetic organic compounds with potential for bacterial biofilm inhibition, a path for the identification of compounds interfering with quorum sensing // Int J Antimicrob Agents. 2013. pii: S0924-8579(13)00265-3. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.07.006.
109. Deng Y., Boon C., Eberl L., Zhang L.H. Differential modulation of *Burkholderia cenocepacia* virulence and energy metabolism by the quorum-sensing signal BDSF and its synthase // J Bacteriol. 2009. V. 191. P. 7270-7278.
110. Diggle S.P., Cornelis P., Williams P., Cámara M. 4-quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives // Int J Med Microbiol. 2006. V. 296 (2-3). P. 83-91.
111. Diggle S.P., Stacey R.E., Dodd C., et al. The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa* // Environ. Microbiol. 2006. V. 8 (6). P. 1095–1104.
112. Douglas C.J., Halperin E., Nester W.W. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected for attachment to plant cells // J. Bacteriol. 1982. V. 152. P. 1265–1275.
113. Driffield K., Miller K., Bostock J.M., O'Neill A.J., Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms // J Antimicrob Chemother. 2008. V. 61. P. 1053-1056.
114. Dunne W.M. Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? // Clin Microbiol Rev. 2002. V. 15. P. 155-166.
115. Edwards S.J., Kjellerup B.V. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals // Appl Microbiol Biotechnol. 2013. V. 97. P. 9909-9921.

116. Erickson D., Lines J., Pesci E., Venturi V., Storey D. *Pseudomonas aeruginosa* relA contributes to virulence in *Drosophila melanogaster* // Infect Immun. 2004. V. 72. P. 5638-5645.
117. Farag M.A., Ryu C.M., Sumner L.W., Paré P.W. GC-MS SPME profiling of rhizobacterial volatiles reveals prospective inducers of growth promotion and induced systemic resistance in plants // Phytochemistry. 2006. V. 67. P. 2262–2268.
118. Fazli M., O'Connell A., Nilsson M., et al. The CRP/FNR family protein Bcam1349 is a c-di-GMP effector that regulates biofilm formation in the respiratory pathogen *Burkholderia cenocepacia* // Mol. Microbiol. 2011. V. 82. P. 327–341.
119. Fernando W.G.D., Ramarathnam R., Krishnamoorthy A.S., Savchuk S.C. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol // Soil Biol Biochem. 2005. V. 37. P. 955–964.
120. Filloux, A. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution, and function // Front. Microbiol. 2011. V. 2 (1). P. 1–21.
121. Finnie A.A., Williams D.N. Paint and coatings technology for the control of marine fouling // In: Durr S, Thomason JC, editors. Biofouling. 2010. Oxford: Wiley-Blackwell. P. 185–206.
122. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. // Nat Rev Microbiol. 2010. V. 8 (9). P. 623–633.
123. Folsom J.P., Richards L., Pitts B., et al. Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. 294.
124. Friedman M. Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas // Mol Nutr Food Res 2007. V. 51. P. 116-134.
125. Fritsch J. Dimethyl disulfide as a new chemical potential alternative to methyl bromide in soil disinfection in France // Acta Horti (ISHS). 2005. V. 698. P. 71–76.
126. Fronzes R., Remaut H., Waksman G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in gram-negative bacteria // EMBO J. 2008. V. 27. P. 2271–2280.
127. Fuchs E.L., Brutinel E.D., Jones A.K., et al. The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms // J Bacteriol. 2010. V. 192 (14). P. 3553-3564.
128. Fuxman Bass J.I., Russo D.M., Gabelloni M.L., et al. Extracellular DNA: a major proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // J. Immunol. 2010. V. 184 (11). P. 6386–6395.
129. Gelvin S.B. Plant proteins involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation // Annu Rev Phytopathol. 2010. V. 48. P. 45-68.
130. Gelvin S.B. Traversing the Cell: *Agrobacterium* T-DNA's journey to the host genome // Front Plant Sci. 2012. V. 3. P. 52.

131. Geske G.D., O'Neill J.C., Miller D.M., Mattmann M.E., Blackwell H.E. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of N-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129, № 44. P. 13613–13625.
132. Giltner C.L., van Schaik E.J., Audette G.F., et al. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 59 (4). P. 1083–1096.
133. Givskov M., de Nys R., Manefield M., et al. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling // *J Bacteriol.* 1996. V. 178. P. 6618-6622.
134. Gjermansen M., Nilsson M., Yang L., Tolker-Nielsen T. Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 75. P. 815– 826.
135. González N., Heeb S., Valverde C., et al. Genome-wide search reveals a novel GacA-regulated small RNA in *Pseudomonas* species // *BMC Genomics.* 2008. V. 9. P. 167.
136. Gooderham W.J., Hancock R.E. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa* // *FEMS Microbiol Rev.* 2009. V. 33 (2). P. 279-294.
137. Guo M., Gamby S., Zheng Y., Sintim H.O. Small molecule inhibitors of AI-2 signaling in bacteria: state-of-the-art and future perspectives for anti-Quorum Sensing agents // *Int J Mol Sci.* 2013. V. 14 (9). P. 17694-17728.
138. Guo S., Lee H.P., Teo S.L., Khoo B.C. Inhibition of barnacle cyprid settlement using low frequency and intensity ultrasound // *Biofouling.* 2012. V. 28. P. 131–141.
139. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections // *Cel. Microbiol.* 2009. V. 11 (7). P. 1034–1043.
140. Hancock V., Dahl M., Klemm P. Abolition of biofilm formation in urinary tract *E. coli* and *Klebsiella* isolates by metal interference through competition for Fur // *Appl. Environ. Microbiol.* 2010. V. 76 (12). P. 3836–3841.
141. Harmsen M., Yang L., Pamp S.J., Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2010. V. 59. P. 253–268.
142. Harriott M.M., Noverr M.C. Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation // *Antimicrob Agents Chemother.* 2010. V. 54. P. 3746-3755.
143. Harrison F., Buckling A. Siderophore production and biofilm formation as linked social traits // *ISME.* 2009. V. 3 (5). P. 632–634.

144. Haussler S., Becker T. The pseudomonas quinolone signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations // PLoS Pathog. 2008. V. 4:e1000166.
145. Haussler S., Fuqua C. Biofilms 2012: new discoveries and significant wrinkles in a dynamic field // J Bacteriol. 2013. V. 195. P. 2947-2958.
146. Hentzer M., Teitzel G.M., Balzer G.J. et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function // J. Bacteriol. 2001. V. 183. P. 5395–5401.
147. Heun M., Binnenkade L., Kreienbaum M., Thormann K.M. Functional specificity of extracellular nucleases of *Shewanella oneidensis* MR-1 // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. P. 4400–4411.
148. Heurlier K., Williams F., Heeb S., et al. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J Bacteriol. 2004. V. 186. P. 2936-2945.
149. Hjelmgaard T., Persson T., Rasmussen T.B., Givskov M., Nielsen J. Synthesis of furanone-based natural product analogues with quorum sensing antagonist activity // Bioorg. Med. Chem. 2003. V. 11 (15). – P. 3261–3271.
150. Hoffman L.R., D'Argenio D.A., MacCoss M.J., et al. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation // Nature. 2005. V. 436. P. 1171–1175.
151. Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms // Int. J. Antimicrob. Agents. 2010. V. 35. P. 322–332.
152. Holmberg A., Morgelin M., Rasmussen M. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against *Enterococcus faecalis* in biofilms // J. Antimicrob. Chemoter. 2012. V. 67 (2). P. 433–439.
153. Hosseinidou Z., Van de Ven T.G., Tufenkji N. Bacterial capture efficiency and antimicrobial activity of phage-functionalized model surfaces // Langmuir. 2011. V. 27. P. 5472–5480.
154. Howard-Flanders P., Theriot L. Mutants of *Escherichia coli* K-12 defective in DNA repair and in genetic recombination // Genetics. 1966. V. 53. P.1137-1150.
155. Huang C.T., James G., Pitt W.G., Stewart P.S. Effects of ultrasonic treatment on the efficacy of gentamicin against established *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 1996. V. 6. P. 235-242.
156. Imlay J.A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide // Annu Rev Biochem. 2008. V. 77. P. 755-776.
157. Inamdar A.A., Masurekar P., Bennett J.W. Neurotoxicity of fungal volatile organic compounds in *Drosophila melanogaster* // Toxicol. Sci. 2010. V. 117. P. 418–426.

158. Itoh Y., Wang X., Hinnebusch B.J., Preston J.F. 3rd, Romeo T. Depolymerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187 (1). P. 382–387.
159. Ivanov I.E., Boyd C.D., Newell P.D., et al. Atomic force and super-resolution microscopy support a role for LapA as a cell-surface biofilm adhesin of *Pseudomonas fluorescens* // *Res. Microbiol.* 2012. V. 163. P. 685-691.
160. Jagani S., Chelikani R., Kim D.S. Effects of phenol and natural phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* // *Biofouling* 2009. V. 25. P. 321-324.
161. Jain R., Behrens A.J., Kaefer V., Kazmierczak B.I. Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations // *J. Bacteriol.* 2012. V. 194. P. 4285– 4294.
162. Jakobsen T.H., Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Givskov M., Høiby N. Targeting quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: current and emerging inhibitors // *Future Microbiol.* 2013. V. 8 (7). P. 901-921.
163. Jakobsen T.H., van Gennip M., Phipps R.K., et al. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing // *Antimicrob Agents Chemother.* 2012. V. 56 (5). P. 2314-2325.
164. Jensen V., Lons D., Zaoui C., et al. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. P. 8601–8606.
165. Jude F., Kohler T., Branny P., et al. Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa* // *J Bacteriol.* 2003. V. 185. P. 3558-3566.
166. Kai M., Hausteil M., Molina F., et al. Bacterial volatiles and their action potential // *Appl. Microbiol. Biotech.* 2009. V. 81. P. 1001-1012.
167. Kanno E., Kawakami K., Miyairi S., et al. Neutrophil-derived tumor necrosis factor- α contributes to acute wound healing promoted by N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone from *Pseudomonas aeruginosa* // *J Dermatol Sci.* 2013. V. 70. P. 130-138.
168. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation // *Int J Artif Organs.* 2011. V. 34. P. 737-751.
169. Kaplan J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses // *J. Dent. Res.* 2010. V. 89 (3). P. 205–218.
170. Karatan E., Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009. V. 73 (2). P. 310–347.
171. Kearns D.B. A field guide to bacterial swarming motility // *Nat Rev Microbiol.* 2010. V. 8 (9). P. 634-644.

172. Keays T., Ferris W., Vandemheen K.L., et al. A retrospective analysis of biofilm antibiotic susceptibility testing: a better predictor of clinical response in cystic fibrosis exacerbations // *J Cyst Fibros*. 2009. V. 8. P. 122-127.
173. Kerekes E.B., Deák E., Takó M., et al. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms // *J Appl Microbiol*. 2013. doi: 10.1111/jam.12289.
174. Kim J., Hahn J.S., Franklin M.J., Stewart P.S., Yoon J. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents // *J Antimicrob Chemoth*. 2009. V. 63. P. 129–135.
175. Kirov S.M., Webb J.S., O'may C.Y., et al. Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis // *Microbiology*. 2007. V. 153 (Pt.10). P. 3264–3274.
176. Klemm P., Vejborg R.M., Hancock V. Prevention of bacterial adhesion // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2010. V. 88 (2). P. 451–459.
177. Koh C.L., Sam C.K., Yin W.F., et al. Plant-derived natural products as sources of anti-quorum sensing compounds // *Sensors (Basel)*. 2013. V. 13 (5). P. 6217-6228.
178. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // *Cell*. 2007. V. 130. P. 797– 810.
179. Kolodkin-Gal I., Romero D., Cao S., et al. D-aminoacids trigger biofilm disassembly // *Science*. 2010. V. 328 (5978). P. 627–629.
180. Körpi A., Järnberg J., Pasanen A. L. Microbial volatile organic compounds // *Crit. Rev. Toxicol*. 2009. V. 39. P. 139–193.
181. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era / *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013. V. 3: a010306.
182. Kreft J.U. Biofilm promote altruism // *Microbiol*. 2004. V. 150. P. 2751–2760.
183. Kyung K.H., Lee Y.C. Antimicrobial activities of sulfur compounds derived from S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides in *Allium* and *Brassica* // *Food Rev Int*. 2001. V. 17. P. 183–198.
184. Lamarche M.G., Déziel E. MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline) // *PLoS One*. 2011. V. 6 (9). P. e24310.
185. Landini P., Antoniani D., Burgess J.G., Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2010. V. 86 (3). P. 813–823.
186. Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development // *Intern. Microbiol*. 2006. V. 9 (1). P. 21–28.

187. Lasa I., Penades J. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation // Res. Microbiol. 2006. V. 157. P. 99–107.
188. Lazar V., Chifiriuc M.C. Architecture and physiology of microbial biofilms // Roum Arch Microbiol Immunol. 2010. V. 69 (2). P. 95–107.
189. Lazar V., Chifiriuc M.C. Medical significance and new therapeutical strategies for biofilm associated infections // Roum Arch. Microbiol. Immunol. 2010. V. 69 (3). P. 125–138.
190. Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine // J Agric Food Chem. 2003. V. 51. P. 7292-7295.
191. Lee J., Wu J., Deng Y., Wang J., et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response // Nat Chem Biol. 2013. V. 9 (5). P. 339-343.
192. Lefebvre M.D., Valvano M.A. Construction and evaluation of plasmid vectors optimized for constitutive and regulated gene expression in *Burkholderia cepacia* complex isolates // Appl Environ Microbiol. 2002. V. 68 (12). P. 5956-5964.
193. Lellouche J., Friedman A., Gedanken A., Banin E. Antibacterial and antibiofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles // Int. J. Nanomedicine. 2012. V. 7. P. 5611–5624.
194. Lesic B., Lépine F., Déziel E., et al. Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective antiinfective compounds // PLoS Pathogens. 2007. V. 3 (9). P. 1229-1239.
195. Lewis K. Persister cells // Annu Rev Microbiol. 2010. V. 64. P. 357-372.
196. Li C., Wally H., Miller S.J., Lu C.D. The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis, and prophage activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // J Bacteriol. 2009. V. 191 (20). P. 6211-6218.
197. Li Q., Ni H., Meng S., et al. Suppressing *Erwinia carotovora* pathogenicity by projecting N-acyl homoserine lactonase onto the surface of *Pseudomonas putida* cells // J Microbiol Biotechnol. 2011. V. 21 (12). P. 1330-1335.
198. Li X.Z., Nikaido H., Williams K.E. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 6127-6132.
199. Liang H., Deng X., Ji Q., et al. The *Pseudomonas aeruginosa* global regulator VqsR directly inhibits QscR to control quorum-sensing and virulence gene expression // J Bacteriol. 2012. V. 194 (12). P. 3098-3108.
200. Linares J.F., Gustaffson I., Baquero F., Martinez J.L. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 19484—19489.
201. Lindsay A., Ahmer B.M. Effect of sdiA on biosensors of N-acylhomoserine lactones // J Bacteriol. 2005. V. 187 (14). P. 5054-5058.

202. Liu Y., Li J. Role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in the initial adhesion, growth and detachment of *Escherichia coli* in porous media // *Environ. Scien. Technol.* 2008. V. 42 (2). P. 443–449.
203. Luján A.M., Moyano A.J., Segura I., Argaraña C.E., Smania A.M. Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa* *mutS* strain // *Microbiology*. 2007. V. 153 (Pt.1). P. 225–237.
204. Ma L. Conover M., Lu H., et al. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5 (3). P. e1000354.
205. Ma Q., Yang Z., Pu M., Peti W., Wood T.K. Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal // *Environ. Microbiol.* 2011. V. 13 (3). P. 631–642.
206. Macchi A., Ardito F., Marchese A., Schito G.C., Fadda G. Efficacy of N-acetyl-cysteine in combination with thiamphenicol in sequential (intramuscular/aerosol) therapy of upper respiratory tract infections even if sustained by bacterial biofilms // *J Chemother.* 2006. V. 18. P. 507-513.
207. Mai-Prochnow A., Lucas-Elio P., Egan S. Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria // *J. Bacteriol.* – 2008. V. 190 (15). P. 5493–5501.
208. Mandal S.M., Chakraborty D., Dey S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses // *Plant Signaling Behavior*. 2009. V. 5. P. 359–368.
209. Mandsberg L.F., Ciofu O., Kirkby N., et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system // *Antimicrob Agents Chemother.* 2009. V. 53. P. 2483-2491.
210. Manolescu B.N. Paraoxonases as protective agents against N-acyl homoserine lactone - producing pathogenic microorganisms // *Maedica (Buchar)*. 2013. V. 8 (1). P. 49-52.
211. Marti M. Trotonda M.P., Tormo-Más M.A., et al. Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus* // *Microbes Infect.* 2010. V. 12 (1). P. 55–64.
212. Martinelli E., Suffredini M., Galli G., et al. Amphiphilic block copolymer/poly(dimethylsiloxane) (PDMS) blends and nanocomposites for improved fouling-release // *Biofouling*. 2011. V. 27. P. 529–541.
213. Mathur T., Singhal S., Khan S., et al. Adverse effect of staphylococci slime on *in vitro* activity of glycopeptides // *Jpn J Infect Dis.* 2005. V. 58. P. 353-357.
214. McClean K.H., Winson M.K., Fish L., et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones // *Microbiology*. 1997. V. 143 (Pt.12). P. 3703-3711.
215. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilms // *Curr Protoc Microbiol.* 2005. Chapter 1: Unit 1B.1. doi: 10.1002/9780471729259.mc01b01s00.

216. Mikkelsen H., Ball G., Giraud C., Filloux A. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupD fimbrial genes is antagonistically controlled by RcsB and the EAL-containing PvrR response regulators // PLoS One. 2009. V. 4: e6018.
217. Mikkelsen H., Bond N.J., Skindersoe M.E. Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology. 2009. V. 155 (3). P. 687–698.
218. Mikkelsen H., Sivaneson M., Filloux A. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* // Environ Microbiol. 2011. V. 13 (7). P. 1666-1681.
219. Moen M.D., Lyseng-Williamson K.A., Scott L.J. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections // Drugs. 2009. V. 69. P. 361-392.
220. Molina L., Constantinescu F., Michel L., et al. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism // FEMS Microbiol Ecol. 2003. 45 (1). P. 71-81.
221. Monds R., O'Toole G. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review // Trends Microbiol. 2009. V. 17 (2). P. 73–87.
222. Moons P., Michiels C.W., Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms // Crit. Rev. Microbiol. 2009. V. 35 (3). P. 157–168.
223. Moore L.W., Chilton W.S., Canfield M.L. Diversity of opines and opine-catabolizing bacteria isolated from naturally occurring crown gall tumors // Appl. Environ. Microbiol. 1997. V. 63. P. 201–207.
224. Morgan R., Kohn S., Hwang S.H., Hassett D.J., Sauer K. BdIA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. 2006. V. 188 (21). P. 7335–7343.
225. Morgenstein R.M., Szostek B., Rather P.N. Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis* // FEMS Microbiol Rev. 2010. V. 34 (5). P. 753-756.
226. Moscoso J.A., Mikkelsen H., Heeb S., Williams .P, Filloux A. The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling // Environ. Microbiol. 2011. V. 13. P. 3128 –3138.
227. Nalca Y., Jansch L., Bredenbruch F., et al. Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. V. 50 (5). P. 1680–1688.
228. Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria // Science. 2011. V. 334. P. 982-986.

229. Nikolov L., Karamanev D., Dakov L., Popova V. Oxidation of ferrous iron by *Thiobacillus ferrooxidans* in a full-scale rotating biological contactor // Environmental Progress. 2001. V. 20 (4). P. 247.
230. Nithya C. Begum M.F., Pandian S.K. Marine bacterial isolates inhibit biofilm formation and disrupt mature biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88 (1). P. 341–358.
231. Njoroge J., Sperandio V. Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases // EMBO Mol. Microbiol. 2009. V. 1 (4). P. 201–210.
232. Nocek B., Kochinyan S., Proudfoot M., et al. Polyphosphate-dependent synthesis of ATP and ADP by the family-2 polyphosphate kinases in bacteria // Proc Natl Acad Sci USA. 2008. V. 105 (46). P. 17730-17735.
233. Nucleo E., Steffanoni L., Fugazza G., et al. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* // BMC Microbiology. 2009. V. 9. P. 270.
234. Oglesby L.L., Jain S., Ohman D.E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization // Microbiology. 2008. V. 154 (Pt.6). P. 1605–1615.
235. O'Grady N.P., Alexander M., Burns L.A., et al. Summary of recommendations: guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections // Clin Infect Dis. 2011. V. 52 (9). P. 1087-1099.
236. O'Toole G.A. How *Pseudomonas aeruginosa* regulates surface behaviors // Microbe. 2008. V. 3 (2). P. 65–71.
237. Ovadis M., Liu X., Gavriel S., et al. The global regulator genes from biocontrol strain *Serratia plymuthica* IC1270: cloning, sequencing, and functional studies // J. Bacteriol. 2004. V. 186. P. 4986–4993.
238. Overhage J., Campisano A., Bains M. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation // Infect Immun. 2008. V. 76. P. 4176-4182.
239. Ozaki K., Ohta A., Iwata C., et al. Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds // Chemosphere. 2008. V. 71. P. 1531–1538.
240. Pagel M., Simonet V., Li J., et al. Phenotypic characterization of pore mutants of the *Vibrio cholerae* porin OmpU // J Bacteriol. 2007. V. 189. P. 8593-8600.
241. Pamp S.J., Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. 2007. V. 189 (6). P. 2531–2539.
242. Peach K.C., Bray W.M., Shikuma N.J., et al. An image-based 384-well high-throughput screening method for the discovery of biofilm inhibitors in *Vibrio cholerae* // Mol. Biosyst. 2011. V. 7. P. 1176–1184.

243. Pintucci J.P., Corno S., Garotta M. Biofilms and infections of the upper respiratory tract // *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2010. V. 14. P. 683–690.
244. Pliuta V.A., Andreenko Iu.V., Kuznetsov A.E., Khmel' I.A. Formation of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms in the presence of hydrogen peroxide; the effect of the *aiiA* gene / *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 2013. V. 4. P. 10-14.
245. Plyuta V., Zaitseva J., Lobakova E., Zagorskina N., Kuznetsov A., Khmel I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* // *APMIS*. 2013. V. 121. P.1073-1081.
246. Popova A.A., Koksharova O.A., Lipasova V.A., et al. Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster* // *Biomed Res Int*. 2014. doi: 10.1155/2014/125704.
247. Potthoff E., Guillaume-Gentil O., Ossola D., et al. Rapid and serial quantification of adhesion forces of yeast and Mammalian cells // *PLoS One*. 2012. V. 7: e52712.
248. Pugsley A. The two-component response regulator PprB modulates quorum-sensing signal production and global gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* // *Mol Microbiol*. 2008. V. 69 (3). P. 780.
249. Qian P.Y., Chen L., Xu Y. Mini-review: Molecular mechanisms of antifouling compounds // *Biofouling*. 2013. V. 29. P. 381-400.
250. Radzig M.A., Nadtochenko V.A., Koksharova O.A., et al. Antibacterial effects of silver nanoparticles on Gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013. V. 102. P. 300-306.
251. Rakhimova E., Wiehlmann L., Brauer A.L. *Pseudomonas aeruginosa* population biology in chronic obstructive pulmonary disease // *J. Of Inf. Dis*. 2009. V. 200 (12). P. 1928–1935.
252. Rampioni G., Schuster M., Greenberg E.P., Zennaro E., Leoni L. Contribution of the RsaL global regulator to *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation // *FEMS Microbiol Lett*. 2009. V. 301 (2). P. 210-217.
253. Rasmussen T.B., Givskov M. Quorum sensing inhibitors: a bargain of effects // *Microbiology*. 2006. V. 152 (4). P. 895–904.
254. Rasmussen T.B., Skindersoe M.E., Bjarnsholt T. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species // *Microbiology*. 2005. V. 151 (5). P. 1325–1340.
255. Reimann C., Ginet N., Michel L., et al. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. // *Microbiology*. 2002. V. 148. P. 923-932.

256. Rodríguez-Martínezemail J.M., Ballesta S., Pascual A. Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Int J Antimicrob Agents. 2007. V. 30. P. 366-368.
257. Rutherford S.T., Bassler B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control // Cold Spring Harb Perspect Med. 2012. V. 2 (11). pii: a012427.
258. Ryan R.P., Dow J.M. Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria // Trends Microbiol. 2011. V. 19 (3). P. 145–152.
259. Sadovskaya I., Vinogradov E., Li J., et al. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the ndvB gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated β -(1→3)-glucans, which bind aminoglycosides // Glycobiology. 2010. V. 20. P. 895-904.
260. Samoiloova Z., Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. Medicinal plant extracts variously modulate susceptibility of *Escherichia coli* to different antibiotics // Microbiol Res. 2014. V. 169. P. 307-313.
261. Santoro M.V., Zygadlo J., Giordano W., Banchio E. Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*) // Plant Physiol. Biochem. 2011. V. 49. P. 1177–1182.
262. Satpute S.K., Banat I.M., Dhakephalkar P.K., et al. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms // Biotechnol. Adv. 2010. V. 28 (4). P. 436–450.
263. Sciaky D., Montoya A.L., Chilton M.D. Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids // Plasmid. 1978. V. 1. P. 238-253.
264. Serate J., Roberts G.P., Berg O., Youn H. Ligand responses of Vfr, the virulence factor regulator from *Pseudomonas aeruginosa* // J Bacteriol. 2011. V. 193 (18). P. 4859-4868.
265. Shaw P.D., Ping G., Daly S.L., et al. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 6036-6041.
266. Shetty N.P., Mehrabi R., Lütken H., et al. Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat // New Phytol. 2007. V. 174. P. 637-647.
267. Shi X., Zhu X. Biofilm formation and food safety in food industries // Trends in Food Science and Technology. 2009. V. 20. P. 407-413.
268. Simm R., Fetherston J., Kader A., et al. Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins // J. Bacteriol. 2005. V. 187 (19). P. 6816–6823.
269. Singh R., Ray P., Das A., Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms // J Antimicrob Chemother. 2010. V. 65. P. 1955-1958.

270. Sintim H.O., Smith J.A., Wang J., et al. Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules // *Future Med. Chem.* 2010. V. 2 (6). P. 1005–1035.
271. Sivakumar P.M., Prabhawathi V., Doble M. 2-Methoxy-2',4'-dichloro chalcone as an antimicrofoulant against marine bacterial biofilm // *Colloids Surf B: Biointerfaces.* 2010. V. 81. P. 439–446.
272. Skindersoe M.E., Alhede M., Phipps R., et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. V. 52 (10). P. 3648-3663.
273. Skindersoe M.E., Ettinger-Epstein P., Rasmussen T.B. Quorum sensing antagonism from marine organisms // *Mar. Biotechnol.* 2008. V. 10 (1). P. 56–63.
274. Smith, A.W. Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? // *Adv Drug Deliv Rev.* 2005. V. 29. P. 1539–1550.
275. Solares C.A., Barta P.S., Hall G.S., et al. Treatment of chronic rhinosinusitis exacerbations due to methicillinresistant *Staphylococcus aureus* with mupirocin irrigation // *Am J Otolaryngol.* 2006. V. 27. P. 161-165.
276. Sonnleitner E., Haas D. Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011. V. 91 (1). P. 63-79.
277. Stanley N., Lazazzera B. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 52 (4). P. 917–924.
278. Starkey M., Hickman J.H., Ma L., et al. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung // *J. Bacteriol.* 2009. V. 191 (11). P. 3492–3503.
279. Starner T.D., Shrout J.D., Parsek M.R., Appelbaum P.C., Kim G. Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm formation and diminish established biofilms // *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. V. 52. P. 137-145.
280. Steindler L., Venturi V. Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors // *FEMS Microbiol. Lett.* 2007. V. 266. P. 1–9.
281. Stewart P.S., Franklin M.J. Physiological heterogeneity in biofilms // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. V. 6. P. 199–210.
282. Stiefel P., Schmidt F.I., Dorig P., et al. Cooperative vaccinia infection demonstrated at the single-cell level using FluidFM // *Nano Lett.* 2012. V. 12. P. 4219–4227.
283. Stoodley P., Sauer R., Davies D., Costerton J.W. Biofilms as complex differentiated communities // *Annu. Rev. Microbiol.* 2002. V. 56. P. 187–209.
284. Stoodley P., Wilson S., Hall-Stoodley L., et al. Growth and detachment of cells clusters from mature mixed-species biofilms // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. P. 5608–5613.

285. Storz G., Vogel J., Wassarman K.M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers // *Mol. Cell*. 2011. V. 43 (6). P. 880–891.
286. Street C.N., Gibbs A., Pedigo L., Andersen D., Loebel N.G. *In vitro* photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture // *Photochem. Photobiol.* 2009. V. 85 (1). P. 137–143.
287. Sun A.Y., Wang Q., Simonyi A., Sun G.Y. Botanical phenolics and brain health // *Neuromol. Med.* 2008. V. 10. P. 259—274.
288. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework // *Microbiology*. 2001. V. 147 (Pt. 1). P. 3–9.
289. Swiderska A., Berndtson A.K., Cha M.R., et al. Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator. Interactions with the TraM anti-activator // *J Biol Chem*. 2001. V. 276 (52). P. 49449-49458.
290. Takahashi S., Sato R., Takahashi M., et al. Ectopic localization of auxin and cytokinin in tobacco seedlings by the plant-oncogenic AK-6b gene of *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 // *Planta*. 2013. V. 238. P. 753-770.
291. Tarr P.I., Bilge S.S., Vary J.C. Jr., et al. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure // *Infect. Immun.* 2000. V. 68 (3). P. 1400–1407.
292. Taylor E.N., Webster T.J. The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention // *Int. J. Nanomedicine*. 2009. V. 4. P. 145–152.
293. Tetz G.V., Artemenko N.K., Tetz V.V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. V. 53 (3). P. 1204–1209.
294. Thomas R., Brooks T. Common oligosaccharides moieties inhibit the adherence of typical and atypical respiratory pathogens // *J. Med. Microbiol.* 2004. V. 53 (9). P. 833–840.
295. Tielker D., Hacker S., Loris R., et al. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation // *Microbiology*. 2005. V. 151 (5). P. 1313–1323.
296. Tran V.B., Fleiszig S.M., Evans D.J., Radke C.J. Dynamics of flagellum- and pilus-mediated association of *Pseudomonas aeruginosa* with contact lens surfaces // *Appl. Environ. Microbiol.* 2011. V. 77 (11). P. 3644–3652.
297. Twomey K.B., O'Connell O.J., McCarthy Y., et al. Bacterial cis-2-unsaturated fatty acids found in the cystic fibrosis airway modulate virulence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* // *ISME J*. 2012. V. 6 (5). P. 939-950.

298. Ueda A., Wood T.K. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885) // PLoS Pathog. 2009. V. 5. P. e1000483.
299. Val D.L., Cronan JE Jr. *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases // J Bacteriol. 1998. V. 180. P. 2644-2651.
300. Valle J., Da Re S., Henry N., et al. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103 (33). P. 12558–12563.
301. Valm A.M., Mark Welch J.L., Borisy G.G. CLASI-FISH: principles of combinatorial labeling and spectral imaging // Syst. Appl. Microbiol. 2012. V. 35. P. 496–502.
302. Valm A.M., Mark Welch J.L., Rieken C.W., et al. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. V. 108. P. 4152–4157.
303. Venturi V., Fuqua C. Chemical signaling between plants and plant-pathogenic bacteria // Annu Rev Phytopathol. 2013. V. 51. P. 17-37.
304. Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., et al. Living on a surface: swarming and biofilm formation // Trends Microbiol. 2008. V. 16 (10). P. 496-506.
305. Veselova M., Kholmeckaya M., Klein S., et al. Production of N-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria // Folia Microbiol (Praha). 2003. V. 48 (6). P. 794-798.
306. Walker T.S., Bais H.P., Deziel E., et al. *Pseudomonas aeruginosa* – plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation // Plant Physiol. 2004. V. 134. P. 320–331.
307. Wang L.H., Weng L.X., Dong Y.H., Zhang L.H. Specificity and enzyme kinetics of the quorum-quenching N-Acyl homoserine lactone lactonase (AHL-lactonase) // J Biol Chem. 2004. V. 279. P. 13645-13651.
308. Wang W., Morohoshi T., Ikeda T., Chen L. Inhibition of Lux quorum-sensing system by synthetic N-acyl-L-homoserine lactone analogous // Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2008. V. 40. P. 1023-1028.
309. Waters C.M., Bassler B.L. The *Vibrio harveyi* quorum-sensing system uses shared regulatory components to discriminate between multiple autoinducers // Genes Dev. 2006. V. 20. P. 2754–2767.
310. Wei Q., Minh P.N., Dötsch A., et al. Global regulation of gene expression by OxyR in an important human opportunistic pathogen // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. 4320–4333.

311. Wei X., Huang X., Tang L., Wu D., Xu Y. Global control of GacA in secondary metabolism, primary metabolism, secretion systems, and motility in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18 // J Bacteriol. 2013. V. 195 (15). P. 3387-3400.
312. Wenke K., Kai M., Piechulla B. Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms // Planta. 2010. V. 231. P. 499–506.
313. White C.E., Winans S.C. Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* // Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007. V. 363 (1483). P. 1135-1148.
314. Wilder C.N., Diggle S.P., Schuster M. Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: the roles of the las, rhl and pqs quorum-sensing systems // ISME J. 2011. V. 5 (8). P. 1332-1343.
315. Winson M.K., Swift S., Fish L., et al. Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing // FEMS Microbiol Lett. 1998. V. 163 (2). P. 185-192.
316. Xavier J.B., Picioreanu C., Rani S.A., van Loosdrecht M.C., Stewart P.S. Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modelling study // Microbiology. 2005. V. 151 (Pt.12). P. 3817–3832.
317. Xiao G., He J., Rahme L. Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* mvfR and pqsABCDE gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry // Microbiology. 2006. V. 152. P. 1679-1686.
318. Xu Q.W., Barrios C.A, Cutright T, Newby B.M. Assessment of antifouling effectiveness of two natural product antifoulants by attachment study with freshwater bacteria // Environ Sci Pollut Res. 2005. V. 12. P. 278–284.
319. Yang F., Melo-Braga M.N., Larsen M.R., et al. Battle through signaling between wheat and the fungal pathogen *Septoria tritici* revealed by proteomics and phosphoproteomics // Mol Cell Proteomics. 2013. V. 12. P. 2497-2508.
320. Yang Y.X., Xu Z.H., Zhang Y.Q., et al. A new quorum-sensing inhibitor attenuates virulence and decreases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* // J Microbiol. 2012. V. 50 (6). P. 987-993.
321. Yates E.A., Philipp B., Buckley C., et al. N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa* // Infect Immun. 2002. V. 70. P. 5635-5646.
322. Yoshino H., Miyajima K., Saton O., Nashimoto K. Ammonia removal performance of submerged filter and a rotating biological contactor using an interlocked medium // Fisheries Engineering. 2002. V. 39 (2). P. 145.

323. Yu J., Wu J., Francis K.P., Purchio T.F., Kadurugamuwa J.L. Monitoring *in vivo* fitness of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* mutants in a mouse biofilm infection model // J Antimicrob Chemother. 2005. V. 55. P. 528-534.
324. Zaitseva J., Granik V., Belik A., Koksharova O., Khmel I. Effect of nitrofurans and generators on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Burkholderia cenocepacia* 370 // Res. Microbiol. 2009. V. 160. P. 353—357.
325. Zang T., Lee B.W., Cannon L.M., et al. A naturally occurring brominated furanone covalently modifies and inactivates LuxS // Bioorg Med Chem Lett. 2009. V. 19 (21). P. 6200-6204.
326. Zapata M., Silva F., Luza Y., Wilkens M., Riquelme C. The inhibitory effect of biofilm produced by wild bacterial isolates to the larval settlement of the fouling ascidia *Ciona intestinalis* and *Pyura praeputialis* // Electron. J. Biotechnol. 2007. V. 10 (1). P. 1–11.
327. Zhang H., Kim M.S., Krishnamachari V., et al. Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis // Planta. 2007. V. 226. P. 839–851.
328. Zhang H.B., Wang L.H., Zhang L.H. Detection and analysis of quorum-quenching enzymes against acyl homoserine lactone quorum-sensing signals // Curr Protoc Microbiol. 2007. Chapter 1: Unit 1C.3.
329. Zhang W., Sileika T.S., Chen C., et al. A novel planar flow cell for studies of biofilm heterogeneity and flow-biofilm interactions // Biotechnol. Bioeng. 2011. V. 108. P. 2571–2582.
330. Zhao T., Liu Y. N-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa* // BMC Microbiol. 2010. V. 10. P. 140–148.
331. Zhao Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development // Annu Rev Plant Biol. 2010. V. 61. P. 49-64.
332. Zhu J, Winans S. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization // Proc Natl Acad Sci USA. 2001. V. 98. P. 1507-1512.
333. Zhu Y., Nam J., Humara J.M., et al. Identification of Arabidopsis rat mutants // Plant Physiol. 2003. V. 132. P. 494–505.
334. Zinger-Yosovich K.D., Iluz D., Sudakevitz D., Gilboa-Garber N. Blocking of *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum* lectins by diverse mammalian milks // J. Dairy Sci. 2010. V. 93 (2). P. 473–482.
335. Zips A.G, Schaule A.A, Flemming H.C. Ultrasound as a means of detaching biofilms // Biofouling. 1990. V. 2. P. 323-333.
336. Zoo R., Ornek D., Syrett B.C., et al. Inhibiting mild steel corrosion from sulfate-reducing bacteria using antimicrobial-producing biofilms in Three-Mile-Island process water // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. V. 64. P. 275– 283.