

МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ДИНАМІКИ ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК УМОВНО-ПАТОГЕННИМИ БАКТЕРІЯМИ

О. Сідашенко, О. Воронкова, О. Сірокваша, А. Вінніков

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара
пр. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ 49000, Україна
e-mail: microb_sidashenko@mail.ru*

Узагальнено дані літератури щодо структурно-функціональних особливостей біоплівки як асоціації зі складним рівнем організації. Представлено інформацію щодо структурних компонентів, етапів формування та значення міжклітинного матриксу біоплівки. Показано, що формування біоплівки – це складний, динамічний процес, який включає в себе кілька етапів. Описано методи, які сьогодні використовують для вивчення біоплівок, насамперед конфокально-лазерну скануючу (КЛСМ), скануючу електронну (СЕМ) та кріо-трансмисивну (ТЕМ) мікроскопії. Вважається, що найперспективнішим методом вивчення біоплівок є використання КЛСМ, оскільки за його допомогою можна спостерігати за нативними біоплівками. Описано роль системи Quorum sensing у формуванні біоплівки, так як це процес координованої експресії генів у популяції бактерій, що регулює специфічну поведінку клітин. Розкрито значення персистерів у стійкості біоплівки до факторів навколишнього середовища, оскільки відомо, що бактерії, які входять до складу біоплівки, є більш стійкими до впливу імунної системи хазяїна й антибактеріальних препаратів. Клітини-персистери, що є метаболічно неактивними, відіграють важливу роль у виживанні бактерій, які входять до складу біоплівки за дії летальних для всіх клітин факторів.

Ключові слова: біоплівка, екзополімерний матрикс, система Quorum sensing, персистери.

Останнім часом показана можливість існування бактерій у формі складноорганізованого співтовариства – біоплівки, що має місце як у зовнішніх умовах, так і в організмі людини, де опосередковує виникнення інфекційного процесу. Перебіг останнього ускладнюється за рахунок набуття бактеріями у плівковій структурі підвищеної стійкості до факторів довкілля, насамперед до антибіотиків [1, 18]. Взагалі існування бактерій у плівковій культурі якісно змінило погляди на патогенез, терапію і профілактику інфекційних захворювань. Особливу увагу викликають умовно-патогенні бактерії, які у складі біоплівки важко піддаються лікуванню та викликають ряд тяжких хронічних інфекцій [3].

Більшість існуючих видів бактерій здатні до надклітинної організації, що підвищує їхню стійкість до агресивних факторів навколишнього середовища, таким як: антибіотики, дезінфектанти і пестициди, фагоцитоз. Найскладнішою формою надклітинної організації патогенних бактерій є біоплівка – мікробна асоціація, яка прикріплена до будь-якої поверхні та об'єднана єдиним екзополімерним матриксом [9, 19].

Одними з найбільш відомих бактерій, що формують біоплівки, є стафілококи [3]. Вони часто викликають позалікарняні нозокомінальні інфекції, а також інфекції верхніх дихальних шляхів, поверхні шкіри та м'яких тканин, ендокардити, ураження сечовидільної системи тощо, які ускладнені формуванням біоплівки. З одного боку, стафілококи колонізують поверхню шкіри та слизові оболонки, а з іншого – викликають різні катетеро-асоційовані плівкові інфекції, які є небезпечними для здоров'я людей [27].

Метою даної роботи було зробити аналіз наукових даних, які стосуються методів вивчення динаміки формування бактеріальних біоплівок, їхньої структури та властивостей.

Структурні компоненти й етапи формування біоплівки

Біоплівка – асоціація мікроорганізмів, прикріплених до субстрату біогенного або абіогенного походження й об'єднаних єдиним екзополімерним матриксом, що пронизаний каналами та порожнинами, по яких рухаються розчинені у воді поживні речовини і кисень [2].

Формування біоплівки – складний динамічний, комплексний процес, який включає в себе декілька етапів: адгезію бактеріальних клітин до поверхні, активний поділ клітин для створення клітинних кластерів і формування екзополімерного слизового матриксу [3].

За хімічним складом екзополімерний матрикс біоплівки неоднорідний і його складові відрізняються у різних видів мікроорганізмів [12, 48, 49]. Загалом екстрацелюлярний шар складається з полісахаридів (декстрин, гіалуронова кислота, целюлоза), ця фракція найбільш виражена і становить приблизно 40–95% [6, 50]. Концентрація інших хімічних компонентів різниться. Вміст білків може становити до 60%, ліпідів – до 40%, нуклеїнових кислот – 1–20% [12, 20]. Дані сполуки перебувають у гідратованому стані, оскільки 80–90% об'єму біоплівки займає вода.

Клітини у слизовому матриксі розташовуються не хаотично, а певним чином. У біоплівці клітини бактерій мають складну поліморфну організацію з певною цитоархітектонікою, оскільки спостерігаються клітини з дуже зміненою морфологією, мертві клітини, різні витягнуті типи у кокоподібних форм тощо [12, 20, 22]. Структура багатоклітинних кластерів представлена у вигляді грибоподібних утворень, які оточені екзополісахаридним шаром, що дає змогу утримувати та підтримувати певну концентрацію поживних речовин, які потрібні для росту популяції, а також захищати клітини від дегідратації, гуморальних і клітинних факторів резистентності макроорганізму. Матрикс біоплівки розділений каналами, які заповнені водою, а також має порожнини та пустоти. Через канали транспортуються поживні речовини та відбувається доставка кисню від зовнішніх до внутрішніх частин біоплівки, одночасно з киснем виводяться бактеріальні метаболіти [49]. Матрикс біоплівки здатний знижувати швидкість дифузії деяких антибіотиків і дезінфектантів. Ці властивості залежать від біохімічного складу та метаболічної активності бактерій півки [3, 21].

Багатшарова топографія біоплівки впливає на метаболізм і фізіологічну активність клітин. Периферійні частини півки більш насичені киснем, ніж центральна частина, де формується анаеробна мікроніша [30]. За допомогою електродів вдалося встановити, що на глибині близько 30 мкм від поверхні біоплівки концентрація кисню різко знижується [52].

Зміна вмісту кисню та кислотності, паралельно зі змінами концентрацій поживних речовин і метаболітів клітин, обумовлюють утворення різномірних областей у біоплівці [12]. Адаптуючись до таких гетерогенних мікроніш, бактерії в біоплівці утворюють багато фенотипів із широкими метаболічними та реплікативними властивостями. Таке співтовариство (популяція) має підвищену стійкість до стресових факторів зовнішнього середовища [16, 37].

Біоплівки з диференційованими клітинами бактерій, із гетерогенними мікронішами і водними каналами, що являють собою примітивну циркуляторну систему, нагадують організацію вищих макроорганізмів, у яких всі диференційовані тканини утворюють складний багатоклітинний організм [3].

На процес формування біоплівки і їхні властивості впливають фактори навколишнього середовища та властивості клітин мікроорганізмів. Найбільш важливими факторами зовнішнього середовища є значення рН, концентрація солей, осмоларність, парціальний тиск, доступність поживних речовин, а також гідрофобність поверхні

розподілу фаз, сила і тип руху рідини стосовно цієї поверхні. Крім того, на бактеріальну адгезію впливають зміни в концентраціях кисню, а також деякі отрути й ультрафіолетове випромінювання. Вважається, що дія різних негативних факторів позитивно впливає на процеси плівкоутворення [7, 37, 59].

У процесі формування біоплівки мають місце генетичні та біохімічні механізми. Специфічним генетичним механізмом можна вважати наявність генів, які реагують на адгезію, й активуються лише при перебуванні культури у біоплівці [60]. Декілька генів реагує на зворотне прикріплення бактеріальних клітин до поверхні, в той час як незворотне – викликає зміну активності вже кількох десятків генів. Наприклад, у *Bacillus subtilis* утворення біоплівки регулюється по типу катаболічної репресії. Наявність специфічних регуляторних систем плівкоутворення було показано для *E. coli* [35, 40], стрептококів [33], стафілококів [54].

Після незворотної адгезії популяція мікроорганізмів починає інтенсивно розмножуватися з утворенням багатоклітинних шарів і активно синтезувати компоненти екзополімерного матриксу. Це один із ключових моментів утворення біоплівки [45].

Прикріплення бактеріальних клітин до поверхні субстрату відбувається за рахунок дії електростатичних і гідрофобних сил, сил Ван дер Ваальса і неспецифічної адгезії [12]. У ході досліджень *in vitro* встановлено, що ступінь адгезії з подальшим формуванням біоплівки найбільш виражений до таких матеріалів, як латекс, силікон, полівінілхлорид. Адгезія до тефлону, поліуретану, нержавіючої сталі й титану спостерігається рідше [20]. Усі перелічені матеріали широко використовуються в медицині, що є додатковим ризиком виникнення біоплівок.

Адгезія до біологічних об'єктів (клітин, тканин, стінок судин) пов'язана зі специфічною взаємодією білків-адгезинів або лектинів фімбрії екзоплазматичного компартмента бактеріальної клітини з рецепторами або певними доменами поверхні мембран клітин-хазяїв. За допомогою таких механізмів прикріплюються грампозитивні та грамнегативні бактерії, наприклад, представники роду *Staphylococcus* і *P. aeruginosa*. Наведемо як приклад адгезію стафілококів до біологічних об'єктів [3].

У процесі адгезії стафілококів важливу роль відіграє PIA (Polysaccharide intercellular adhesin) – полісахарид, який бере участь у клітинній субстратній адгезії з подальшим формуванням клітинних кластерів (клітинно-клітинна адгезія). PIA ініціює гемаглютинацію і перешкоджає фагоцитозу за рахунок клітинної агрегації [58].

Іншим важливим компонентом є α -токсин стафілококів, що кодується геном *hla*. Даний токсин, окрім основної функції – утворення порових каналів у мембранах клітин еукаріот (один із факторів вірулентності), має адгезивні властивості [12]. Мутанти з порушеним біогенезом α -токсину та/або PIA не здатні формувати біоплівки [25].

Також на перших стадіях формування стафілокової біоплівки велику роль відіграють VAP-білки (biofilm associated protein), тейхоєві кислоти і N-ацетилглюкозамін [55]. За процес адгезії, синтез PIA та інших структурних компонентів матриксу біоплівок відповідає *ica-оперон*, що перебуває у складній системі генетичної регуляції, що включає також експресію факторів вірулентності [11, 22, 34]. Всі перелічені компоненти специфічно взаємодіють зі субстратом, вони здійснюють якрну функцію та ініціюють подальші процеси утворення біоплівки [3].

Процес адгезії регулюється наявністю антиадгезинів – специфічних позаклітинних метаболітів, що запобігають зворотній адгезії. Антиадгезини використовуються мікроорганізмами-продуцентами як для регуляції адгезії, так і для боротьби з конкурентами, захищаючи від сторонніх мікроорганізмів уже сформовану біоплівку [5, 7].

Структура біоплівки сприяє процесам обміну генетичною інформацією за рахунок тісного контакту і стабільної просторової локалізації клітин. Дослідження *in vitro* показали, що ступінь кон'югації у біоплівках набагато вищий, ніж у планктонних культурах бактерій, що входять до складу біоплівки [36]. Крім того, процеси кон'югації можуть регулюватися на популяційному рівні за рахунок бактеріальної комунікації [48].

Незважаючи на значну актуальність, мікробні біоплівки залишаються маловивченими. Питаннями, що привертають особливу увагу, лишаються структура, склад і функції компонентів позаклітинного матриксу бактеріальних співтовариств.

Методи вивчення біоплівки

Формування біоплівки умовно-патогенними бактеріями призводить до великих проблем у сучасній медичній практиці. Тому важливим є вивчення структури та складу біоплівки, а також механізмів стійкості бактерій, які входять до її складу, до різних агресивних факторів навколишнього середовища. Сьогодні для вирішення вказаної проблеми активно ведуться пошуки отримання біоплівки *in vitro* та *in vivo* і вивчаються нові методи їх візуалізації, оскільки методи, що використовуються для вивчення рідинних культур бактерій, у даному випадку непридатні.

На сьогодні відомі та широко використовуються методи отримання біоплівки у штучних системах, що дає змогу вивчати їх у певних умовах. Формування біоплівки найчастіше проводять у 96-лункових мікротитрувальних планшетах. Кількісно вивчення сформованих біоплівок здійснюють спектрофотометрично методом підрахунку зв'язаного клітинами барвника [51].

Утворення біоплівки моделюють також у проточних камерах, пробірках, на покривному склі та інших об'єктах. Досліджують фіксовані препарати, зафарбовані генціан фіолетовим або іншими барвниками [7].

Для вивчення живих клітин, процесів їх поділу та руху використовують фазово-контрастний та інтерференційний мікроскопи. При вивченні зафарбованих препаратів широко використовують барвники, які є специфічними для позаклітинного матриксу як основного компонента біоплівки. До них належить, наприклад, вітальний барвник Конго червоний, який при зафарбовуванні біоплівки сальмонел зв'язується з целюлозою та суглі-пілями [53]. Для візуалізації у біоплівці та матриксі бактерій використовують подвійне фарбування за допомогою Конго червоного та фуксину [34]. Слід відмітити, що Конго червоний взаємодіє зі структурованим білковим S-шаром, тому його використовують для відбору штамів грампозитивних бактерій, що продукують регулярний S-шар [1, 8].

Інший індикатор полісахаридів – прижиттєвий барвник калькофлуор – використовують для проведення скринінгових досліджень [7].

Крім Конго червоного та калькофлуору, для світлооптичних спостережень використовують рутенієвий червоний і алціановий синій, що взаємодіють із кислими мукополісахаридами. Біоплівки на непрозорих об'єктах, таких як пластик і гума, візуалізують за допомогою епіфлюоресцентної мікроскопії. Використання люмінесцентної мікроскопії за допомогою барвників, які виявляють білки, нуклеїнові кислоти й ліпіди, дає можливість визначити хімічний склад біоплівки, а також визначити наявність живих бактерій за допомогою вітального барвника Live/Dead [47, 48].

Аналіз комплексних, у тому числі мікроскопічних досліджень, дає змогу рекомендувати використання певних ферментів і певних препаратів для руйнування позаклітинного матриксу. Дослідження біоплівок за допомогою трансмісивної електронної мікроскопії у стандартних умовах не дає можливості виявити екзополісахарид на зрізах. У зв'язку з цим

при мікроскопуванні біоплівок для візуалізації екзополісахаридів методом Люффа використовують рутенієвий червоний, який взаємодіє з чотириокисом осмію, що входить до складу фіксатора [44]. При використанні даного методу продукт реакції спостерігається з зовнішнього боку цитоплазматичної мембрани, головним чином на поверхні клітини. За допомогою рутенієвого червоного досліджували біоплівки, які містяться на кардіоімплантатах [44]. Рутенієвий червоний використовують для фарбування екзополісахаридів у біоплівках різного типу, як на інертних поверхнях, так і на біологічному матеріалі. За допомогою рутенієвого червоного й алціанового синього виявляють екзополісахариди у низці бактерій [37]. При використанні трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ) барвники не тільки підсилюють контраст екзополісахаридів, але й стабілізують його [8, 31].

Біоплівку візуалізують у деяких випадках навіть без спеціального фарбування з використанням методу ультратонких зрізів. За допомогою даного методу вдається виявити структури, які входять до її складу і недоступні для спостереження за допомогою інших способів. Так, методом ультратонких зрізів були вивчені біоплівки, сформовані в різних умовах [4, 59]. Для дослідження нативних, гідратованих структур біоплівки запропоновано використовувати крио-трансмісивну електронну мікроскопію (крио-ТЕМ) [11]. Часто при проведенні експериментальних досліджень матеріал, який отримано методом ультратонких зрізів, спостерігають за допомогою ТЕМ [7]. Для отримання ультратонких зрізів біоплівки, сформовані у рідкому поживному середовищі на стінках та на дні лунок полістеролових планшетів, відділяють і поміщають у фіксуєчий розчин Ito-Karnovsky та центрифугують за 2.3g протягом 5 хв. Ультратонкі зрізи отримують за допомогою ультратому та фарбують з використанням методу Reynolds, після чого спостерігають за допомогою ТЕМ. Дану методику використовували для дослідження *Burkholderia cepacia* та *Salmonella typhimurium* [1, 8].

Широко використовують для вивчення біоплівок метод скануючої електронної мікроскопії (СЕМ). Однак приготування препаратів для СЕМ складається з таких етапів, як висушування та напилування металів, що супроводжується появою артефактів. Значні зміни відбуваються у чутливому до зневоднення зовнішньому екзополімері, який набуває вигляду тубулярних структур або пальцеподібних вип'ячувань [56, 61].

В міру накопичення даних про розповсюдження та роль біоплівок у природних процесах, у медицині та промисловості, з'явилася необхідність пошуку нових методів їх дослідження. Останнім часом для візуалізації біоплівки використовують конфокальний лазерний скануючий мікроскоп (КЛСМ). За його допомогою стало можливим проводити спостереження за нативними біоплівками. Для спостереження за процесом їх формування за допомогою КЛСМ використовують проточні камери – безперервно-проточні системи з постійним током поживного середовища. Камери обладнані спеціальними візуалізаційними отворами, які дають змогу безпосередньо спостерігати за процесом утворення і росту біоплівки без її руйнування [7].

Дослідження у проточних системах показали, що біоплівка поліморфна і структурно адаптується до змін концентрації поживних речовин у середовищі. За допомогою КЛСМ та інших методів вдається одночасно виявляти бактерії та позаклітинний матрикс. Наприклад, використання КЛСМ і люмінесцентних барвників дає змогу розрізнити у біоплівці бактерії, які пофарбовані пропідіум йодидом, та полісахариди матриксу, що зв'язуються з лектином Con A [35].

Для аналізу складу біоплівок використовують кон'юговані з флуорохромами вуглеводи різної специфічності [7].

Для візуалізації клітин за допомогою епіфлуоресценції або КЛСМ використовують метод мічення, що включає вставку в хромосому бактерії послідовності ДНК, яка кодує флуоресцентну мітку за допомогою плазмідного вектора. Останнім часом для вивчення біоплівок використовують атомну силову мікроскопію (АСМ) [7, 33].

Таким чином, найперспективнішим методом вивчення біоплівок є використання конфокального лазерного скануючого мікроскопа, тому що за його допомогою можна спостерігати за нативними біоплівками.

Вплив Quorum sensing на формування біоплівки

Розвиток пліткових культур – одна з основних стратегій виживання бактерій не тільки в навколишньому середовищі, але й в інфікованому мікроорганізми організмі. Процес формування біоплівок перебуває під контролем регуляторних систем генів, у тому числі й системи Quorum sensing [3].

Окрім експресії певних генів, формування, ріст і міграція планктонних форм клітин для колонізації в біоплівках регулюється на рівні популяції за рахунок механізмів міжклітинної комунікації. Quorum sensing (QS) – це процес координованої експресії генів у популяції бактерій, що регулює специфічну поведінку клітин. Уперше явище міжклітинної комунікації було описано у симбіотичної морської бактерії *Vibrio fischeri* [3, 47]. Механізм роботи QS базується на складній ієрархічній регуляції цільових локусів геному бактеріальної клітини. При цьому регуляція здійснюється на різних рівнях впливу: транскрипційному, трансляційному, посттрансляційному. На сьогодні встановлено, що клітинно-клітинні взаємозв'язки впливають на внутрішньопопуляційну диференціацію клітин, на експресію генів, що кодують фактори патогенності, регулюють процеси росту, характер і напрям руху (таксис), апоптоз і утворення токсинів [3].

Роботу QS можна порівняти з гормональною регуляцією функціональної активності різних органів і тканин у багатоклітинному організмі. Грампозитивні та грамнегативні мікроорганізми використовують різні сигнальні системи і різні хімічні переносники сигналів. Наприклад, представники роду *Enterococcus* синтезують пептиди, побудовані з 7–8 членів, а представники роду *Staphylococcus* – циклопептиди [3, 46].

Відомо, що QS бере участь у регуляції експресії факторів патогенності у стафілококів. Генетичною основою роботи цієї системи є хромосомний локус *agrABCD* [44]. У ролі переносників сигналів виступають циклопептиди – аутоіндуктори (AIP, auto-inducing peptide), які класифікують на групи і субгрупи залежно від будови та біологічного ефекту. Наприклад, субгрупи 1 та 4 у *S. aureus* підвищують рівень експресії факторів вірулентності [3]. Дані молекули дуже специфічні, тому що заміна хоча б однієї амінокислоти в структурі сполуки призводить до втрати її біологічної функції. Стафілококова система реагує тільки на один тип аутоіндукторів. Коли клітина отримала специфічний сигнал, активуються гени-інгібітори і клітина вже не може сприймати інші сигнали. Такий механізм забезпечує жорстку популяційну селекцію. Синтезовані сигнальні молекули взаємодіють з гістидинкіназою мембранною системою (*agrC*), яка через низку реакцій активує регулятор транскрипції (*agrA*). Цей білок здійснює біфункціональну регуляцію двох промоторів P2 та P3. Відповідно, транскриптами цих залежних генів є інформаційні РНК II та РНК III. При цьому РНК II містить основні *agr*-гени, таким чином проявляється аутоіндукторна відповідь системи [13–15]. У свою чергу, РНК III забезпечує регуляцію синтезу факторів вірулентності (ДНКази, фібринолізину, ентеротоксину, α -, β -, δ -токсинів) [7]. Особливістю на даному етапі регуляції є те, що транскрипт РНК III розміром 500 пар нуклеотидів не несе закодованої інформації. Виняток становить одна відкрита рамка зчитування для δ -токсину.

Більша частина молекули транскрипта виступає як рибосомальний інгібітор. РНК III блокує процес трансляції фактора репресії вірулентності Rot (repressor of toxins), що регулює синтез стафілококових токсинів [24, 57], наслідком чого є неконтрольоване утворення екзотоксинів. Таким чином, *agr*-система забезпечує популяційну регуляцію експресії факторів патогенності стафілококів [14]. Використовуючи різні варіанти ПЛР-досліджень, встановленими, що експресія *agr*-локусу в клітинах спостерігається при багатьох стафілококових ураженнях: інфекції шкіри, ендокардитах, артритах, сепсисі [27].

У популяціях біоплівки накопичуються сигнальні молекули, що синтезуються більшістю клітин, які є метаболічним і генетичним «ядром (кворумом)» популяції. Вони задають метаболічну поведінку та фенотипічні зміни для всіх клітин, що входять до складу біоплівки. Це здійснюється за рахунок акумуляції сигналів через аутоіндукцію та інгібування інших сигналів, які продукуються меншою кількістю бактерій [3].

Таким чином, система Quorum sensing регулює специфічні взаємодії клітин біоплівки, оскільки експресія певних генів, формування, ріст і міграція планктонних форм клітин для колонізації в біоплівках регулюється на рівні популяції за рахунок механізмів міжклітинної комунікації.

Стійкість біоплівки до антибактеріальних препаратів

Останнім часом відмічається збільшення кількості випадків, коли антибактеріальні препарати і їхні комплекси стають неефективними у лікуванні інфекційних процесів. Значну роль у даному явищі відіграє плівкова організація. У складі біоплівки умовно-патогенні бактерії набувають ознак підвищеної стійкості до антибіотиків та інших факторів довкілля. Сьогодні відомо, що серед усіх інфекційних захворювань близько 65-80% викликають бактерії, які формують біоплівки. Отже, враховуючи вищесказане, важливим стає дослідження стійкості до антибіотиків культур, здатних до утворення біоплівки.

Відомо, що біоплівки суттєво підвищують стійкість мікроорганізмів, які входять до їх складу, до імунної системи господаря, антимікробних препаратів і впливу навколишнього середовища. Ця стійкість може виражатися у повній резистентності до факторів, які могли би легко їх знищити, за умов перебування у планктонній культурі [17, 23].

Існують способи захисту мікроорганізмів біоплівки від антибактеріальних препаратів – це блокування та загальний захист. Блокування – це простий шлях, у результаті якого позаклітинний матрикс захищає бактерії, запобігаючи глибокому проникненню в матрикс біоплівки великих молекул, наприклад антитіл, і клітин, які викликають запалення. Зріла біоплівка може також слугувати дифузним бар'єром для антибактеріальних агентів [27].

Іншою унікальною властивістю біоплівок є загальні захисні властивості, які бактерії можуть передавати одна одній. Наприклад, антибіотикорезистентні бактерії продукують захисні ензими й антибіотик-зв'язуючі протеїни, які захищають сусідні антибіотикочутливі мікроорганізми [27]. Також вони здатні передавати іншим бактеріям гени, які відповідають за стійкість до певних антибіотиків [62].

Наступною стратегією виживання бактерій у біоплівках є формування метаболічно неактивних субпопуляцій. Для того, щоб антибіотик подіяв на бактерії, вони мають бути метаболічно активними, тому на неактивні бактерії, що входять до складу біоплівок, антибіотики не впливають [62].

Таким чином, стандартні дози для тих антибіотиків, які ефективно впливають на чутливі планктонні культури, вирощені в лабораторних умовах, можуть виявляти слабкий антимікробний ефект або бути зовсім неефективними щодо того ж виду бактерій у складі біоплівки [2].

Таким чином, проблеми підвищеної стійкості біоплівки до антибактеріальних препаратів базуються на кількох аспектах, а саме: дифузному бар'єрі; здатності бактерій накопичувати в матриці позаклітинні ферменти, що руйнують антибіотики; здатності бактерій біоплівки до агрегації, що пов'язана зі зменшенням площі відкритої поверхні клітин із формуванням фізичної недоступності молекул, що надає клітинам резистентного фенотипу. Крім того, зниження метаболізму мікроорганізмів біоплівки призводить до прояву антибіотикотолерантності [3, 29, 32, 43].

Для сучасної системи охорони здоров'я важливим є вивчення механізмів стійкості бактерій, які входять до складу біоплівки, бо завдяки їх розумінню з'являються нові можливості впливу на формування та видалення біоплівки з інфікованого організму й уникнення розвитку хронічного інфекційного процесу.

Роль персистерів у стійкості біоплівок до факторів навколишнього середовища

Мікроорганізми, що перебувають у складі біоплівки, добре захищені від факторів зовнішнього середовища і можуть повністю проявляти свої патогенні властивості. Ці особливості біоплівок слугують причиною суттєвого зменшення у виборі антибактеріальних препаратів для лікування інфекцій, що викликані формуванням біоплівок.

Одним із можливих механізмів підвищення стійкості бактерій до факторів навколишнього середовища й антибактеріальних препаратів є значне збільшення у складі біоплівок частки клітин-персистерів [3].

Детальне вивчення біології та генетики клітин, які вижили після впливу антибактеріальних препаратів, дало змогу відкрити субфенотипи популяції клітин персистерів (persister's cell). Персистери – це альтруїстичні клітини, які з'являються у стаціонарній фазі росту. Вони метаболічно неактивні та забезпечують виживання материнської популяції у присутності летальних для всіх клітин факторів [12, 39]. У біоплівках така субпопуляція становить 1–5% від усієї кількості клітин [3]. Формування таких клітин залежить від темпів росту популяції. У лог-фазі культура не утворює або утворює невелику кількість клітин-персистерів, їх кількість збільшується у стаціонарній фазі росту [3].

Утворення субпопуляції персистерів залежить від рівня метаболічної активності всіх клітин біоплівки, а також від дії зовнішніх негативних факторів. У персистерів знижується швидкість усіх фізіологічних процесів і вони стають толерантними до дії різних факторів зовнішнього середовища, в тому числі й до дії антибактеріальних препаратів [3, 38].

Антибіотикотолерантність відрізняється від резистентності [60]. В основі механізмів стійкості бактерій лежить нездатність взаємодії антибіотика з його мішенню, за рахунок зміни самих мішеней або за рахунок синтезу ферментів, що нейтралізують ці антибіотики [3]. У свою чергу, толерантність – це властивість мікробної клітини виживати у присутності антибіотика за рахунок зниження швидкості метаболізму та виключення основних біологічних процесів клітини. Антибіотики ефективно проявляють свою дію щодо клітин, які активно діляться, тобто мають високий рівень синтетичних процесів. Тому коли клітина перебуває у стані фізіологічного спокою («клітинного анабіозу»), антибактеріальна речовина не проявляє свою біохімічну функцію повною мірою. Наприклад, еритроміцин інгібує біосинтез білка у грампозитивних коків, чим проявляє свій бактеріостатичний ефект – клітина не росте, не розмножується, знижується швидкість її метаболізму, за цих умов клітина не гине від дії самого препарату. Наприклад, такі класи антибіотиків, як амінолікозиди і фторхінолони порушують процеси трансляції та реплікації. «Вимикаючи» на певний час роботу рибосом, клітина-персистер виявляє толерантність до антибіотиків, та-

ких як макроліди й аміноглікозиди. У зв'язку з тим, що персистери не ростуть, не діляться, хромосома та білкові системи реплікації, репарації та транскрипції перебувають у інтактному стані, то дія фторхінолонів не виявляється [3].

Унаслідок вищевказаних «вимкнень» біологічних функцій клітини відбувається припинення синтезу пептидоглікану, припиняється побудова клітинної стінки. У зв'язку з цим β -лактамі антибіотики будуть також неефективними. Білки персистерів виключають роботу, функцію всіх мішеней антибіотика, викликаючи явище мультитолерантності (MDT, multi-drug tolerance). Тому бактерицидні антибіотики відносно персистерів здійснюють тільки бактериостатичний ефект [12, 38, 47].

Перебудова клітинної фізіології у персистерів – це складний процес, який забезпечує велика кількість генетичних систем клітини. У цьому процесі важливу роль відіграють ТА-модулі (toxin – antitoxin). Це генетичні системи, які дають мікроорганізмам змогу пережити екстремальні умови навколишнього середовища завдяки стану метаболічного спокою. ТА-модулі індують синтез клітинних токсинів і антитоксинів, які містяться в цитоплазмі у зв'язаному стані. Після тривалого екзогенного впливу негативних факторів відбувається інтенсивний синтез цитотоксинів, які блокують процеси трансляції. Токсин проявляє свою функцію до тих пір, поки клітина не опиниться у відповідних умовах, які є сигналом експресії генів для синтезу антитоксинів. Як наслідок токсини зв'язуються у протеїновий комплекс і нормалізують метаболічні процеси клітини. Дані токсини можуть здійснювати різний цитотоксичний вплив на різні етапи метаболізму клітини, що залежить від типу ТА-модуля. Наприклад, у *E. coli* описано 15 хромосомних ТА-модулів, у *M. tuberculosis* – 80 [28, 39, 41].

Використовуючи метод генних чипів, встановили, що персистери в перші хвилини дії антибіотика активують багато генів [28, 47, 9]. Наявність такого біологічного механізму дає патогенним бактеріям змогу тривалий час виживати у вогнищі інфекції. Окрім ТА-модулів, у формуванні персистентного фенотипу задіяні інші гени, наприклад гени SOS-системи. Вони кодують білки теплового, фагового, холодowego шоку (*sulA*, *cspH*, *htrA*, *ibpAB*, *htrX*, *clpB*, *psp*, *umuDC*). Експресія стрес-асоційованих факторів пов'язана з функцією виживання персистерів, але продукти цих генів здатні також інгібувати трансляцію, реплікацію та розділення клітин під час поділу. Однак це не всі фізіологічні можливості персистерів. Кластерний аналіз результатів, отриманих при використанні генних чипів, показав, що, крім гіперекспресії вищевказаних генів, відбувається зворотний процес – зниження експресії інших генних локусів. Серед них – гени, які беруть участь у біосинтезі джгутиків, оперони, які беруть участь в окислювальному фосфорилуванні – НАДН-дегідрогенази, АТФ-синтази, цитохром-О-убіхінол оксидази та інших. Це основні ферментативні системи, які беруть участь в основних процесах асиміляції/дисиміляції клітини. Унаслідок даних процесів відбувається вимикання метаболізму, що зумовлює стан клітинного спокою. Робота генетичних ТА-модулів, що забезпечує вимкнення біологічно важливих функцій, залишається до кінця не вивченою, як фізіологія та інші механізми виживання персистерів [38, 39, 41, 42].

Усі фактори імунного захисту спрямовані на елімінацію бактеріальних клітин поза біоплівкою (планктонні форми), але антитіла, білки комплементу й фагоцити не можуть проникати крізь екзополімерний шар. Антибіотики можуть проникати крізь цей шар і знищувати бактерії всередині самої біоплівки. Але клітини-персистери з їх толерантністю і високим рівнем виживання залишаються інтактними. Після завершення антибіотикотерапії через деякий час починається синтез і накопичення антитоксинів, у клітинах персистерів цитотоксини нейтралізуються й активуються всі біологічні процеси. Після завершення дії

цитотоксинів клітини починають розмножуватися, відновлюється бактеріальна комунікація і таким чином відбувається відновлення материнської популяції. Для макроорганізму цей процес супроводжується хронізацією інфекції, появою маніфестуючих ознак захворювання, пов'язаних із повторною активацією імунної системи і дії факторів патогенності бактерій. З ростом популяції відбувається створення імуносупресуючого мікрооточення навколо біоплівки за рахунок синтезу специфічних молекул і вторинного синтезу проективної системи матриксу біоплівки [1, 62].

Клітини-персистери, які є метаболічно неактивними, відіграють важливу роль у виживанні бактерій, що входять до складу біоплівки за дії летальних для всіх клітин факторів. Робота генетичних ТА-модулів, що обумовлює вимкнення біологічно важливих функцій, залишається до кінця не вивченою, як фізіологія та інші механізми виживання персистерів.

Форма існування мікроорганізмів у вигляді біоплівок – це еволюційно прогресивний спосіб надклітинної організації мікроорганізмів. Біоплівки – якісно новий рівень структурної організації бактерій, що існують у природних біоценозах, навколишньому середовищі, організмі людини і тварин. У цьому сенсі особливу увагу привертають біоплівки, сформовані патогенними й умовно-патогенними бактеріями. Проблема інфекцій, викликаних формуванням біоплівок, поряд із теоретичним, має велике практичне значення, оскільки сьогодні плівкоутворення госпітальними штамми бактерій є серйозною проблемою клінічної медицини. У зв'язку з цим необхідно розробляти нові підходи до ідентифікації та вивчення біологічних властивостей плівкоутворюючих штамів бактерій і дослідження динаміки розвитку біоплівок.

Сьогодні для вивчення біоплівок використовують цілий арсенал різноманітних методів, насамперед методи мікроскопії, що включають конфокально-лазерну скануючу (КЛСМ), скануючу електронну (СЕМ) та крио-трансмисивну (ТЕМ) мікроскопії, біохімічні методи та методи ідентифікації біоплівок тощо. Аналіз даних літератури показує, що в основному вивчають питання кількісного і якісного складу бактерій, хімічний склад компонентів матриксу та динаміку розвитку біоплівок. У зв'язку з цим необхідно більшою мірою застосовувати методи вивчення функціональної активності мікроорганізмів, включаючи активність метаболічних реакцій і генотипування, засноване на детекції специфічних генів, дослідження слід проводити як на основі планктонних культур штамів мікроорганізмів, що виділені з біоплівки, так і на основі вивчення метаболічної активності бактерій, які входять до складу біоплівки.

Для розуміння метаболічних процесів, які відбуваються у біоплівці, велике значення мають експериментальні дані, що описують етапи формування та структурні компоненти біоплівки. Тому дослідження складу і функцій компонентів екзополімерного матриксу – це один із напрямів вирішення проблем вивчення біологічної активності клітин плівки та їх стійкості до факторів навколишнього середовища, імунної системи хазяїна й антибактеріальних препаратів. Це набуває особливого значення у відділеннях інтенсивної терапії та хірургічних стаціонарах, оскільки плівкоутворення є причиною появи тяжких катетер- і вентилятор-асоційованих нозокоміальних інфекцій, сепсисів, пневмоній та летальних випадків. Великі економічні витрати пов'язані з неефективною антибіотикотерапією інфекцій, які ускладнені формуванням біоплівок.

У боротьбі з інфекціями, які спричинені мікроорганізмами, що здатні формувати біоплівки, особливе значення має вивчення клітин-персистерів, котрі є метаболічно неактивними і таким чином відіграють важливу роль у виживанні бактерій, які входять до складу біоплівки, під дією летальних для всіх клітин факторів. Патогенні й умовно-патогенні бактерії,

що входять до складу біоплівки, мають більш високий рівень стійкості до антибіотиків, тому необхідно проводити пошук нових антибактеріальних препаратів і вести розробку методів застосування комплексної антибіотикотерапії. У цьому сенсі перспективним є пошук інгібіторів системи Quorum sensing (QS), адже відомо, що ця система впливає на формування біоплівки та здійснює регуляцію специфічної поведінки клітин, що формують біоплівку.

Таким чином, детальне та глибоке вивчення динаміки формування біоплівки, біологічних властивостей і закономірностей функціонування мікроорганізмів, що входять до її складу, дасть змогу вирішити низку питань практичної та теоретичної біології, а також допоможе у пошуку лікарських препаратів, здатних цілеспрямовано впливати на розвиток біоплівки як у плані активації, так і у плані пригнічення плівкоутворення.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Азизбекян Р. Р., Смирнова Т. А., Григорьева Т. М. и др. Использование красителя Конго красного для отбора штаммов грамположительных бактерий, продуцирующих регулярный S-слой // Биотехнология. 2007. № 6. С. 5–11.
2. Афиногенова А. Г., Даровская Е. Н. Микробные биопленки ран: состояние вопроса // Травматология и ортопедия России. 2011. Т. 61. № 3. С. 119–125.
3. Гостев В. В., Сидоренко С. В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. 2010. Т. 2. № 3. С. 4–15.
4. Гостева В. В., Клишунцова Н. В., Бондаренко В. М. и др. Взаимодействие *Clostridium difficile* с бактериальными сообществами пристеночной биопленки толстой кишки мыши // Журнал микробиол. эпидемиол. иммунол. 2009. № 1. С. 3–6.
5. Диденко Л. В., Константинова Н. Д., Романова Ю. М. и др. Ультраструктурная организация клеток *Salmonella typhimurium* при длительном голодании и переходе в некультивируемое состояние // Мол. генетика, микробиол. вирусол. 2000. № 3. С. 21–26.
6. Занина В. В., Коптева Ж. П. Моносахаридный состав экзополимерного комплекса бактерий-деструкторов защитных покрытий // Микробиол. журнал. 2007. Т. 71. № 4. С. 21–27.
7. Смирнова Т. А., Диденко Л. В. Структурно-функциональная характеристика биопленок // Микробиология. 2010. Т. 79. № 4. С. 435–446.
8. Смирнова Т. А., Диденко Л. В., Андреев А. Л. и др. Электронно-микроскопическое изучение биопленок, образуемых *Burkholderia cepacia* // Микробиология. 2008. Т. 77. № 1. С. 63–70.
9. Чеботарь И. В., Таланин Е. А. Новый метод количества учета кокков в надклеточных образованиях – кластерах и биопленке // Стоматология, травматология, микробиология. 2010. № 3 С. 14–17.
10. Balaban N. Q., Merrin J., Chait R. et al. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch // Sci. 2004. Vol. 305. N 5690. P. 1622–1625.
11. Beveridge T. J. Visualizing bacterial cell walls and biofilms // Microbe. 2006. V. 1. N 6. P. 1–6.
12. Pace J. L. Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. 495 p.
13. Cassat J., Dunman P. M., Murphy E. et al. Transcriptional profiling of a *Staphylococcus aureus* clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390 // Microbiol. 2006. N 152. P. 3075–3090.
14. Cirioni O., Giacometti A., Ghiselli R. et al. RNAIII-inhibiting peptide significantly reduces bacterial load and enhances the effect of antibiotics in the treatment of central venous catheter-associated *Staphylococcus aureus* infections // J. Inf. Dis. 2006. N 193. P. 180–186.
15. Chen L. C., Tsou L. T. Ligand-receptor recognition for activation of quorum sensing in *Staphylococcus aureus* // J. Microbiol. 2009. Vol. 47. N 5. P. 572–581.

16. Costerton J. W. The Biofilm Primer, Vol. 1. – Berlin: Springer, 2007. P. 200.
17. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E. et al. Microbial biofilms // *Ann. Rev. Microbiol.* 1995. Vol. 49. P. 711–745.
18. Costerton W., Steward P. S., Greenberg E. P. et al. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections // *Sci.* 1999. Vol. 284. P. 1318–1322.
19. Costerton W., Veeh R., Shirtliff M. et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections // *Clin. Invest.* 2003. Vol. 112. P. 1466–1477.
20. Darouiche R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence // *Clin. Infect. Dis.* 2001. Vol. 33. N 9. P. 1567–1572.
21. Davey M. E., O’Toole G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. N 64. P. 847–867.
22. Diamond-Hernandez B., Solórzano-Santos F., Leaños-Miranda B. et al. Production of icaAD-BC encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections // *BMC Infect. Dis.* 2010. N 10. P. 68–74.
23. Flemming H. C., Neu T. R. The EPS matrix: the “house of biofilm cells” // *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189. N 22. P. 7945–7947.
24. Garvis S., Mei J.-M. et al. Staphylococcus aureus svrA: a gene required for virulence and expression of the agr locus // *Microbiol.* 2002. N 148. P. 3235–3243.
25. Gotz F. Staphylococcus and biofilms // *Mol. Microb.* 2002. Vol. 43. N 6. P. 1367–1378.
26. Guiot E., Georges P., Brun A. et al. Heterogeneity of diffusion inside microbial biofilms determined by fluorescence correlation spectroscopy under two-photon excitation // *Photochem. Photobiol.* 2002. Vol. 75. N 6. P. 570–579.
27. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections // *Cell Microbiol.* 2009. Vol. 11. N 7. P. 1034–1043.
28. Harrison J. J., Ceri H., Roper N. J. et al. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli* // *Microbiol.* 2005. N 151. P. 3181–3195.
29. Hóiby N., Bjarnsholt T., Givskov M. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms // *Int. J. of Antimic. Agents.* 2010. N 35. P. 322–332.
30. Hunter R. C., Hitchcock A. P., Dynes J. J. et al. Mapping the speciation of iron in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using scanning transmission X-ray microscopy // *Environ. Sci. Technol.* 2008. Vol. 42. N 23. P. 8766–8772.
31. Hunter R. C., Beveridge T. G. High resolution visualization of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI biofilms by freeze substitution transmission electron microscopy // *J. Bacteriol.* 2005. Vol. 187. P. 7619–7630.
32. Jian L., Lomovskaya O. Bacterial resistance to antimicrobials: mechanisms, genetics, medical practice and public health // *Biot. Let.* 2002. Vol. 24. N 10. P. 801–805.
33. Jonas K., Tomenius H., Kader A. et al. Roles of curli, cellulose and Bap A in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy // *BMC Microbiol.* 2007. Vol. 7. P. 1–13.
34. Yi K., Rasmussen A. W., Gudlavalleti S. K. et al. Biofilm formation by *Neisseria meningitidis* // *Infect. Immun.* 2004. Vol. 72. P. 6132–6138.
35. Kania R. E., Lamers G. E. M., Vonk M. et al. Demonstration of bacterial cells and glycocalyx in human tonsils // *Arch. Otolaryngol.* 2007. Vol. 133. P. 115–121.
36. Karatan E., Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009. Vol. 73. N 2. P. 310–347.
37. Karlyshev A. V., McCrossan M. V. Demonstration of polysaccharide capsule in *Campylobacter jejuni* using electron microscopy // *Infect. Immun.* 2001. Vol. 69. P. 1–13.
38. Keren I., Kaldalu N., Spoering A. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials // *FEMS Microb. Let.* 2004. N 230. P. 13–18.
39. Keren I., Shah D., Spoering A. et al. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* // *J. Bact.* 2004. Vol. 186. N 24. P. 8172–8180.

40. Kolari M. Attachment mechanisms and properties of bacterial biofilms on nonliving surfaces // Academic Dissertation in Microbiology / University of Helsinki. 2003.
41. Lewis K. Persister cell // Annu. Rev. Microbiol. 2010. N 64. P. 357–372.
42. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease // Nat. Rev. Microbiol. 2007. N 5. P. 48–56.
43. Lewis K. Riddle of Biofilm Resistance // J. Antimicrob. Chemother. 2001. Vol. 45. N 4. P. 999–1007.
44. Luft J. H. Ruthenium red and violet. 1. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action // Anat. Record. 1971. Vol. 171. P. 347–368.
45. Manos J., Arthur J., Rose B. et al. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung // J. Med. Microb. 2008. N 57. P. 1454–1465.
46. McDougald D., Srinivasan S. Signal-mediated cross-talk regulates stress adaptation in *Vibrio* species // Microbiol. 2003. Vol. 149. N 7. P. 1923–1933.
47. Møller N., Dean R. C. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules // J. Bact. 2010. Vol. 192. N 7. P. 1946–1955.
48. Mohamed J. A., Huang D. B. Biofilm formation by enterococci // J. Med. Microb. 2007. N 56. P. 1581–1588.
49. Moons P., Michiels C. W. Bacterial interactions in biofilms // Crit. Rev. Microbiol. 2009. Vol. 35. N 3. P. 157–168.
50. Qiu D., Eisinger M. V., Head E. N. et al. ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiol. 2008. N 154. P. 2119–2130.
51. O'Tool G., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS356 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 28. P. 449–461.
52. Rasmussen K., Lewandowski Z. Microelectrode measurements of local mass transport rates in heterogeneous biofilms // Biotechnol. Bioeng. 1998. N 59. P. 302–309.
53. Romling U., Sierralta D. W. Multicellular and aggregative behavior of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter // Mol. Microbiol. 1998. Vol. 28. P. 249–264.
54. Skillman L. C., Sutherland I. W. Cooperative biofilm formation between two species of *Enterobacteriaceae* // Biofilms. 1997. P. 119–127.
55. Tormo M. A., Knecht E., Gotz F. et al. Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? // Microbiol. 2005. N 151. P. 2465–2475.
56. Traber K. E., Lee E., Benson S. et al. *agr* function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates // Microbiol. 2008. N 154. P. 2265–2274.
57. Williams P. Quorum sensing, communication and crosskingdom signalling in the bacterial world // Microbiol. 2007. N 153. P. 3923–3938.
58. Vergara-Irigaray M., Tomas M.-L., Merino N. et al. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface // Microbiol. 2008. N 154. P. 865–877.
59. Zahler J., Stewart S. P. Transmission electron microscopic study of antibiotic action on *Klebsiella pneumoniae* biofilm // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. Vol. 46. P. 2679–2683.
60. Zogaj X., Bokranz W. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract // Infect. Immun. 2003. Vol. 71. P. 4151–4158.
61. Wai S. N., Mizunoe Y., Takade A. et al. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI 4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation // Appl. Environ. Microbiol. 1998. Vol. 64. N 10. P. 3648–3655.

62. Weigel L. M., Donlan M. R., Shin H. D. et al. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007. Vol. 51. N 1. P. 231–238.

Стаття: надійшла до редакції 17.09.13

доопрацьована 14.01.14

прийнята до друку 06.03.14

METHODS TO STUDY THE DYNAMICS BIOFILM-FORMATION OF OPPORTUNISTIC BACTERIA

O. Sidashenko, O. Voronkova, O. Sirokvasha, A. Vinnikov

*Oles Gonchar National University of Dnipropetrovsk
72, Gagarin Ave., Dnipropetrovsk 49000, Ukraine
e-mail: microb_sidashenko@mail.ru*

The data of the literature are described which concerns the structural and functional characteristics of the biofilm, as consorcium with complex level of organization. The review describes the methods that are currently used to study biofilms: confocal laser scanning (CLSM), scanning electron (SEM) and cryo-transmissible (TEM) microscopy. An information about the structural components, formation stages and extracellular matrix biofilm significance are presented. The role of Quorum sensing in biofilm formation is describes. It is the significance of persisters in biofilm to environmental factors are disclosed. It is known that bacteria included in the biofilm are more resistant to host immune system and antibiotics.

Keywords: biofilm, extracellular matrix, Quorum sensing, persisters.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ДИНАМИКИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ БАКТЕРИЯМИ

О. Сидашенко, О. Воронкова, Е. Сірокваша, А. Вінніков

*Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара
пр. Гагарина, 72, Днепропетровск 49000, Украина
e-mail: microb_sidashenko@mail.ru*

Обобщены данные литературы относительно структурно-функциональных особенностей биопленки как ассоциаций со сложным уровнем организации. Описаны методы, которые сегодня используют для изучения биопленок, прежде всего конфокально-лазерную сканирующую (КЛСМ), сканирующую электронную (СЭМ) и крио-трансмиссивную (ТЭМ) микроскопии. Представлена информация относительно структурных компонентов, этапов формирования и значения межклеточного матрикса биопленки. Описана роль системы Quorum sensing в формировании биопленки. Раскрыто значение персистеров в устойчивости биопленки к факторам окружающей среды, так как известно, что бактерии, входящие в состав биопленки, более устойчивы к воздействию иммунной системы хозяина и антибактериальным препаратам.

Ключевые слова: биопленка, экзополимерный матрикс, система Quorum sensing, персистеры.