

Наталія Ткачук

**БІОПЛІВКИ
ТА БІООБРОСТАННЯ:**

*збірник лекцій для студентів та аспірантів
природничих спеціальностей закладів вищої освіти*

Чернігів
Видавництво «Десна Поліграф»
2023

УДК 57(075.8)

Т 48

Рецензенти:

Лукаш О.В. – д.б.н., професор кафедри біології та кафедри екології та охорони природи Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г. Шевченка, м. Чернігів, Україна;

Зелена Л.Б. – к.б.н., старший науковий співробітник відділу фізіології промислових мікроорганізмів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, м. Київ, Україна; доцент кафедри біотехнології, шкіри та хутра Київського національного університету технологій та дизайну, м. Київ, Україна;

Рак О.О. – к.б.н., старший науковий співробітник відділу природної флори Національного ботанічного саду ім. М.М. Гришка НАН України, м. Київ, Україна.

Ткачук Н.В.

Т 48 Біоплівки та біообростання: збірник лекцій для студентів та аспірантів природничих спеціальностей закладів вищої освіти. Чернігів: Десна Поліграф, 2023. 180 с.

ISBN 978-617-8020-78-1

У навчально-методичному посібнику наведено анотацію навчальної дисципліни «Біоплівки та біообростання» та лекції до курсу. До кожної лекції зазначено використані та рекомендовані літературні джерела. Посібник розрахований на здобувачів вищої освіти та викладачів природничих факультетів закладів вищої освіти.

*Рекомендовано на засіданні вченої ради Національного університету
«Чернігівський колегіум» імені Т.Г. Шевченка
(протокол № 5 від 28.12.2022)*

ISBN 978-617-8020-78-1

УДК 57(075.8)

© Ткачук Н. В., 2023

Зміст

Вступ	4
Анотація навчальної дисципліни	5
Лекція 1. Біоплівка як форма існування мікроорганізмів	8
Лекція 2. Ріст та розвиток біоплівок	21
Лекція 3. Технології дослідження біоплівок	45
Лекція 4. Біообростання	61
Лекція 5. Корисні та природні біоплівки	71
Лекція 6. Біоплівки та мікробно індукована корозія	101
Лекція 7. Біоплівки у охороні здоров'я та медицині	118
Лекція 8. Контроль біоплівок	138
Список рекомендованої літератури	176

Вступ

Біоплівки дозволяють мікроорганізмам прилипати до твердої поверхні та огортатися захисним позаклітинним матриксом, що містить глікокалікс. Найпоширенішими мікроорганізмами, залученими до створення біоплівок, є бактерії та мікроскопічні гриби. В той же час здатність виробляти біоплівки відома для вірусів та паразитів. Біоплівки розглядаються як мікрообростання і є важливою складовою проблеми біообростання поверхонь. Наразі біообростання, біоплівки активно вивчаються з мікробіологічної, медичної, екологічної, технічної точок зору. Тому набуття знань та вмінь в галузі біообростання та біоплівок є важливою складовою підготовки студентів природничих спеціальностей, зокрема біологів та екологів.

Метою даного посібника є узагальнення сучасної інформації щодо функціонування організмів у вигляді біообростань та біоплівок. Посібник розрахований на студентів природничих спеціальностей закладів вищої освіти та викладачів.

АНОТАЦІЯ НАВЧАЛЬНОЇ ДИСЦИПЛІНИ

«Біоплівки та біообростання»

I. Основною метою засвоєння курсу є набуття здобувачами компетенцій і компетентностей про організацію біоплівок, принципи їх формування, механізми існування мікроорганізмів у прикріпленому стані, значення біоплівок та біообростань у природі та практичній діяльності людини.

II. Місце навчальної дисципліни в програмі підготовки фахівців указаної спеціальності

Дисципліна «Біоплівки та біообростання» дозволяє набутти здобувачам додаткових фахових компетенцій при опануванні циклу дисциплін професійної підготовки.

III. Завдання дисципліни

Засвоєння біологічної сутності біоплівок та біообростань, їх організації, принципів формування, передумов виникнення та розвитку вчення про біоплівки та біообростання; засвоєння особливостей поведінки мікроорганізмів, пов'язаної з формуванням ними біоплівки; ознайомлення з методами дослідження біоплівок; засвоєння розповсюдження біоплівок та біообростань у природі, їх значення для природних процесів та практичної діяльності людини.

IV. Основні знання та вміння, яких набуває студент після опанування цієї дисципліни

знати:

- біологічну сутність біоплівок та біообростань, особливості їх організації, принципи формування, передумови виникнення та хід розвитку вчення про біоплівки та біообростання;
- особливості поведінки мікроорганізмів, пов'язаної з формуванням ними біоплівки;
- розповсюдження біоплівок та біообростань у природі, їх значення для природних процесів та практичної діяльності людини;

вміти:

- визначати сутність поняття «біоплівка», «біообростання»;
- пояснювати особливості організації біоплівок, принципи їх формування;
- характеризувати передумови виникнення та хід розвитку вчення про біоплівки та біообростання;
- пояснювати особливості поведінки мікроорганізмів, пов'язаної з формуванням ними біоплівок;
- використовуючи найдоступніші експериментальні методи характеризувати здатність мікроорганізмів до формування біоплівок та досліджувати сформовані біоплівки;
- пояснювати розповсюдження біоплівок та біообростань у природі, їх значення для природних процесів та практичної діяльності людини.

V. Короткий зміст дисципліни

Змістовий модуль 1. Сучасні уявлення про біоплівки та біообростання

Тема 1. Біоплівка як форма існування мікроорганізмів

Поняття про біоплівки. Агрегація та гідрофобність - властивості бактерій, що впливають на утворення ними біоплівок. Морфотипи біоплівок. Історія дослідження біоплівок та біообростань. Чому прокаріоти формують біоплівки? Від планктонної мікробіології до мікробіології біоплівок.

Тема 2. Ріст та розвиток біоплівок

Етапи формування біоплівок. Структурна організація біоплівок. Регуляція утворення біоплівок.

Тема 3. Технології дослідження біоплівок

Спектрофотометричні методи. Мікроскопічні методи. Деякі молекулярно-генетичні методи. Біофоміка.

Тема 4. Біообростання

Поняття біообростання. Історія проблеми біообростання. Водні організми-обростачі.

Змістовий модуль 2. Біоплівки та біообростання в природі та практичній діяльності людини

Тема 5. Корисні та природні біоплівки

Формування біоплівок у природних умовах. Особливості формування мультивидових біоплівок. Мультивидові біоплівки у біотехнології: біоплівки у біоремедіації та очистці природних середовищ; біоплівки та сільське господарство; біоплівки для захисту від корозії.

Тема 6. Біоплівки та мікробно індуквана корозія

Поняття мікробно індукваної корозії (МІК) та її характеристика. Характеристика біоплівок, асоційованих з МІК. Методи пом'якшення наслідків. Механізми МІК: біоплівка як хімічний бар'єр; фізична структура біоплівки.

Тема 7. Біоплівки у охороні здоров'я та медицині

Біоплівкові інфекції. Мікробні угруповання, оточені матриксом та адгезовані на небіологічних та біологічних поверхнях. Інфекції, пов'язані з приладами. Інфекційний ендокардит. Муковісцидоз, пневмонія.

Тема 8. Контроль біоплівок

Фактори, що впливають на біоплівкову сприйнятливість. Антимікробна толерантність у біоплівках. Підходи до інгібування утворення біоплівок.

VI. Обсяги навчального навантаження та терміни викладання курсу

На вивчення дисципліни відводиться 90 годин (3 кредитів ЄКТС), з яких лекційних 14 год., практичних – 16 год., самостійної роботи студентів – 60 год. Дисципліна викладається у 2 семестрі.

VII. Система оцінювання

Поточний контроль: оцінювання виконання тестових завдань, оцінювання виконання та оформлення практичних робіт. Підсумковий контроль: залік у 2 семестрі.

Змістовий модуль 1. Сучасні уявлення про біоплівки та біообростання

Лекція 1

Біоплівка як форма існування мікроорганізмів

План

1. Поняття про біоплівки. Агрегація та гідрофобність - властивості бактерій, що впливають на утворення ними біоплівок.
2. Морфотипи біоплівок.
3. Історія дослідження біоплівок.
4. Чому прокаріоти формують біоплівки?
5. Від планктонної мікробіології до мікробіології біоплівки.

Використані літературні джерела:

1. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. 2004. Vol.2. P. 95-108.
2. Нøiby N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathogens and Disease*. 2014. Vol. 70. P. 205–211.
3. Кулишов С.А., Лыков И.Н. Биопленки как объект изучения в научно-исследовательской работе учащихся. *Young Scientist*. 2016. Т.4, №108. С. 240-245.
4. Oliveira R., Azeredo J., Teixeira P., Fonseca A. P. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. *BioLine*, 2001. P.11-22.
5. Серегина Н.В., Честнова Т.В., Жеребцова В.А., Хромушин В.А. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии. *Вестник новых медицинских технологий*. 2008. Т.XV, № 3. С. 175-177.
6. Винник Ю.С., Серова Е.В., Андреев Р.И., Перьянова О.В., Рукосуева Т.В., Лейман А.В., Мичуров Е.И. Особенности формирования микробных биопленок на различных субстратах. Возможность изучения биопленок

на желчных конкрементах. *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 5.

7. Немцева Н.В. Биопленки – феномен формирования резистентности микроорганизмов в различных экосистемах. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019. №3. С. 1-29. DOI:10.24411/2304-9081-2019-13020

1. Поняття про біоплівки.

Ще у 17 столітті А. ван Левенгук використовуючи свої прості мікроскопи, вперше спостерігаючи мікроорганізми зубного нальоту, побачив, що мікроорганізми взаємодіють один з одним, активно конкурують, або, навіть, з'їдають один одного. Така взаємодія нагадала Левенгуку поведінку диких тварин, але оскільки мікроорганізми були маленькими, то Левенгук і назвав їх «анімалькуле», тобто «тваринки». За сутністю, Левенгуку першому вдалося вивчити угруповання мікроорганізмів не лише еукаріотичних, але й прокаріотичних.

Прокаріоти в природі існують у двох фізіологічних формах, які реалізують різні стратегії виживання: 1) планктонні форми - вільно існуючі популяції мікроорганізмів з інтенсивними клітинним поділом і розвиненими системами активної та пасивної рухливості, які швидко розповсюджуються в середовищі; 2) «осілі» сесильні форми (sessile cell) мають виражені механізми специфічної адгезії і характеризуються декількома періодами росту:

1. Лаг-фаза — фаза затримки росту
2. Фаза логарифмічного (експоненціального росту)
3. Фаза уповільненого росту
4. Фаза стаціонарного росту
5. Фаза загибелі

Популяції сесильних клітин формують біоплівки — угруповання клітин, адгезованих на субстраті, зі складною системою регуляції фізіологічних

процесів, що базується на міжклітинній комунікації. Саму ідею про існування структурованих мікробних угруповань, а не вільноплаваючі, «планктонні» форми, висунув у 1987 р. J. Costerton зі співавторами. Вони й сформуvalи загальну теорію існування біоплівок, згідно до якої, більшість мікроорганізмів ростуть у замкнених матриксах та біоплівках, прикріплених до поверхні будь-яких екосистем, у яких є поживні речовини та вода.

Біоплівка — це мікробне угруповання, яке характеризується клітинами, прикріпленими до поверхні або одна до одної, заключене у матрикс синтезованих ними позаклітинних полімерних сполук, а також демонструючих зміну фенотипу, вираженого зміною параметрів росту та експресії специфічних генів.

Біоплівки – це високоорганізовані, динамічні гетерогенні угруповання, що безперервно змінюються, складаються як з активно функціонуючих клітин, так і з форм, що знаходяться у спокої, і які заключені у екзополімерний матрикс. Вони можуть складатися з одного або (що зустрічається частіше) з декількох видів мікроорганізмів.

Агрегація та гідрофобність є важливими характеристиками мікроорганізмів при визначенні їх здатності формувати біоплівки.

Змочуваність поверхні тепер, як правило, виражається у зворотному значенні і називається гідрофобністю. Останні дослідження показали, що гідрофобність твердих поверхонь впливає на адгезію бактерій, еукаріотичних клітин та білків.

З іншого боку, бактерії та інші мікроорганізми, включаючи вірусні частинки, виробили багато різних способів використання гідрофобного ефекту для того, щоб прикріплюватися до субстратів. Насправді є вагомими причини вважати, що гідрофобний ефект може бути основною рушійною силою для адгезії більшості збудників хвороби.

За словами Бусшера (Busscher, 1995), «гідрофобність скрізь прийнята як головна детермінанта біологічних міжфазних реакцій, але, при більш

детальному дослідженні, ми всі надаємо різне значення слову гідрофобність і всі ми використовуємо різні методи для вимірювання гідрофобності».

2. Морфотипи біоплівки.

Біоплівки можуть розвиватися на поверхнях розділу різних фаз: рідкої та твердої (вода-тверда фаза), рідкої та газової (вода-повітря), твердої та газової (гірські та земляні породи, поверхня споруд-атмосфера).

Основні найбільш досліджені види біоплівки, які формуються на межі твердої та рідкої фаз, мають наступні морфотипи:

- Простий шар клітин, сформований одним або декількома видами мікроорганізмів.

- Мати фотосинтезуючих, метаногенних та сульфатвідновлювальних бактеріальних угруповань.

- Зубні біоплівки (бляшки), утворені складним угрупованням багатьох мікроорганізмів.

- Плівка зі стрічками виростів, сформована змішаною популяцією бактерій в умовах турбулентного потоку.

- «Гриби» — біоплівки, сформовані одним або декількома видами мікроорганізмів зі специфічною трьохвимірною структурою та особливими функціонально-морфологічними утвореннями.

- Бентосні та річкові осади, а також завислі у воді пластівці.

Гелеподібний матрикс біоплівки збагачується поживними речовинами, тобто виконує кумулятивну роль, що є пріоритетом у оліготрофних середовищах.

У товщі позаклітинної полімерної речовини значно обмежений транспорт поживних сполук, що призводить до виникнення концентраційних градієнтів у біоплівці. Завдяки різниці концентрацій кисню на поверхні біоплівки та у її товщі, може виникнути поділ на аеробну та анаеробну зони. Виникнення зон в структурі біоплівки дозволяє іммобілізованим

мікроорганізмам використовувати багато неорганічних та органічних субстратів.

3. Історія дослідження біоплівки

Вчені спостерігали бактерії у біоплівці протягом кількох сотень років. Перші приклади - це мікроскопічні спостереження, опубліковані в листах періоду з вересня 1683 по червень 1708 Антоні ван Левенгука (1632–1723) з Делфта, Нідерланди, за матеріалами з власного рота, де він побачив агрегацію мікроорганізмів зубного нальоту та нормальні мікробні спільноти слизової язика, пізніше описані багатьма стоматологами. Насправді, на сьогодні стоматологи одними з перших визнали проблеми агрегації бактерій стосовно розвитку карієсу та інших стоматологічних інфекцій, включаючи періодонтит. Піонер мікробіології, французький вчений Луї Пастер (1822–1895), спостерігав і замальовував агрегати бактерій як причину того, що вино скисає і набуває оцту, що призвело до відкриття ним пастеризації. Пастер працював над «Fermentation acétique 1861–66, Études sur le vinaigre». Він описує *Mycoderma aceti* як збудника в «la matière visqueuse», «мембрана», видалена з бочок з оцтом, відома як «mère du vinaigre», також Берзелієм названа «masse gélatineuse»

Протягом наступного століття або близько того, мікроорганізми, що секретують біоплівку, не були цікавими та були невідомими для більшості мікробіологів, а мікробіологічні дослідження, особливо в медицині, були успішно зосереджені на планктонно зростаючих мікроорганізмах та їх патогенних та інших властивостях.

Термін «плівка», який відноситься до бактеріальної адгезії, агрегації та розмноження на поверхнях, використовувався в морській мікробіології для відрізнення прилягаючих (сидячих, сесильних) бактерій від вільно плаваючих «планктонних» бактерій ще в 1933 р. (Henrici, 1933; ZoBell & Allen, 1935), але Angst (1922) вже повідомляв, що шлам на дні кораблів значною мірою був спричинений бактеріями, коли біообростання

відбувалося на поверхнях. Ненгісі використовував пряму мікроскопію для вивчення біообростання в прісній воді, і він зауважив, що «цілком очевидно, що здебільшого водні бактерії не є вільно плаваючими організмами, а ростуть прикріпленими до занурених поверхонь», і він проілюстрував це рядом малюнків. ZoBell & Allen (1935) вивчали прикріплення та ріст бактерій на затоплених предметних скельцях у морській воді на кінці 1000-футового пірсу, що належить Інституту океанографії Скриппса, Каліфорнійський університет, Ла Жолла. Їх метою було вивчення раннього розвитку обростання, яке, за їхніми словами, було ініційоване «бактеріями, що ростуть у біоплівці, і меншою мірою - іншими мікроорганізмами, і що такі плівки сприяють подальшому приєднанню найбільших та більш шкідливих організмів обростань. Плівка бактерій може сприяти приєднанню макроскопічних організмів різними способами...». Вони виявили, що «зазвичай потрібно дві-чотири години, щоб помітна кількість бактерій міцно прикріпилася до предметних скелець ... настільки міцно приклеєних до скельця, що проточна вода їх не від'єднає». Кількість бактерій, які вони нараховували на поверхні предметних скелець, на порядок вище, ніж кількість окремих бактеріальних клітин, що вільно течуть у воді.

У медицині вперше спостерігав зв'язок між етіологією персистуючої (хронічної) інфекції та агрегатами бактерій Нільс Хьойбі (Nøiby) у 1970–1972 рр. шляхом рутинного мікроскопічного дослідження забарвлених за Грамом мазків *Pseudomonas aeruginosa* з мокротиння від муковісцидозних (МВ) хворих на хронічну інфекцію легені та в 1974–1978 роках при розтині легенів хворих на МВ, які померли від хронічної інфекції легень *P. aeruginosa*. Перше зображення такої біоплівки було опубліковане в 1977 р. і показало, що агреговані бактерії (купи), оточені великою кількістю слизу, можна спостерігати в мокротинні хворих на МВ, хронічно заражених мукоїдними штамми *P. aeruginosa*.

Ньойбу познайомився з Біллом Костертоном (1934–2012) на 2-й професійній канадській конференції з муковісцидозу на тему «Легенева

інфекція при муковісцидозі» у 1977 р. у Монреалі, Канада, де Нюїбу читав лекцію «Бактеріологія та імунологія стійкої псевдомонадної інфекції» та показував слайди із мукоїдними та немучоїдними колоніями *P. aeruginosa* у хворого на МВ та біоплівкою в мокротинні від хворого на МВ із хронічною інфекцією легень *P. aeruginosa*. Нюїбу припустив, що слиз (альгінати) навколо агрегованих бактерій може захистити їх від специфічних антитіл та опсоно-фагоцитозу безлічі поліморфноядерних лейкоцитів, які були присутні в сироватці крові та мокротинні.

Костертон виступив з лекцією про бактеріальний глікокалікс сидячих бактерій, на відміну від планктонних. Під час конференції Костертон та Хьюїбі обговорювали значення «криптичної інфекції», як назвав її Костертон (він не вивчав альгінату в той час, але інші полісахариди в глікокаліксі), та альгінат, який зберігав бактерії разом у «купах», як Хьюїбі назвав їх.

Костертон та Хьюїбі обидва читали лекції на нараді на тему «Інфекції муковісцидозу» в Національному інституті охорони здоров'я (ІОЗ), Бетесда, штат Меріленд, США, за підтримки ІОЗ та Фонду муковісцидозу (ФМВ), та на зустрічі, спонсованій ФМВ (1979), на тему «Інфекція легень *Pseudomonas* при МВ» в Клівленді, штат Огайо, США, в 1980 році. На 8-му Міжнародному конгресі муковісцидозу в Торонто, Канада, Хьюїбі запросили відвідати лабораторію Костертонна в Калгарі, а також два центри МВ в Калгарі та Едмонтоні, щоб прочитати п'ять лекцій з мікробіології, патогенезу та лікування легеневих інфекцій при МВ. Це стало початком плідної співпраці між Біллом Костертонном та Хьюїбі та їх довічною дружбою.

Білл Костертон працював над базовою та екологічною мікробіологією на посаді професора університету Калгарі в Альберті і опублікував важливі спостереження за структурою грамнегативної клітинної стінки (1974). Його інтерес до МВ та хронічної інфекції легенів був обумовлений тим, що одна його дитина мала МВ. Група Костертонна опублікувала посмертні електронні мікроскопічні спостереження за мікроколоніями *P. aeruginosa* у легені МВ у 1980 р. та дослідження щодо бактеріального глікокаліксу в природі та

захворюванні (1981), а пізніше Костертон замінив «глікокалікс» на «біоплівки» в новій публікації (1987).

Троє молодих вчених з групи Костертон (J. Lam, C.K. Lam, B. Write) відвідали лабораторію Хьойбі та молоді вчені з групи Хьойбі [E. T. Jensen, B. Giercman (Данія) та G. Döring (Тюбінген, Німеччина)] відвідали лабораторію Костертон. Пізніше Хьойбі запросив Костертон прочитати лекцію на засіданні Датського товариства клінічної мікробіології та поліморфізму в Державному сироватковому інституті (1986 р.): «Поняття криптичної інфекції в клінічній медицині». Однак термін «зараження біоплівкою» ще не вживався, на що вказує назва виступу Білла Костертон.

Пошук на PubMed, використовуючи в якості запиту «біоплівка», показує, що перша публікація стосовно біоплівки була виконана Mack et al. (1975), де описана проблема технічної біоплівки. Як було сказано вище, термін «біоплівка» застосовувався в технічній та екологічній мікробіології ще з ZoBell & Allen (1935). Перші дві медичні доповіді із використанням слова «біоплівка» були опубліковані в 1981 році стоматологами з Лундського університету, Швеція (Jendresen & Glantz, 1981; Jendresen et al., 1981) у тому ж році, коли Білл Костертон вперше застосував цей термін «біоплівка» у звіті про технічну мікробіологію (McCoy et al., 1981). Білл Костертон представив «біоплівковий» ріст в медичній мікробіології у 1985 р. (Nickel et al., 1985), продемонстрував підвищену стійкість біоплівки, що росте, порівняно з бактеріям, що ростуть планктонно, а згодом став першопрохідником роботи з фізіології, біохімії тощо біоплівкоутворювальних бактерії (Nickel et al., 1985). Згодом «біоплівка» поступово стала сприйматися як найбільш адекватне слово для опису сесильного (сидячого) росту *in vivo* (Costerton, 1989). Перед цими публікаціями Костертон загалом говорив і писав про сидячі (сесильні) бактерії, глікокалікс, слиз, мікроколонії та криптичну інфекцію, але не використовував слово «біоплівка» в медичних питаннях, на відміну від використання цього терміну в технічних та екологічних питаннях мікробіології.

У період 1976–1980 рр. публікацій про біоплівку не було, але після цього кількість публікацій про біоплівки повільно зростає з трьох у 1981 р. до 170 у 1996 р., коли Костертон організував першу конференцію Американського товариства мікробіології (АТМ) щодо біоплівки у Сноуборді, Юта, США. У той час Костертон читав лекції по всьому світу про біоплівку та інфекції біоплівки і ініціював співпрацю з науковцями та лікарями з багатьох різних медичних спеціальностей, а також з промисловцями. Він проклав шлях для нашого загального розуміння значущості біоплівки в медицині, особливо стосовно хронічних інфекцій та інфекцій щодо чужорідних тіл, наприклад, медичних приладів. Щорічно кількість публікацій про біоплівку продовжувала неухильно збільшуватися і до кінця 2013 р. досягла 3251, а загальна сума - 22 887.

У період до 1980 року дослідження біоплівки в основному базувалися на різних звичайних методах світлової мікроскопії та електронної мікроскопії на культурах бактерій на твердих поверхнях у природі та в лабораторіях. Протягом наступного десятиліття послідовні дослідження та темпи зростання розвитку біоплівки сприяли таким інструментам, як «Пристрій-пробовідбірник біоплівки Роббінса» та хемостати безперервної культури. Після 1990 р. використання конфокальної лазерної скануючої мікроскопії моновидових або полівидових бактеріальних біоплівок, білки яких мічені зеленими/жовтими/блакитними флуоресцентними сполуками, в комірках з малим потоком; використання автоматичного аналізу зображень біоплівки в проточних комірках, використання живих-мертвих плям, використання різних мутантів бактерій, що утворюють біоплівку, транскриптомний аналіз та вимірювання, наприклад, вмісту кисню в різних шарах біоплівки значно розширили наші знання та розуміння природи та властивостей мікроорганізмів, що формують біоплівку. Дослідження біоплівки, що росте в комірках мікротитрувальних планшетів, та оцінка маси біоплівки в лунках мікротитрувальних планшетів за допомогою фарбування кристалічним фіолетовим сприяло вивченню здатності різних бактеріальних ізолятів

утворювати біоплівки та взаємодії між антибіотиками та біоплівкоутворювальними бактеріями.

Отже, спостереження за агрегованими мікроорганізмами, що прилягають до поверхонь або розташованих у тканинах чи виділеннях та оточених самопродукованим матриксом, є такою ж старовинною, як мікробіологія, але поняттю біоплівкових інфекцій та їх значенню в медицині, особливо стосовно хронічних інфекцій, лише 40 років. З тих пір прийнято, що біоплівкові інфекції є такими, що часто зустрічаються, і важливими, але клінічні мікробіологи ще не розробили методів, придатних для звичайних обстежень аби повідомляти лікарям про властивості мікроорганізмів, що формують біоплівку, при щоденній діагностичній роботі на зразках пацієнтів, і там є лише консенсус щодо лікування кількох біоплівкових інфекцій.

4. Чому прокаріоти формують біоплівки?

Які переваги утворення біоплівки та поверхневої асоціації роблять її таким поширеним явищем? В даний час існує кілька гіпотез. По-перше, поверхні забезпечують простір для зайняття, і, вони забезпечують певну стійкість у ростовому середовищі, і можуть мати каталітичні функції через локалізацію клітин у безпосередній близькості. По-друге, утворення біоплівки забезпечує захист від широкого спектру екологічних проблем, таких як вплив ультрафіолетового випромінювання, токсичність щодо металів, вплив кислоти, зневоднення та засолення, фагоцитоз та деякі антибіотики та протимікробні засоби.

Для пояснення загальної стійкості біоплівки до біоцидних агентів запропоновано три механізми. Перший – бар'єрні властивості матричного слизу. Цей механізм може бути більш релевантним для реакційноздатних (відбілювачів або супероксидів), заряджених (метали) або великих (імуноглобулін) протимікробних агентів, які нейтралізуються або зв'язуються екзополімерними сполуками (ЕПС, EPS) і ефективно «розбавляються» до сублетальних концентрацій, перш ніж вони зможуть

досягти всіх бактеріальних клітин у біоплівці. Бар'єрні властивості ЕПС гідрогелю можуть також захищати від ультрафіолетового світла та зневоднення, а також можуть локалізувати ферментативну активність. Наприклад, позаклітинна ферментативна активність β -лактамази проти *P. aeruginosa* відбувається в межах матриксу.

Другий захисний механізм може включати фізіологічний стан організмів біоплівки. Хоча багато антибіотиків можуть вільно проникати в ЕПС, клітини біоплівки часто все ще захищені. Створення голодних, нерухомих фаз спокійних (дрімаючих) зон в біоплівках представляється важливим фактором стійкості популяції біоплівки до антимікробних препаратів, особливо проти антибіотиків, таких як β -лактами, які ефективні проти швидкого поділу грампозитивних бактерій шляхом переривання синтезу клітинних стінок. Однак, мабуть, всі антибіотики потребують хоча б певної міри клітинної активності, щоб бути ефективними, оскільки механізм дії більшості антибіотиків передбачає порушення мікробного процесу. Тому клітини біоплівки в стаціонарному стані спокою (дрімання) можуть представляти загальний механізм стійкості до антибіотиків.

Третім механізмом захисту може бути наявність у біоплівці субпопуляцій стійких фенотипів, які називаються «персистерами». Персистери складають невелику частку всієї біомаси, як в планктонній культурі, так і в біоплівці, але, оскільки окремі фенотипи ще не культивуються, залишається незрозумілим, чи справді ці організми представляють чіткий фенотип або просто найбільш стійкі клітини в популяційному розподілі. Хоча відносний внесок кожного з цих механізмів (і, можливо, інших) змінюється залежно від типу біоплівки та характеру екологічного стресу, результатом є загальним захистом. Існує гіпотеза, що формування біоплівки, ймовірно, є давньою адаптацією прокаріотичного життя.

Парадоксально, але багато наслідків схильності бактерій прилипати до поверхонь ставали очевиднішими завдяки зростаючому технологічному

розвитку. Промислові трубопроводи, атомні електростанції, космічні станції, системи кондиціонування повітря, системи розподілу води та одна з найшвидше прогресуючих технологічних установок - лікарня, піддаються колонізації мікроорганізмами, що ростуть у біоплівках (рис. 1).



Рис. 1. Значення біоплівок для екології, промисловості, господарства та медицини. Представлено позитивні (виділено чорним) та негативні (виділено червоним) аспекти розвитку біоплівок (Немцева, 2019)

5. Від планктонної мікробіології до мікробіології біоплівки

Хоча прийнято, що біоплівки зустрічаються всюди в природних умовах, значення біоплівки при інфекційному захворюванні часто не визнається або все ще обговорюється. Для тих, хто має досвід проблемної природи біоплівки в клініці, це може вважатися академічним. Однак для тих, хто вивчає планктонні бактеріальні культури, щоб дослідити основні аспекти мікробної фізіології, патогенезу та контролю - такі як мінімальні інгібіторні концентрації (МІК) антибіотиків, - це питання, яке має велике значення. Відставання у вивченні поверхнево прикріплених бактерій, а не планктонного комплексу, зрозуміле, враховуючи труднощі роботи з поверхнево-прикріпленими популяціями порівняно з однорідними планктонними популяціями культивованих культур. Організми більш важко

культивувати у вигляді біоплівки; притаманна неоднорідність просторового розподілу призводить до створення локалізованих зон, які сильно різняться як у фізіологічних умовах, так і в клітинних фізіологіях на відстані лише десятків мікрометрів. Іншою складністю, що стосується культивування на поверхнях, є те, що масообмін (дифузія та потік через біоплівку), який контролює обмін поживних речовин, стає важливим фактором, як і сили рідини (зсув та перетягування), які діють на біоплівку. Крім того, через те, що клітини біоплівки злипаються між собою та прилипають до поверхонь, стають важкими нескладні маніпуляції, такі як розведення або створення рядів концентрацій, які використовуються для обчислення інгібіторних та бактерицидних концентрацій (які звичайно використовуються у вирощуваних культурах). Розрахунок концентрації антибіотика на клітину в планктонних культурах є тривіальним, коли передбачається, що кожна клітина стикається з однаковим рівнем антибіотика. У біоплівках це важко, враховуючи місцеві неоднорідності та нехарактерні параметри росту, такі як площа поверхні: відношення об'єму, час перебування (час, коли об'єм рідини знаходиться в системі) або швидкість завантаження поживних речовин (концентрація поживних речовин на одиницю площі за час). Відсутність стандартних методів вирощування, кількісної оцінки та випробування біоплівки в безперервній культурі призводить до непорівнюваної мінливості між лабораторними системами. Наразі існує лише один стандартний метод вирощування біоплівки Американського товариства з випробувань та матеріалів (ASTM, American Society for Testing and Materials - E-2196-02), який використовує обертовий дисковий реактор (BioSurface Technologies, Vozeman, Montana), хоча Центри контролю захворювань (Centers for Disease Control, CDC) також нещодавно розробили реактор росту біоплівки.

Мікробіологія біоплівки є комплексом і недостатньо представленою культурами у колбах. Хоча однорідність дозволяє статистичне обчислення, ступінь, в якому вона відображає реальний, менш впорядкований світ, викликає сумніви. Можливо, саме складність біоплівок допомагає зробити їх

настільки стійкими. Біоплівки представляють черговий виклик мікробіології - протистояти цій складності та розробити більш відповідні протоколи тестування для вирішення вимогливих проблем з мікробними засобами у промисловості та медицині.

Лекція 2

Ріст та розвиток біоплівок

План

1. Етапи формування біоплівок.
2. Структурна організація біоплівок.
3. Регуляція утворення біоплівок.

Використані літературні джерела:

1. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. In: Microbial biofilms / Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. [eds]. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 51-66.
2. Kostakioti M., Hadjiifrangiskou M., Hultgren S.J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. Cold Spring Harb. Perspect. Med., 2013. 3:a010306. URL: www.perspectivesinmedicine.org. P. 1-23.
3. Винник Ю.С., Серова Е.В., Андреев Р.И., Перьянова О.В., Рукосуева Т.В., Лейман А.В., Мичуров Е.И. Особенности формирования микробных биопленок на различных субстратах. Возможность изучения биопленок на желчных конкрементах. *Современные проблемы науки и образования*. 2013. № 5.
4. Franklin M.J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. In: Microbial biofilms / Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. [eds]. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 1-32.

5. Dufour D., Leung V., Lévesque C.M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2012. N 22. P. 2–16.

Ця лекція зосереджена на кількох питаннях формування біоплівки, включаючи започаткування утворення біоплівки, розвиток структури біоплівки, формування біоплівки за допомогою декількох шляхів, бактеріальної рухливості під час формування біоплівки, ролі кворум-сенсингу у формуванні біоплівки, розвитку субпопуляції та взаємодії, формування біоплівки, що регулюється адаптаційними реакціями та припиненням утворення біоплівки у відповідь на екологічні сигнали.

1. Етапи формування біоплівок.

Утворення біоплівок - це складний комплексний динамічний процес, який складається з декількох етапів. Початкове прикріплення мікробної клітини до поверхні субстрата здійснюється за рахунок дії електростатичних, гідрофобних сил, сил Ван дер Ваальса, неспецифічної адгезії. Адгезія до біологічних поверхонь зумовлюється специфічною взаємодією білків-адгезинів або лектинів, фімбрій, екзоплазматичного компартмента бактеріальної клітини з рецепторами або певними доменами поверхні мембран клітин-мішеней. Механізм адгезії грампозитивних бактерій відрізняється від механізму адгезії грамнегативних. Так, наприклад, найважливішим елементом в процесі адгезії стафілококів є полісахарид (Polysaccharide Intercellular Adhesin - PIA), який бере участь як в клітинній субстратній адгезії, так і в наступному формуванні клітинних кластерів. У грамнегативних мікроорганізмів важливу роль в адгезії та клітинній агрегації відіграють джгутики та фімбрії IV типу. Рух, зумовлений джгутиками, сприяє розповсюдженню та утворенню клітинного моношару на субстраті, а фімбрії IV типу беруть участь у клітинній агрегації за рахунок лектинової взаємодії. В міру розмноження бактерій вони більш міцно прилипають до поверхні, диференціюються, обмінюються генами, що забезпечує їх виживання.

Експериментальні підходи, орієнтовані насамперед на генетичні та мікроскопічні методи, поклали початок нашим сучасним моделям формування бактеріальної біоплівки. Дослідники визначили, що формування біоплівки є процесом, що складається з конкретних етапів (рис.2).

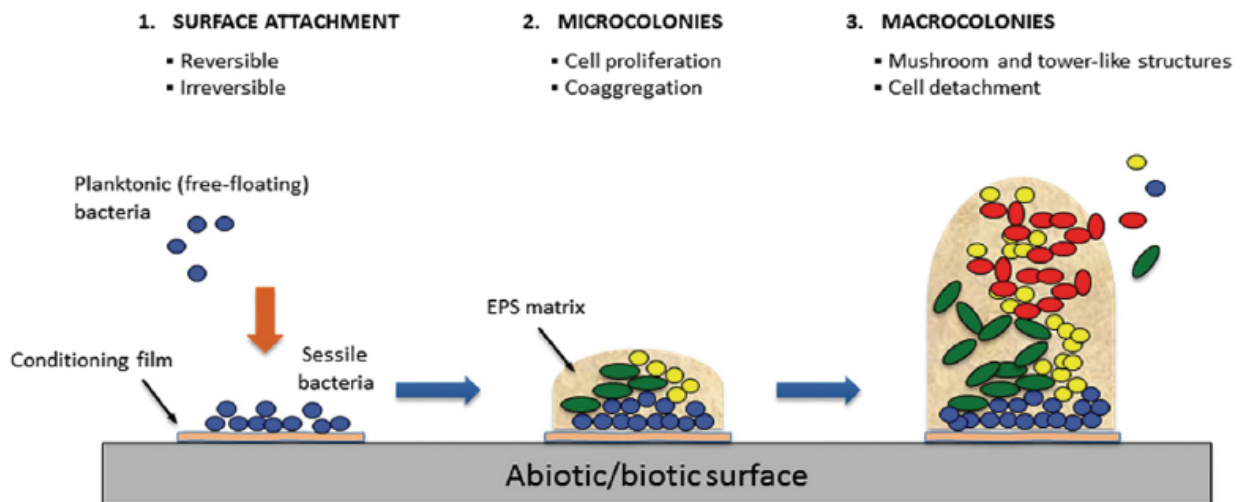


Рис. 2. Схематичне зображення окремих етапів у розвитку мікробної біоплівки. Різні стадії формування біоплівки включають початкове прикріплення до поверхні, формування моношару вздовж поверхні з утворенням мікроколонії, дозрівання біоплівки з утворенням тривимірної структури та дисперсія клітин (Dufour et al., 2012)

Вважається, що цикл розвитку біоплівки включає (1) початкове приєднання мікробів до поверхні або один до одного – частіше за все мікроорганізми існують у вигляді вільно плаваючих мас або одиничних (наприклад, планктонних) колоній. Проте за нормальних умов більшість мікроорганізмів прагне прикріпитися до поверхні і, наприкінці, утворити біоплівку. (2) Утворення мікроколоній - по мірі розмноження бактерій вони більш міцно прилипають до поверхні, диференціюються, обмінюються генами, що забезпечує їх виживання. (3) Дозрівання біоплівки – одного разу стійко приєднавшись, бактерії починають утворювати екзополісахаридний оточуючий матрикс, відомий як позаклітинна полімерна речовина (extracellular polymeric substance). Це захисний матрикс або «слиз» (EPS-matrix). Дрібні колонії бактерій потім утворюють початкову біоплівку, та (4) поширення (розповсюдження) біоплівки.

Різні стадії біоплівки включають бактеріальну фізіологію та фенотипічні реакції, що свідчать про існування унікальної біології плівки, яка не характерна для планктонних бактерій. Перехід від одиночного планктонного способу життя бактерій до спільного способу життя біоплівки передбачає зміну бактерій таким чином, що вони ініціюють виробництво адгезинів та сполук позаклітинного матриксу, які з'єднують їх у біоплівці. Позаклітинний матрикс біоплівки виконує функцію каркаса, який має важливу сполучну та структурну функцію між клітинами та структурою в біоплівках і відіграє роль у ряді процесів, включаючи приєднання клітин, взаємодію між клітинами та антимікробну толерантність. Матрикс біоплівки, який виробляють бактерії, містить переважно полісахариди, білки та позаклітинні ДНК.

Експериментальні лабораторні дослідження показали, що планктонні бактерії, наприклад, стафілококи, стрептококи, псевдомонади, кишкова паличка зазвичай приєднуються одна до одної протягом декількох хвилин; утворюють міцно з'єднані мікроколонії протягом 2-4 годин; виробляють позаклітинні полісахариди і стають значно більш толерантними до біоцидів, наприклад, до антибіотиків, антисептиків та дезінфектантів протягом 6-12 годин; залучаються в зрілі колонії біоплівки, які дуже стійкі до біоцидів та втрачають планктонні бактерії протягом 2-4 днів в залежності від видів бактерій та умов росту; швидко відновлюються після механічного руйнування та знову формують зрілу біоплівку протягом 24 годин.

Формування біоплівок ініціюється у відповідь на особливі екологічні сигнали

Останні роботи з рядом бактеріальних видів, включаючи *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Burkholderia cenocepacia*, *Bacillus subtilis* та *Clostridium difficile* вказують на те, що ініціація утворення біоплівки відбувається у відповідь на підвищення рівня внутрішньоклітинного вторинного месенджера біс-(3'-5')-циклічного димерного гуанозинмонофосфату (c-di-GMP). Синтез та деградація c-di-GMP у бактеріях здійснюється двома різними класами

білків, що мають протилежні ферментативні дії. Дигуанілатні циклази, що містять домени GGDEF, синтезують c-di-GMP з двох молекул GTP, тоді як фосфодіестерази, що містять домени EAL або HD-GYP, руйнують c-di-GMP. Сенсорні домени часто асоціюються з білками домену GGDEF та EAL / HD-GYP, переводячи різні екологічні сигнали на рівні c-di-GMP. Бактерії зазвичай продукують декілька різних c-di-GMP дигуанілат циклаз та фосфодіестераз, і накопичуються дані, що вони працюють в окремих c-di-GMP-ланцюгах. Наші сучасні знання говорять про те, що ряд різних екологічних сигналів та перетворюючих механізмів можуть призвести до збільшення локальних пулів c-di-GMP, що, в свою чергу, може активувати виробництво адгезинів та продуктів позаклітинного матриксу. Наприклад, у *P. aeruginosa* виявлено, що білок WspA є мембранним рецептором, який виявляє сигнал, пов'язаний з контактом з поверхнею. Сигнал опосередковується гістидинкіназою WspE, яка каталізує фосфотрансфер до регулятора відповіді-дигуанілатциклази WspR, який, в свою чергу, продукує c-di-GMP. Синтез матричних продуктів біоплівки, таких як адгезин CdrA та екзополісахариди Psl, Pel та альгінати, у свою чергу позитивно регулюється c-di-GMP у *P. aeruginosa*.

На додаток до опосередкованої c-di-GMP регуляції, утворення біоплівки також регулюється за допомогою малих регуляторних РНК (sРНК) у багатьох видів бактерій. Наприклад, робота з *P. aeruginosa* свідчить про те, що синтез екзополісахаридів Psl і Pel індукується у відповідь на сигнали навколишнього середовища, які відчувуються сенсорними кіназами LadS і RetS та сенсорною кіназою/відповідь регуляторною парою GacS/GacA. Фосфорилування GacA, здійснюване GacS стримується (зупиняється) сенсорною кіназою RetS і стимулюється сенсорною кіназою LadS. Після фосфорилування GacA, здійснюваного GacS, GacA індукує транскрипцію з sРНК RsmY та RsmZ. RsmY та RsmZ sРНК зв'язують та знижують активність білка RsmA, що в іншому випадку пригнічує експресію ряду генів, у тому числі тих, що кодують вироблення полісахаридів Psl та Pel. Крім того, сенсорні кінази та регулятори реакції, кодовані генами bfiSR, bfmSR та mifSR, очевидно, беруть участь у

регуляції утворення біоплівки *P. aeruginosa*. Були надані докази того, що система BfiSR регулює утворення біоплівки, впливаючи на синтез рибонуклеази CafA, яка контролює рівень RsmZ sPHK. Більше того, показано, що білок SagS сприяє переключенню рухливості-сидіння та діє разом з BfiSR для ініціювання утворення біоплівки *P. aeruginosa*.

Москосо та ін. (Moscoso et al.) надали докази того, що мутант *P. aeruginosa* retS містить підвищений рівень c-di-GMP, що вказує на зв'язок між опосередкованою sPHK та регульованою c-di-GMP біоплівкою у *P. aeruginosa*.

2. Структурна організація біоплівок.

Застосування лазерної конфокальної мікроскопії, скануючої електронної мікроскопії, дозволило встановити, що біоплівки мають складну трьохвимірну структурну організацію. Склад матричного слизу варіює в залежності від мікроорганізмів, які у ньому присутні, та включає полісахариди, білки, гліколіпиди та бактеріальну ДНК. При цьому основним компонентом є полісахариди (декстран, гіалуронова кислота, целюлоза та інші). За даними різних авторів ця фракція становить від 40 до 95 % від загальної маси біоплівки; вміст інших хімічних сполук значно варіює та залежить від бактерії, яка утворює біоплівку.

Частка білків у біоплівці може становити до 60 %, ліпідів до 40 % і нуклеїнових кислот 1-20 %. 80-90 % об'єму біоплівок займає вода, тому всі її складові знаходяться у гідратованому стані. Матрикс біоплівки розділений каналами, наповненими водою, а також має порожнини. Крізь канали транспортуються поживні сполуки і проходять конвективні потоки кисню від зовнішніх до внутрішніх частин біоплівки, одночасно з цим виводяться метаболіти бактеріальних клітин.

Архітектура та організація біоплівок є видозалежною

Хоча мікроколонії є основною одиницею у більшості біоплівок, структура мікроколоній може сильно відрізнятися залежно від біоплівкоутворюючих видів. Наприклад, було продемонстровано, що за однакових умов у проточній камері *P. putida* утворює пухкі виступаючі мікроколонії, тоді як *Pseudomonas*

knackmussii (раніше називався *Pseudomonas* sp. B13) утворює сферичні мікроколонії. Більше того, коли обидва види *Pseudomonas* вирощувались разом у двовидових біоплівках, вони все ще формували свої характерні мікроколонічні структури, очевидно, не зачіпаючи один одного. Отже, архітектура та організація трьох різних біоплівок залежать від біоплівкоутворювальних бактеріальних видів. У формуванні конкретних структур в біоплівках беруть участь численні фактори, і в даний час механізми, що лежать в основі різниці в структурі біоплівки, відображені *P. putida* та *P. knackmussii*, невідомі.

Однак у випадку *P. putida* утворення біоплівки в проточних камерах в основному регулюється великим адгезивним білком LapA, тоді як для інших псевдомонад, таких як *P. aeruginosa*, утворення біоплівки в проточних камерах в основному залежить від екзополісахаридів Psl та Pel. Відмінності між компонентами позаклітинного матриксу, які взаємозв'язують бактерії в біоплівках, можуть спричинити різні структури мікроколоній.

Розвиток структури у біоплівках залежить від харчових умов

Як описано вище, різні види бактерій можуть утворювати різні структури біоплівки в однакових умовах. Крім того, одні й ті ж бактеріальні види можуть утворювати різні структури біоплівки в різних умовах навколишнього середовища. Наприклад, Klausen та ін. продемонстрували, що *P. aeruginosa* утворює грибоподібні мікроколонії, коли вона росте в проточних камерах, зрошуваних глюкозним середовищем, тоді як вона утворює плоскі біоплівки, коли росте в проточних камерах, зрошуваних цитратним середовищем. Більше того, структура створеної біоплівки може змінюватися у відповідь на зміну харчових умов. Nielsen та ін. вивчали утворення біоплівки в проточних камерах суміші, що складається з *P. knackmussii* та *Burkholderia xenovorans* (раніше названих *Burkholderia* sp. LB400).

Ці бактерії можуть взаємодіяти метаболічно, оскільки *P. knackmussii* може метаболізувати хлоробензоат, що виробляється *B. xenovorans* при вирощуванні на хлорбіфенілі.

Коли біоплівку з двома видами годували середовищем, що містить хлоробіфеніл, утворювалися змішані мікроколонії, що складаються з асоційованих бактерій *P. knackmussii* та *B. xenovorans*. На противагу цьому, коли суміш живилася цитратом, який може метаболізуватися обома видами, два види утворювали окремі мікроколонії. Після зсуву джерела Карбону з цитратного середовища на хлоробіфенільне середовище переміщення бактерій *P. knackmussii* призвело до зміни просторової структури біоплівки від окремих мікроколоній до змішаних видів мікроколоній.

Аналогічні спостереження були зроблені Wolfaardt та ін., які вивчали мікробну суміш, здатну руйнувати гербіцид диклофоб. Коли цю суміш вирощували в проточних камерах, зрошених диклофобом, утворилася високоструктурована біоплівка зі специфічними візерунками, міжвидова клітинна коагрегація. Але коли суміш вирощували на трипсиновому соєвому бульйоні (ТСБ), біоплівка не мала різниці в товщині та структурі. Після переходу джерел Карбону з ТСБ на диклофоб, для отримання типової структури біоплівки, вирощеної з диклофобом, знадобилося лише два дні. Хоча організми та природа метаболічних взаємодій у дослідженні були невідомими, це дослідження дало вагомі докази того, що розвиток структури біоплівки залежить від харчових умов і що структура створеної біоплівки може змінюватися у відповідь на зміну харчових умов.

Бактеріальна рухливість може бути інтегрованою частиною формування біоплівки

Вищеописані дослідження свідчать про те, що міграція бактерій бере участь у структурних змінах, які можуть відбутися у біоплівках у відповідь на зміну харчових умов. Однак виявляється, що міграція бактерій може мати важливе значення для структурного розвитку біоплівки також у стабільних екологічних умовах. Наявні дані свідчать про те, що *P. aeruginosa* утворює плоску біоплівку в проточних камерах, зрошуваних цитратним середовищем, оскільки бактерії сильно мігрують під час початкової фази утворення біоплівки і не осідають, утворюючи мікроколонії.

Мутанти *P. aeruginosa* pilA (дефіцит біогенезу пілів IV типу) утворюють виступаючі мікроколонії в проточних камерах, зрошених цитратним середовищем, що вказує на те, що рухливість, яка виникає в біоплівках *P. aeruginosa* дикого типу, пов'язана з пілями IV типу. У проточних камерах, зрошених глюкозним середовищем, *P. aeruginosa* утворює дві чіткі субпопуляції в початковій фазі утворення біоплівки: нерухливу субпопуляцію, яка утворює початкові мікроколонії, і рухливу субпопуляцію, яка спочатку мігрує по субстрату. Формування грибоподібних структур у біоплівках, вирощених з глюкозою, очевидно, передбачає колонізацію початкових мікроколоній бактеріями з мігруючої субпопуляції, які згодом утворюють грибні ковпачки поверх початкових мікроколоній, які потім відповідають стеблю грибоподібних структур.

У біоплівках *P. aeruginosa*, вирощених з глюкозою, що містять суміш мутантів pilA з Sfr-міткою та бактерій дикого типу, мічених Yfr, формуються грибоподібні структури, які містять мутанти pilA у стеблі та дикий тип у шапці. Крім того, можна зустріти також грибоподібні структури, які містять бактерії дикого типу як у стеблі, так і у шапці. Ці дані свідчать про те, що міграція бактерій може бути складовою частиною формування біоплівки.

Конкуренція та неоднорідність біоплівок

Результати дослідження останніх характеристик біоплівки допомогли виявити складності цих поверхнево-асоційованих угруповань мікроорганізмів. Діяльність клітин та структура матеріалу позаклітинного матриксу демонструють, що бактерії біоплівки беруть участь у різноманітних актах фізіологічної поведінки, відмінних від планктонних клітин. Наприклад, бактерії в біоплівках пристосовані до росту на поверхнях, і більшість виробляє адгезини та позаклітинні полімери, які дозволяють клітинам міцно прилягати до поверхонь або до сусідніх клітин. Позаклітинний матеріал біоплівки містить полісахариди, білки та ДНК, які утворюють клейову речовину для адгезії до поверхні та для тривимірної (3D) архітектури біоплівки. Матеріал матриксу, хоча виробляється окремими клітинами, утворює структури, що забезпечують користь для всього угруповання,

включаючи захист клітин від різних екологічних навантажень. Клітини біоплівки утворюють угруповання і беруть участь у міжклітинній сигнальній діяльності. Дифузні сигнальні молекули та метаболіти надають сигнали для експресії генів, які можуть принести користь всій спільноті, наприклад, гени для виробництва позаклітинних ферментів, які дозволяють бактеріям біоплівки використовувати складні джерела поживних речовин.

Клітини біоплівки не є статичними. Багато мікроорганізмів пристосувались до поверхнево-асоційованої рухливості, такої як моторні посмикування та роїння. Клітинна діяльність, включаючи виробництво матриксу, міжклітинна сигналізація та пов'язана з поверхнею рухливість, свідчать про те, що біоплівки беруть участь у комунальній діяльності. В результаті біоплівки порівнювали з багатоклітинними органами, де клітини диференціюються за спеціалізованими функціями. Однак бактерії не завжди взаємодіють між собою. Біоплівки - це також місця інтенсивної конкуренції. Бактерії, що знаходяться в біоплівках, конкурують за поживні речовини та простір, виробляючи токсичні хімічні речовини для пригнічення або вбивання сусідніх клітин або введення токсинів безпосередньо в сусідні клітини через секрецію типу VI. Тому клітини біоплівки демонструють як комунальну, так і конкурентну діяльність. Складність біоплівки (і складність технологій, необхідних для вивчення діяльності біоплівки) посилюється тим, що біоплівки за своєю сутністю неоднорідні. У природних угрупованнях структура біоплівки може бути стратифікована, оскільки різні організми мігрують у своє оптимальне положення для доступу до світла, кисню, поживних речовин, вторинних метаболітів та сигнальних сполук. Навіть у біоплівках, що складаються з одного виду, субпопуляції клітин проявляють неоднорідну активність. Описано три загальні фактори, що сприяють неоднорідності біоплівки: **1) фізіологічна неоднорідність**, коли бактерії адаптуються до своїх місцевих умов навколишнього середовища. Коли кисень або поживні речовини дифундують у біоплівки з їх джерел і використовуються бактеріями, розвиваються градієнти хімічної концентрації.

Хімічні градієнти можуть перетинатися і перекриватися з градієнтами відходів або сигнальних сполук, утворюючи багато унікальних мікросередовищ у біоплівках, які не відтворюються ростом планктонних бактерій. Бактерії реагують на їхні місцеві умови навколишнього середовища, і тому фізіологія окремих клітин може відрізнятись від інших клітин, які знаходяться в безпосередній близькості. **2) Генетична мінливість**, коли мутації можуть відбуватися в початкових клональних популяціях клітин. Клітини всередині спільноти можуть розвивати мутації, що викликають клітинну диференціацію. Ця генетична мінливість може пояснити ідентифікацію субпопуляцій біоплівки, які відрізняються від решти спільноти, таких як мукоїдні штами, що виникають під час росту біоплівки. **3) Стохастичні події експресії генів**, коли підмножини клітин експресують однакові гени на різних рівнях, навіть коли клітини відчують дуже схожі умови навколишнього середовища. Стохастичні події сприяють розподілу праці, збільшенню функціональної та морфологічної складності біоплівки. Стохастичні події можуть сприяти утворенню деяких субпопуляцій клітин, що відрізняються від решти спільноти, таких як персистуючі клітини, що є клітинами, що мають підвищену толерантність до антибіотиків порівняно з іншими клітинами спільноти. Оскільки хімічні та фізіологічні неоднорідності тісно пов'язані між собою, зміна в спільнотах біоплівки є важливим фактором, який слід враховувати при розробці експериментів для досліджень біоплівки.

3. Регуляція утворення біоплівок.

Формування біоплівки може відбуватися різноманітними шляхами

Як описано вище, утворення структур біоплівки є як видовим, так і залежним від умов навколишнього середовища, що дозволяє припустити, що утворення біоплівки може відбуватися по декількох шляхах. За аналогічних умов механізми формування біоплівки для близькоспоріднених видів, таких як *P. aeruginosa* та *P. putida*, можуть бути дуже різними. Як було зазначено вище,

утворення біоплівки *P. putida* в проточних камерах в основному залежить від великого клейового поверхневого білка LapA, тоді як утворення біоплівки *P. aeruginosa* в проточних камерах зазвичай залежить від екзополісахаридів, таких як Psl та Pel. Однак також можливо, що конкретний вид бактерій може утворювати біоплівку різними шляхами за різних умов. Наприклад, *P. aeruginosa* може виробляти ряд матричних продуктів біоплівки, включаючи полісахариди Psl, Pel та альгінати; позаклітинну ДНК; і пілі IV типу, Cup, CdrA, LecA, LecB і Fap білкові компоненти. Можна очікувати, що деякі штами *P. aeruginosa*, відібрані для конкретних умов, будуть виробляти деякі з цих компонентів матриксу біоплівки у більших кількостях, ніж інші штами, і шляхи біоплівки будуть змінюватися відповідно.

Whitchurch та ін. повідомили, що наявність ДНКаз у середовищі перешкоджало утворенню біоплівки лабораторним штамом *P. aeruginosa* PAO1 у мікротитрувальних планшетах та проточних камерах, що дозволяє припустити, що позаклітинна ДНК є важливим матричним компонентом у цих біоплівках. Додавання ДНКаз до молодих біоплівок *P. aeruginosa* PAO1, вирощених в проточній камері, призвело до розсіювання, але не розсіяло зрілі біоплівки, ймовірно, завдяки продукції зростаючої кількості інших компонентів матриксу біоплівки під час дозрівання біоплівки. На відміну від Nemoto та ін. встановлено, що зрілі біоплівки, утворені чотирма незалежними клінічними ізолятами *P. aeruginosa*, можуть бути дисперговані за допомогою ДНКаз, що дозволяє припустити, що позаклітинна ДНК є первинною сполучною речовиною клітини у зрілих біоплівках, утворених цими штамми *P. aeruginosa*. Крім того, Murakawa дослідив хімічний склад матриксу біоплівки з 20 клінічних ізолятів *P. aeruginosa* і виявив, що матрикс біоплівки з 18 штамів складається переважно з ДНК, тоді як 2 штами з мукоїдним фенотипом утворюють слиз, складений головним чином з альгінату.

Відмінності в структурі біоплівки можуть спричинити різні фенотипічні реакції, наприклад, на лікування антибіотиками. Багато типів біоплівки демонструють надзвичайно підвищену толерантність до антимікробної обробки

порівняно з планктонними бактеріями. Механізми, що сприяють антимікробній толерантності, пов'язаної з біоплівкою, включають обмежену антимікробну дифузію, диференціальну фізіологічну активність, індукцію специфічних механізмів толерантності та формування клітин-персистерів.

Особливу зацікавленість являють собою клітини-персистері - альтруїстичні інтактні клітини, здатні виживати навіть за високих доз антибіотиків, летальних для інших мікробних клітин. За даними деяких авторів їх кількість варіює від 1 до 5 % від всієї популяції. Вони метаболічно неактивні, а їх основне призначення, ймовірно, депонування та збереження генетичного матеріалу для наступного відновлення популяції. Фенотип персистерів характеризується цікавою біологією, вони уповільнюють всі фізіологічні процеси і стають толерантними до дії різних факторів, в тому числі й до впливу антимікробних препаратів. Властивість антибіотикотолерантності відрізняється від механізмів резистентності.

З численних властивостей біоплівки клінічне значення мають висока стійкість до факторів природної резистентності організму, до різноманітних зовнішніх впливів, до антибактеріальних засобів.

Значна резистентність мікроорганізмів у складі біоплівок до антибіотиків порівняно з планктонними формами зумовлена здатністю бактерій накопичувати у матриці позаклітинні ферменти, які руйнують антибіотики, та агрегаційною природою біоплівок, пов'язаною зі зменшенням площі відкритої поверхні клітин, що веде до фізичної недоступності молекул. Також особливу роль відіграє резистентний фенотип клітин та знижений метаболізм мікроорганізмів у біоплівці, який досягається за рахунок їх багатосарової топографії та веде до зниження антибіотикочутливості. Будова біоплівок ідеально сприяє процесам обміну генетичною інформацією, в тому числі резистентності до антимікробних хіміопрепаратів, за рахунок тісного контакту та стабільної просторової локалізації клітин. Дослідження *in vitro* показують, що рівень кон'югації у біоплівках набагато вище, порівняно з планктонними формами бактерій. Більш того, процеси кон'югації можуть регулюватися на популяційному рівні за

рахунок бактеріальної комунікації, наприклад, вірулентні ентерококи для передачі генетичної інформації використовують сигнальні системи.

Дію всіх механізмів стійкості бактерій можна звести до одного явища - це попередження взаємодії антибіотика з його мішенню (за рахунок змін самих мішеней, або за допомогою синтезу ферментів, які нейтралізують антибіотики). В той же час толерантність опосередковується здатністю мікробної клітини виживати за присутності антибіотика за рахунок уповільнення метаболізму та «виключення» основних біологічних процесів клітини. Антибіотики ефективно проявляють свою дію по відношенню до клітин, що інтенсивно діляться, з високим рівнем синтетичних процесів. А коли клітина знаходиться в стадії фізіологічного спокою («клітинного анабіозу»), антибактеріальний засіб не здатний проявити у повній мірі свою біохімічну функцію. Наприклад, еритроміцин інгібує біосинтез білка, цим проявляється його бактеріостатичний ефект (клітина не росте, не розмножується, метаболізм уповільнюється). Але клітина не гине безпосередньо від дії препарату. Стрептоміцин, аміноглікозиди, фторхінолони порушують процеси трансляції, реплікації. «Виключаючи» на час роботи рибосом, клітина-персистер буде проявляти толерантність до аміноглікозидів, макролідів. Оскільки персистери не ростуть, не діляться, хромосома та білкові системи реплікації, репарації, транскрипції знаходяться в інтактному стані, то дія фторхінолонів не проявиться. Наслідком вищевказаних «виключень» біологічних функцій клітини є також припинення синтезу пептидоглікану, зупиняється побудова клітинної стінки, в зв'язку з цим, β -лактамі антибіотики також будуть не ефективні. Білки персистерів виключають роботу, функцію всіх мішеней антибіотиків, викликаючи тим самим мультитолерантність (MDT, multi-drug tolerance). Відповідно, бактерицидні антибіотики щодо персистерів будуть проявляти тільки бактеріостатичний ефект.

Однак подібні фенотипічні реакції на лікування антибіотиками можуть мати різні основні умови навіть для біоплівки, утвореної одним видом, і мати схожу структуру. Наприклад, толерантність до тобраміцину в біоплівках *P. aeruginosa* PA14 може бути викликана периплазматичними глюконами, які зв'язують

тобраміцин та запобігають загибелі клітин, швидше за все, шляхом секвестрування антибіотика. Синтез периплазматичних глюканів потребує гена *ndvB* у *P. aeruginosa* PA14, а біоплівки, утворені мутантом *P. aeruginosa* *ndvB*, виявились набагато більш чутливими до тобраміцину, ніж біоплівки дикого типу.

На відміну від цього, мутант *ndvB* і дикий тип не виявили різниці в чутливості до тобраміцину при вирощуванні в планктонній культурі. Зворотна транскриптазна ПЛР дала свідчення того, що ген *ndvB* експресувався специфічно у біоплівках *P. aeruginosa* PA14, а не в планктонних клітинах. Однак мікроаналітичний аналіз дав докази того, що *ndvB* експресується на однаково низькому рівні в біоплівці та планктонних клітинах *P. aeruginosa* PAO1, а отже, *ndvB*-опосередкований механізм обмежується специфічними штамми *P. aeruginosa*. Однак біоплівки *P. aeruginosa* PAO1 також проявляють толерантність до впливу тобраміцину, і в цьому випадку позаклітинна ДНК, мабуть, має першочергове значення, оскільки вона зв'язує тобраміцин і захищає антибіотик.

Кворум-сенсинг може відігравати важливу роль у формуванні біоплівки

Відповідно до того, що бактерії тісно пов'язані у біоплівках, показано, що відчуття кворуму (кворум-сенсинг, QS) відіграє роль у формуванні біоплівки для різних видів бактерій, наприклад, *P. aeruginosa* та *B. cenocepacia*.

Формування, ріст, міграція планктонних форм клітин для колонізації у біоплівках регулюються на рівні популяції механізмами міжклітинної комунікації. «Quorum sensing» (QS) - це процес колективної координації експресії генів в популяції бактерій, який визначає специфічну поведінку клітин. 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 конкретний клітинний сигнал клітини в популяції відповідають специфічною відповіддю. Насьогодні встановлено, що клітинно-клітинні взаємозв'язки впливають на внутрішньопопуляційне диференціювання клітин, на експресію генів

вірулентності, регулюють ростові процеси, характер та напрямок руху (таксис), а також бактеріальний апоптоз та токсиноутворення. Роботу QS можна порівняти з гормональною регуляцією функціональної активності різних органів і тканин в багатоклітинному організмі. Грампозитивні та грамнегативні мікроорганізми використовують різні сигнальні системи та різні хімічні передавачі сигналів.

Davies та ін. показали, що штам *P. aeruginosa*, мутантний за відчуттям кворуму, утворив плоскі та недиференційовані біоплівки в проточних камерах за умов, коли штам дикого типу утворював біоплівки з великими грибоподібними структурами. Крім того, Hentzer та ін. продемонстровано, що ацильовані гомосеринові аналоги лактону, які інгібують кворум-сенсинг, впливають на утворення біоплівки *P. aeruginosa* у проточних камерах.

Подальші дослідження дали додаткові докази важливості кворум-сенсингової сигналізації для структурного розвитку біоплівки *P. aeruginosa*. Відчуття кворуму відіграє певну роль у генеруванні позаклітинної ДНК у біоплівках *P. aeruginosa*. Крім невеликої кількості позаклітинної ДНК, присутньої в початковій фазі в біоплівках *P. aeruginosa*, вивільнення великої кількості позаклітинної ДНК відбувається на більш пізній стадії формування біоплівки *P. aeruginosa*, регульованої за допомогою кворум-сенсингової системи, що базується на *Pseudomonas* кінолоновому сигналі (PQS). Наведено докази того, що вивільнення ДНК у біоплівці *P. aeruginosa* відбувається як наслідок лізису невеликої субпопуляції бактерій. Відповідно до ролі кворум-сенсингової системи, що базується на PQS, у поколінні позаклітинної ДНК, яка функціонує як матричний компонент біоплівки, мутанти *P. aeruginosa* *pqs* мали дефекти у формуванні біоплівки та тонкі біоплівки, які містили мало позаклітинної ДНК.

Механізм участі PQS-опосередкованого ДНК-вивільнення невідомий, проте було надано докази того, що PQS може діяти як клітино-чутливий про-оксидант, що може спричинити лізис субпопуляції бактерій *P. aeruginosa* під час утворення біоплівки.

Окрім позаклітинної ДНК, кворум-сенсингова сигналізація контролює вироблення біосурфактантів рамноліпідів, що було показано важливим для

формування біоплівки *P. aeruginosa*. Крім того, було показано, що продукція лектинів *P. aeruginosa* LecA та LecB регулюється кворум-сенсингом, і лектини, як було показано, відіграють роль у формуванні біоплівки *P. aeruginosa*. Кворум-сенсингова сигналізація у *P. aeruginosa* також контролює продукцію сидерофорів, таких як піовердин та піохелін, які також мають важливе значення для формування біоплівки.

Хоча відчуття кворуму, очевидно, контролює вироблення багатьох факторів, важливих для формування біоплівки *P. aeruginosa*, роль кворум-сенсингу, як видається, є умовною, оскільки штами, мутантні за відчуттям кворуму, явно утворюють біоплівки, які не відрізняються від біоплівки дикого типу в деяких умовах. Більш визначеною потребою відчуття кворуму у формуванні біоплівки, як видається, є випадок з *B. cepacia*. Inhülsen та ін. та Schmid та ін. виділено три основні фактори, які потенційно пов'язують кворум-сенсингову сигналізацію з утворенням біоплівки *B. cepacia*: фімбрії типу 1, лектини BclACB та великий поверхневий білок VarA.

Всі ці фактори знаходяться під регуляцією кворум-сенсингу у *B. cepacia* та були детально досліджені щодо їх ролі у формуванні біоплівки. Ані видалення генів фімбрій типу-1, ані сусідніх генів транспортної системи шаперону-оператора не вплинуло на формування біоплівки *B. cepacia* в мікротитрувальних планшетах або проточних камерах, що вказує на те, що фімбрії типу 1 не є істотними для формування біоплівки *B. cepacia* на абіотичних поверхнях. Видалення оперону bclACB не призвело до суттєвої різниці у формуванні біоплівки в мікротитрувальних планшетах порівняно зі штамом дикого типу. На відміну від цього, делеція varA, а також суміжних генів, що кодують передбачувану систему транспортування ABC, відповідальної за секрецію VarA, призвела до значного зменшення утворення біоплівки в мікротитрувальних планшетах і проточних камерах. Зниження експресії VarA через промотор, індукований рамнозою в мутанті bclACB, призвело до дефекту утворення біоплівки порівняно з відповідним штамом дикого типу зі зниженою експресією varA, що дозволяє припустити, що лектини важливі для поверхневої

колонізації, коли VarA обмежений, і що VarA є основним фактором утворення біоплівки.

Окрім фімбрій, лектинів та VarA, здається, кворум-чутливість також регулює вироблення позаклітинної ДНК у біоплівках *B. ceposerasia*. McCarthy та ін. наводили докази того, що біоплівки дикого типу *B. ceposerasia*, вирощені в проточних камерах, містять значну кількість позаклітинної ДНК у складі матриксу біоплівки. Навпаки, біоплівки, утворені кворуму-сенсинг-дефектними *B. ceposerasia*, ніколи не проходили початкову стадію мікроколонії, а тонкі біоплівки виявляли незначне забарвлення пропідіум йодидом, що свідчить про те, що позаклітинна ДНК не утворюється у великих кількостях.

Бактеріальні субпопуляції розвиваються та взаємодіють протягом формування біоплівки

Як описано вище, різні бактерії у біоплівках із змішаними видами можуть брати участь у метаболічній взаємодії, і це впливає на формування біоплівки та структуру біоплівки. Однак виявляється, що субпопуляції розвиваються та взаємодіють у моновидових біоплівках та ці взаємодії впливають на формування біоплівки та структуру біоплівки. Наприклад, рухливі та нерухливі субпопуляції, які можуть розвиватися під час формування біоплівки *P. aeruginosa*, взаємодіють різними способами.

Yang та ін. надано докази того, що PQS кворум-сенсингова система та гени, необхідні для синтезу піовердину, експресуються лише у стебловій частині грибоподібних мікроколоній, що утворюються у біоплівках *P. aeruginosa*, вирощених на глюкозі. PQS кворум-сенсинг контролює вироблення позаклітинної ДНК у біоплівках *P. aeruginosa*, і було надано доказ, що вивільнення позаклітинної ДНК бактеріями в початкових мікроколоніях (які згодом складають стеблінну частину зрілих грибоподібних мікроколоній) необхідне для розвитку грибоподібних мікроколоній. Крім того, були представлені докази того, що виробництво піовердину в початкових мікроколоніях необхідне для поглинання заліза субпопуляцією, що утворює шапки, та для розвитку грибоподібних мікроколоній.

Пропозиції Yang та ін. в основному базувалися на генетичних даних.

Експерименти за участю штамів *P. aeruginosa* з *pqsA::gfp* та *pvdA::gfp* флуоресцентними репортерами дали докази того, що гени, необхідні для PQS-кворум-сенсингу та синтезу піовердину, були експресовані конкретно у стебловій частині грибоподібних мікроколоній у біоплівках *P. aeruginosa*. Три мутантні штами *P. aeruginosa pilA*, *P. aeruginosa pvdA* (дефіцит у продукції піовердину) та *P. aeruginosa pqsA* (дефіцит PQS-кворум-чутливості) не змогли формувати грибоподібні структури відособлено в одновидових біоплівках.

Мутанти *P. aeruginosa pilA* могли утворювати лише початкові мікроколонії, оскільки для формування шапки необхідні пілі типу IV, і виявилось, що мутантні штами *P. aeruginosa pvdA* та *P. aeruginosa pqsA* також мали дефект у формуванні шапки. Однак грибоподібні структури з мутантами *pilA* у стеблі та мутантами *pqsA* в ковпачку формувалися у *pilA/pqsA* біоплівках змішаних штамів. Так само грибоподібні структури з мутантами *pilA* у стеблі та мутантами *pvdA* в ковпачку формувалися у *pilA/pvdA* біоплівках змішаних штамів. Здається, що мутанти *pilA*, *pvdA* та *pqsA* не можуть утворювати грибоподібні мікроколонії окремо в біоплівках, утворених одним штамом, але в біоплівках змішаних штамів *pilA/pqsA* та біоплівках змішаних штамів *pilA/pvdA* субпопуляції взаємодіють між собою та разом вони утворюють грибоподібні мікроколони.

Формування біоплівки програмується у сенсі, що бере участь регульований синтез компонентів екстрацелюлярного матриксу, але це також визначається адаптивними відповідями

Спостереження за грибоподібними мікроколоніями, які можуть утворюватися в біоплівках *P. aeruginosa*, вирощеної в проточних камерах, призвели до порівняння між мікроколоніями біоплівки *P. aeruginosa* та плодовими тілами, які утворюються бактеріями *Mucococcus*, і це призвело до спекуляцій щодо утворення біоплівки як високопрограмованого процесу розвитку з ієрархічно упорядкованими генетичними шляхами, що контролюють прихильність, формування мікроколонії та дозрівання мікроколонії. Модель розвитку передбачає, що структура біоплівки розвинулася для забезпечення

конкретної функції. Наприклад, було запропоновано, що здатність *P. aeruginosa* утворювати грибоподібні мікроколонії в біоплівках розвинулася в результаті еволюції на рівні групи, оскільки ці структури забезпечують ефективне постачання бактерій поживними речовинами та ефективне видалення відходів. Однак наявні дані свідчать про те, що грибоподібні мікроколонії формуються в біоплівках *P. aeruginosa*, вирощеної в проточній камері, головним чином як наслідок особливих умов у проточній камері та існування рухливих та нерухливих субпопуляцій.

Через споживання бактеріальних поживних речовин градієнт поживних речовин зменшується від верху до низу біоплівки в проточній камері. Отже, рухливі бактерії, що накопичуються у верхній частині мікроколонії, мають перевагу в рості порівняно з бактеріями в нижній частині біоплівки і можуть розмножуватися, утворюючи шапки грибів. Як описано вище, позаклітинна ДНК, що вивільняється нерухливими бактеріями, здається, важлива для осідання рухливих бактерій у кришковому відділі грибоподібних мікроколоній. Крім того, також відомо, що продукція екзополісахаридів, продукція поверхнево-активної речовини рамноліпідів, кворум-сенсинг та сидерофори також беруть участь у формуванні грибоподібних мікроколоній.

В даний час не зрозуміло, чому популяція *P. aeruginosa* диференціюється на нерухливі та рухливі субпопуляції на початковій стадії утворення біоплівки в проточних камерах, що живляться глюкозою, а не в проточних камерах, що живляться цитратами.

Якщо утворення біоплівки є високопрограмованим процесом, можна очікувати, що основний набір «генів біоплівки» буде виражений у всіх біоплівках даної бактерії.

У випадку з *P. aeruginosa* було проведено ряд мікроаналітичних аналізів для моніторингу генів, які експресуються під час формування біоплівки.

Однак, транскриптомічний аналіз, проведений різними дослідницькими групами, не зміг послідовно визначити конкретні регулятори біоплівки. Невизначення загальних тем у профілі експресії генів клітин біоплівки

P. aeruginosa свідчить про те, що утворення біоплівки в основному регулюється адаптивними реакціями. Це узгоджується з тим, що структурний розвиток біоплівки *P. aeruginosa* та різних багатовидових біоплівок залежить від харчових умов і може змінюватися у відповідь на зміни поживних умов, як описано вище. Однак для формування біоплівки потрібна експресія матричних продуктів біоплівки. У випадку з *P. aeruginosa* ці матричні продукти біоплівки включають Psl, Pel, альгінати, позаклітинні ДНК, пілі IV типу, Cup, CdrA, LecA, LecB і Fap. Синтез багатьох цих продуктів позитивно регулюється внутрішньоклітинною сигнальною молекулою c-di-GMP. Як було сказано раніше, синтез і деградація c-di-GMP в бактеріях здійснюється за допомогою дигуанілатциклаз і фосфодіестераз, які містять сенсорні домени, що дозволяє переводити різноманітні сигнали навколишнього середовища в синтез або деградацію c-di-GMP, яка зв'язується з ефектором нижче за течією молекули та модулює свою функцію, в результаті чого регулюється виробництво різних адгезинів та матричних продуктів біоплівки. Тому виявляється, що утворення біоплівки запрограмоване в тому сенсі, що бере участь регульований синтез компонентів позаклітинного матриксу. Однак, хоча дослідники визначили ряд стадій біоплівки, в даний час немає даних, які б з'єднували початкове виробництво матрикса, регульоване c-di-GMP, до конкретних стадій, що відбувалися пізніше під час формування біоплівки. Крім того, наразі немає доказів того, що різні сигнальні схеми c-di-GMP є ієрархічно упорядковані для управління переходами через конкретні етапи формування біоплівки. Специфічні для біоплівки шляхи можуть бути обмежені початковою регуляцією адгезії та отримання матрикса, тоді як послідовні етапи формування біоплівки можуть регулюватися адаптивними реакціями.

Формування біоплівки сильно регулюється адаптивними відповідями окремих бактерій, проте діяльність групового рівня також має місце

Як було сказано вище, утворення біоплівки можна розглядати як процес розвитку або як процес, що регулюється адаптивними реакціями окремих бактерій. Формування біоплівки як процес розвитку включає в себе

біоплівкоспецифічні гени, які є частиною ієрархічно впорядкованих шляхів, призначених для контролю переходу через конкретні стадії біоплівки. Формування біоплівки, що регулюється адаптивними реакціями, передбачає здатність окремих бактерій регулювати клітинну адгезивність та рухливість у відповідь на мікроекологічні сигнали. Гіпотези щодо розвитку та адаптаційного реагування можна виділити в еволюційному плані, оскільки перша передбачає вибір певної ознаки через користь для групи, тоді як остання передбачає вибір певної ознаки через користь для кожної бактерії. Очевидно, що кооперативні риси біоплівки в багатьох випадках можуть бути пояснені відповідними перевагами такої поведінки для кожної бактерії. Наприклад, формування регулярних грибоподібних структур у біоплівках *P. aeruginosa* через шлях, який передбачає тип IV пілі-залежну клітинну міграцію, може бути скоординованим соціальним процесом, який створює біоплівки з архітектурами, які дозволяють забезпечити оптимальну циркуляцію та постачання поживних речовин популяції, або, тому що градієнти поживних речовин розвиваються в біоплівках, можуть бути результатом хемотаксису окремих бактерій, що переходять до сприятливого мікросередовища, що містить поживні речовини.

Виробництво компонентів, що забезпечують взаємозв'язок клітина-клітина, в біоплівках може бути витратою кожної бактерії, що сприяє соціальній активності створення захисної біоплівки, або може просто підвищити адгезивність окремих бактеріальних клітин, дозволяючи їм зберігатися в специфічному середовищі. Кворум-сенсинг-залежна продукція позаклітинної ДНК і лектинів у біоплівках *P. aeruginosa*, а також кворум-сенсинг-залежна продукція поверхневих білків, фімбрій та лектинів у біоплівках *V. senocerasia*, може трактуватися як групова діяльність. Однак замість засобу регулювання вироблення конкретних факторів на груповому рівні, кворум-сенсинг може бути дифузійно-чутливим, що дає можливість окремій бактерії визначати, чи швидко молекули, які секретовані, віддаляються від клітини. І все ж спостережуване залучення кворум-сенсингу до вивільнення ДНК з субпопуляції, що піддається лізису, в біоплівках *P. aeruginosa*, що призводить до стабілізації біоплівки, може

трактуватися як соціальна поведінка, оскільки клітини, які піддаються лізису, забезпечують ДНК, але очевидно, самі не отримують користі.

Формування біоплівки завершується у відповідь на конкретні сигнали довкілля

Згідно з припущенням про те, що утворення біоплівки в основному регулюється адаптивними реакціями і не передбачає стабільних або метастабільних змін у розвитку, бактерії в біоплівках можуть на будь-якій стадії відчутти екологічний сигнал і припинити утворення біоплівки у відповідь на конкретні сигнали. У випадку з *P. putida*, наприклад, було показано, що закріплені біоплівки, вирощені в проточній камері, можуть повністю розповсюджуватися (розпорошуватися) протягом декількох хвилин у відповідь на перехід від середовища із джерелом Карбону до середовища без джерела Карбону або у відповідь на зупинку потоку середовища, у якому вони росли. Утворення біоплівки *P. putida* в проточних камерах в основному регулюється великим адгезивним білком LapA. Наведено докази того, що c-di-GMP сигналізація регулює утворення біоплівки у *P. putida*, контролюючи наявність LapA на клітинній поверхні. Наявність LapA на клітинній поверхні контролюється білками LapD та LapG у відповідь на внутрішньоклітинний рівень c-di-GMP. Білок LapG є периплазматичною протеїназою, і він здатний відщеплювати LapA з клітинної поверхні, коли він не репресується. Білок LapD охоплює цитоплазматичну мембрану і містить вироджені домени GGDEF і EAL, які можуть зв'язувати c-di-GMP, і він регулює активність протеїнази LapG, пригнічуючи її, коли внутрішньоклітинний рівень c-di-GMP високий і пригнічує її коли внутрішньоклітинний рівень c-di-GMP низький. Нещодавно ідентифікований ген фосфодіестерази c-di-GMP у *P. putida*, гомологічний гену *bifA* у *P. aeruginosa*, був визначений як необхідний для розпорошення біоплівки *P. putida*, що індукується голодом, поряд із геном *lapG*, що передбачає зв'язок між активністю *P. putida* фосфодіестерази *BifA* та LapG-опосередкованим розпорошенням.

Описана вище робота разом із структурною та біохімічною роботою, проведеною з *P. fluorescens*, дозволяє припустити, що *P. putida* може швидко припинити утворення біоплівки у відповідь на голодування за допомогою таких механізмів: 1) обмеження поживних речовин призводить до активації фосфодіестерази VifA через невідомий шлях; 2) активація фосфодіестерази VifA призводить до зниження рівня c-di-GMP поблизу трансмембранного білка LapD; 3) зниження рівня c-di-GMP викликає дисоціацію c-di-GMP через білок LapD; 4) дисоціація c-di-GMP через LapD викликає депресію периплазматичної протеази LapG; 5) депресована протеаза LapG відщеплюється від клітинного білка LapA; 6) розщеплення білка LapA призводить до вивільнення клітин з біоплівки.

Отже, за останнє десятиліття ми отримали багато знань про молекулярні механізми, які беруть участь у ініціації та припиненні утворення біоплівки. У багатьох бактеріях ці процеси, як видається, відбуваються у відповідь на конкретні сигнали навколишнього середовища і призводять, відповідно, до індукції або припинення продукції матрикса біоплівки через молекулу вторинного месенджера c-di-GMP. Між початком і припиненням утворення біоплівки ми визначили конкретні стадії біоплівки, але наявні в даний час дані свідчать, що ці переходи в основному регулюються адаптивними реакціями, а не конкретними генетичними програмами. Здається, що утворення біоплівки може відбуватися по декількох шляхах і що просторова структура біоплівки залежить від видів, а також залежить від умов навколишнього середовища. Бактеріальні субпопуляції, наприклад, рухливі та нерухливі субпопуляції, можуть розвиватися та взаємодіяти під час утворення біоплівки, і ці взаємодії можуть впливати на структуру біоплівки. Наявні дані свідчать про те, що утворення біоплівки запрограмоване в тому сенсі, що бере участь регульований синтез компонентів позаклітинного матриксу. Крім того, наші сучасні знання говорять про те, що формування біоплівки в основному регулюється адаптаційними реакціями окремих бактерій, хоча діяльність на рівні групи також бере участь.

Усвідомлення того, що ряд окремих ланцюгів сигналізації c-di-GMP регулює продукцію різних компонентів матриксу біоплівки в бактеріях у відповідь на конкретні екологічні сигнали, стало головним кроком уперед у дослідженнях біоплівки. Однак, хоча ми визначили ряд стадій біоплівки, в даний час немає даних, які б з'єднували початкову продукцію матриксу, регульовану c-di-GMP, до конкретних стадій, що відбуваються пізніше під час формування біоплівки, і в даний час немає доказів того, що різні c-di-GMP схеми сигналізації ієрархічно упорядковані для управління переходом через конкретні етапи формування біоплівки. Подальші дослідження покажуть, чи обмежені специфічні для біоплівки початкові та кінцеві c-di-GMP-опосередковані регулювання виробництва адгезину та матриксу, з тим, що між проміжними стадіями утворення біоплівки регулюються адаптивні реакції, чи різняться схеми сигналізації di-GMP ієрархічно упорядковані для управління переходом через конкретні етапи формування біоплівки.

Лекція 3

Технології дослідження біоплівок

План

1. Спектрофотометричні методи.
2. Мікроскопічні методи.
3. Деякі молекулярно-генетичні методи.
4. Біофоміка.

Використані літературні джерела:

1. Franklin M.J., Chang C., Akiyama T., Bothner B. New Technologies for Studying Biofilms. In: Microbial biofilms / Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. [eds]. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 1-32.

2. Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии. *Микробиология*. 2015. Т. 84, № 6. С. 623–644. DOI: 10.7868/S0026365615060117

За невеликий час було зроблено багато відкриттів щодо фізіології, генетики та екології мікроорганізмів, що ростуть у біоплівках. Ці відкриття стали частково можливими завдяки швидким технологічним прогресам, що відбулися в біологічних дослідженнях. Ці досягнення включають адаптацію нових стратегій молекулярних, аналітичних та візуальних зображень.

Технологічні розробки включають застосування «omics» технологій у дослідженнях біоплівки. Наприклад, високопропускні технології секвенування ДНК (секвенування наступного покоління) були використані для досліджень геноміки та метагеноміки та дали зрозуміти потенціал генетичного кодування біоплівкових організмів та структури спільноти біоплівки. Транскриптомічні підходи, включаючи РНК сиквенс, мікроматриці та кількісну ПЛР зворотної транскрипції (RT-qPCR), розширили наше розуміння глобальних та локалізованих процесів експресії генів, що відбуваються в біоплівках.

Масова спектрометрія також полегшила наше розуміння протеоміки біоплівки і буде корисна для метаболічного профілювання біоплівки (метаболоміки).

Візуалізація біоплівки також забезпечила більшу оцінку складності та динаміки біоплівки. Успіх технології візуалізації призвів до можливості отримання 3D-зображень гідратованих біоплівок в режимі реального часу. Флуоресцентні білки, які доступні в різних кольорах, дозволяють зобразити та диференціювати бактеріальні клітини. Коли злиті з промоторними послідовностями або іншими білками, флуоресцентні білки також дають змогу візуалізувати локалізацію в експресії мікробного гена. Флуоресцентне забарвлення в поєднанні з конфокальною скануючою лазерною мікроскопією (confocal scanning laser microscopy CSLM) та високошвидкісними

обчисленнями надає інформацію про локалізацію та гетерогенність клітин. Зараз для деяких компонентів позаклітинних матеріалів доступно декілька флуоресцентних фарбників, що забезпечують тривимірний структурний аналіз позаклітинного матеріалу біоплівки. Флуоресцентна гібридизація *in situ* (Fluorescent in situ hybridization FISH) надала інформацію про структуру спільноти біоплівки. Інші підходи до візуалізації дозволяють охарактеризувати хімію біоплівки, включаючи ядерно-магнітно-резонансну томографію, яка забезпечує інформацію про динаміку води у біоплівках, в той час як аналіз інфрачервоної спектроскопії перетворення Фур'є (Fourier transform infrared spectroscopy FT-IR) та Раманові зображення біоплівки дозволяють охарактеризувати клітинні та позаклітинні композиції.

Використання нової технології для вивчення біоплівки залежить від масштабів інтересу в характеристиці біоплівки. Ці масштаби можуть бути на системному рівні (використовуючи omics або зображувальні підходи), клітинному рівні (використовуючи такі підходи, як мікрофлюїдика (мікрорідини) та лазерне мікропрепарування), або рівні гена/ферменту (з використанням мутагенезу, активності ферментів та синтезу генів). Комбінуючи ці різні стратегії, можливо, можна отримати комплексний аналіз на рівні системного рівня структури, функції та динаміки мікробних біоплівок. У цій лекції ми розглянемо деякі з цих нових технологій для вивчення біоплівки та надамо інформацію про деякі нові технології, які, ймовірно, будуть застосовані до досліджень біоплівки.

1. Спектрофотометричні методи

Фарбники та індикатори метаболізму.

Класичним способом кількісної характеристики росту біоплівок, використовуваним протягом всієї історії їх вивчення, є фарбування 0,02-1,0 % водним розчином бактеріологічного барвника кристалічного фіолетового (CV) (або його модифікації, генціанвіолета) з наступною екстракцією барвника, зв'язаного з біоплівкою, етиловим спиртом або розведеною оцтовою кислотою

і вимірюванням оптичної щільності екстракту при 590 нм. Це найпростіший у виконанні метод, який, проте, має ряд недоліків.

По-перше, CV забарвлює як матрикс біоплівки, так і мікробні клітини, що входять до нього, тому не дозволяє стежити за динамікою роздільного накопичення цих компонентів біоплівки. По-друге, в разі деяких мікроорганізмів (наприклад, псевдомонад) результати фарбування сильно варіюють. Крім того, вимірюванню заважає наявність в клітинах пігментів, що мають близькі до CV максимуми поглинання (наприклад, віолацеїну). У цьому випадку доцільно використовувати інший барвник, а саме, сафранін.

Іншим популярним барвником, що володіє специфічністю до кислих полісахаридів матриксу біоплівки, є 1,9-диметилметиленовий синій (DMMB). Спочатку він був запропонований для фарбування сульфатованих глікозаміногліканів тваринних тканин, а пізніше успішно використаний для фарбування матриксу біоплівки *Staphylococcus aureus*, що містить аніонні полісахариди (зокрема, адгезин, що включає фосфатні і сукцинатні залишки). DMMB забарвлює матрикс біоплівки ряду інших грампозитивних, а також грамнегативних бактерій. Встановлена пряма кореляція між фарбуванням DMMB і здатністю до синтезу матриксу біоплівки *Chromobacterium violaceum*: мутант *C. violaceum* CV026, слабо забарвлюваний DMMB, виявляє дефект у формуванні матриксу біоплівки, підтверджений методами світлової, електронної та атомно-силової мікроскопії.

Ще одним широко використовуваним для фарбування біоплівки барвником є конго-червоний (Congo Red (CR)), який найчастіше застосовується для диференціювання колоній бактерій, здатних і нездатних до формування біоплівки. CR забарвлює, головним чином, глюкан, а також амілоїдні білки, які входять до складу матриксу біоплівки дуже багатьох бактерій. Запропоновано, наприклад, виявляти шляхом вирощування на щільному середовищі, що містить CR, варіанти патогенних штамів *S. aureus*, здатних до біоплівкоутворення, та таких, що вимагають посиленого впливу хіміотерапевтичних агентів. Аналогічний метод із застосуванням CR

використаний для виявлення біоплівкоутворюючих штамів *S. epidermidis*, що викликають забруднення концентратів тромбоцитів, а також для оцінки біоплівкоутворення *P. aeruginosa* при випробовуванні антибіоплівкових агентів.

Всі згадані методи фарбування дають можливість вивчити масштаб і динаміку процесу формування біоплівок, але не дозволяють оцінити співвідношення присутніх в них живих і мертвих клітин мікроорганізмів. Відзначимо, що застосування класичних методів визначення колонієутворюючих одиниць (КУО) в разі біоплівок дає незадовільні результати через неможливість повного диспергування позаклітинного полімерного матриксу.

Для визначення співвідношення живих і мертвих клітин в біоплівках використовують, як правило, суміш двох барвників, один з яких проникає всередину тільки мертвих клітин з ушкодженою мембраною. Широке поширення отримали флуоресцентні барвники, які, хоча і вимагають наявності спеціальної мікроскопічної техніки, але дають при дослідженні біоплівок більш-менш адекватні результати. Ми повернемося до розгляду застосування флуоресцентних барвників в питанні мікроскопічних методів.

Інший, альтернативний прийом полягає у використанні індикаторів метаболізму. Серед таких широкого поширення набули 7-окси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксид (резазурин, НРО), діацетат флуоресцеїну (FDA), а також хлоргідрат 2,3-біс-(2-метокси-4-нітро-5-сульфопеніл)-5-[(феніламіно)карбоніл]-2Н-тетразолію (ХТТ), НРО (відомий також як CellTiter-Blue або AlamarBlue) нетоксичний і не руйнує живі клітини. Мікроорганізми, що володіють активним метаболізмом, відновлюють нефлуоресціюючий, пофарбований в синій колір НРО, в продукт, що володіє рожевою флуоресценцією (λ_{ex} 560 нм і λ_{em} 590 нм), кількість якого прямо пропорційна числу активних клітин. Цей метод відносно простий у виконанні і дозволяє визначити 10^3 - 10^8 колонієутворюючих одиниць в зразку біоплівки.

FDA, після поглинання живими клітинами мікроорганізму, гідролізується внутрішньоклітинними естеразами до флуоресцеїну, кількість якого можна виміряти на флуориметрі (λ_{ex} 494 нм і λ_{em} 518 нм). Мертві клітини не здатні метаболізувати FDA. Кількісні межі визначення живих клітин такі ж, як і в разі НРО. FDA може бути використаний в двокомпонентному реактиві для диференціації живих і мертвих клітин.

ХТТ відновлюється мікроорганізмами, що володіють дихальним ланцюгом переносу електронів, з утворенням водорозчинного фармазану, вимірюваного спектрофотометрично при 486 нм. Метод успішно використаний для мультивидових біоплівочок, наприклад, бінарних біоплівочок, що включають *Candida albicans* і *S. epidermidis*.

2. Мікроскопічні методи

Епіфлуоресцентна, лазерна інтерференційна і конфокальна мікроскопія широко використовуються для дослідження різних мікроскопічних об'єктів, в тому числі біоплівочок. В попередньому питанні зазначалося про застосування комбінації флуоресцентних барвників для визначення кількості живих і мертвих клітин. Барвник SYTO-9, що входить до складу цього реактиву, успішно використаний (поряд з іншими флуорохромами) для забарвлення біоплівочок, наприклад, при вивченні складу мультивидових біоплівочок, локалізованих на внутрішній поверхні трубопроводів для подачі питної води. Існує ряд специфічних флуоресцентних барвників, що дозволяють виявляти в матриці біоплівочок нуклеїнові кислоти, білки, полісахариди і ліпіди.

Звичайні методи світлової мікроскопії застосовні тільки до тонких зразків, тоді як біоплівки є тривимірними об'єктами. Для їх дослідження знадобилися методи мікроскопії, що дозволяють сканувати подібні об'єкти «пошарово». Найбільшого поширення набули лазерна інтерференційна і лазерна скануюча конфокальна мікроскопії (CLSM), а також різні її різновиди в поєднанні з методами епіфлуоресцентної і FISH мікроскопії.

Розгляду цих методів присвячено кілька оглядів (Neu T.R., Lawrence J.R. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol.* 2015. V. 23. P. 233–242.; Fish K.E., Collins R., Green N.H., Sharpe R.L., Douterelo I., Osborn A.M., Boxall J.B. Characterisation of the physical composition and microbial community structure of biofilms within a model full-scale drinking water distribution system. *PLoS ONE.* 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0115824 February 23.).

Останнім часом успішно розвиваються напрямки дослідження біоплівки, в яких використовують поєднання *раманівської спектроскопії* з мікроскопією (RM). Спектроскопія комбінаційного розсіювання дозволяє ідентифікувати коливальні «відбитки» молекул, а, отже, візуалізувати розподіл окремих мікроорганізмів і продуктів їх метаболізму в інтактному мікробному угрупованні. Ця обставина вигідно відрізняє даний метод від інвазивних прийомів в інших мікроскопічних методах, які потребують фіксації і зневоднення об'єктів, а також від методу інфрачервоної мікроспектроскопії, в якому екрануючу роль відіграє водне середовище. За допомогою конфокальної раманівської мікроскопії (CRM) вдалося, наприклад, визначити локалізацію анаеробних амоній-окиснювальних бактерій в мультивидових біоплівках без попередньої обробки препаратів. Підвищення чутливості методу шляхом використання наночастинок срібла (активують поверхневе комбінаційне світлорозсіювання, SERS) дозволяє простежити динаміку компонентів матриксу біоплівки в процесі їх формування.

Електронна мікроскопія в класичному варіанті мало придатна для вивчення нативних біоплівки, оскільки вимагає фіксації та зневоднення об'єкта. Проте просвічувальна електронна мікроскопія (ТЕМ) дозволяє виявити відмінності в розподілі клітин і в структурі біоплівки (зокрема, наявність або відсутність мембранних везикул) у мутантів з порушенням синтезу матриксу, а також виявити локалізацію бактерій різних фізіологічних груп навіть в таких складних об'єктах, як великі мультивидові гранули-біоплівки, що формуються в анаммокс-біореакторі.

Однак більш широке поширення для дослідження біоплівки, безсумнівно, отримали методи скануючої електронної мікроскопії (SEM). Існують способи, що дозволяють уникнути порушення структури матриксу через зневоднення при звичайних методах SEM.

Структура матриксу зберігається, якщо препарати обробити барвником рутенієвим червоним, який взаємодіє з полісахаридним каркасом матриксу, або застосувати спеціальну «вологу» камеру. Гарні результати збереження нативної структури матриксу дає також обробка зразків струмопровідними рідкокристалічними препаратами (наприклад, лактатом холіну), які дозволяють проводити напilenня препаратів платиною без їх зневоднення.

Атомно-силова мікроскопія (AFM) дозволяє досліджувати не тільки поверхню, але і тривимірну структуру матриксу біоплівки. Так порівняння штаму дикого типу *Chromobacterium violaceum* WT і мутанта CV026 з порушенням функції системи «кворум-сенсингу» (QS) показало, що утворені останнім біоплівки характеризуються «незрілим» матриксом значно меншої товщини, причому частина клітин не занурена в матрикс. Ця особливість біоплівки мутанта *C. violaceum* CV026 супроводжується підвищенням їх чутливості до теплового та кислотного шоку, а також до антибіотика азитроміцину. Порівняльне дослідження особливостей поверхні бактеріальних клітин в біоплівках штаму дикого типу *C. violaceum* і мутанта CV026 показало наявність специфічних структур, пов'язаних з синтезом матриксу біоплівки і регульованих системою QS. Метод AFM дозволив також вивчити незвичайні фібрилярні структури, що формуються на скельцях обростання, розміщених в анаммокс-біореакторі (біореактор анаеробного окислення амонію).

Ряд робіт присвячений вимірюванню за допомогою AFM адгезії клітин мікроорганізмів до поверхні або до інших клітин в мультивидових біоплівках. Вдалося, наприклад, виміряти силу адгезії клітин *Staphylococcus aureus* до різних ділянок клітин і гіф *Candida albicans* в бінарних біоплівках. Виявилося, що більш сильна адгезія бактеріальних клітин спостерігається в

районах «молодих» ділянок гіфи, тоді як адгезія до «головних» ділянок, що прилягають до материнської клітини, майже на порядок нижче і збігається з адгезією до клітини, що брунькується. Це свідчить про суттєві відмінності в поверхневій структурі різних ділянок гіф.

3. Деякі молекулярно-генетичні методи

Олігонуклеотидні флуоресцентні зонди (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH). Цей метод існує в численних модифікаціях, але всі вони включають кілька загальних етапів: фіксацію зразка, гібридизацію з олігонуклеотидним зондом, що містить на 5'-кінці флуорофор і є специфічним для певної послідовності гена 16S рРНК або іншої мішені, промивання та візуалізацію флуоресцентного сигналу. Спільно з конфокальною мікроскопією цей метод успішно використаний для вивчення 3D-структури мультивидових біоплівок.

Маючи в своєму розпорядженні зонди, специфічні для різних систематичних груп мікроорганізмів, можна встановити склад біоплівкового угруповання і навіть локалізацію конкретних його представників в об'ємі біоплівки. З цією метою використовують спеціальні комп'ютерні програми. Гарні результати дає також поєднання методу FISH з мікроавторадіографією, наприклад, для вивчення нітрифікувальних мультивидових біоплівок, а також мультивидових біоплівок анаммокс-біореактора.

Полімеразна ланцюгова реакція (PCR) широко застосовується як діагностичний метод для ідентифікації та визначення систематичного положення мікроорганізмів в різних системах. Застосування цієї методики для біоплівок пов'язано з методичними труднощами, зумовленими наявністю матриксу, який, з одного боку, ускладнює вилучення клітинної ДНК, а з іншого боку, містить значну кількість позаклітинної ДНК. Для мультивидових біоплівок найкращі результати отримані за допомогою кількісної полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу або її модифікації (qRT-PCR), яка дозволяє проводити аналіз за допомогою клонування генів, що експресуються,

за допомогою попередньої зворотної транскрипції їх мРНК. В цілому можна констатувати, що для дослідження біоплівки останнім часом знаходять все більш широке застосування сучасні «омікс-прийоми», а саме, (мета)геноміка, (мета)транскриптоміка, (мета)протеоміка і метаболоміка (див. далі підпитання «біофоміка» даної лекції).

Фізико-хімічні методи дослідження структури і складу біоплівки відрізняються великою різноманітністю. В рамках даної лекції ми обмежимося коротким розглядом лише найбільш часто використовуваних методів: інфрачервоної спектроскопії (з перетворенням Фур'є, FTIR), мас-спектрометричного аналізу в його варіанті - матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (MALDI) і, нарешті, ядерного магнітного резонансу (NMR).

Ми вже згадували про обмеження можливостей *інфрачервоної спектроскопії* біологічних об'єктів у зв'язку з екрануючим ефектом води. Однак використання перетворення Фур'є для інфрачервоних спектрів (FTIR) дозволяє зменшити побічні ефекти і значно підвищити чутливість. Для ілюстрації можливостей даного підходу пошлемося на дослідження матриксу біоплівки *Shewanella sp.* HRCR-1, яке дозволило встановити наявність в ньому білків, полісахаридів, нуклеїнових кислот, ліпідів і жирних кислот. За допомогою паралельного використання прийомів протеоміки встановлено, що в число білків матриксу біоплівки цього мікроорганізму входять в цілому 58 позаклітинних білків і білків зовнішньої мембрани, зокрема, серинові протеїнази, нуклеази, ліпази, а також білки, які беруть участь у позаклітинному перенесенні електронів, а саме, цитохроми *c*, білки MtrC та OmcA. Цей же метод успішно застосований для визначення антибіоплівкового ефекту фотодинамічного впливу на мультивидові асоціації мікроорганізмів зубних бляшок, а також для кількісної оцінки ступеня пригнічення дріжджових біоплівки компонентами меду китайського фініка (*Jujube*).

Метод мас-спектрометрії в його варіанті MALDI BioType дозволяє виявити і ідентифікувати всі основні типи мікроорганізмів: міцеліальні гриби, дріжджі, бактерії в мікробіомах будь-якого типу, в тому числі

асоційованих з рослинами, в клінічних зразках, а також в угрупованнях, що формуються в анаеробних умовах, причому в складних випадках і при серійних аналізах цей метод має помітні переваги перед секвенуванням генів.

Метод NMR успішно використаний для прогресу досліджень в області так званих «-омікс»-технологій («-omics» technologies), в складі комплексу БіофОмікі (BiofOmics) (див. далі). Цей підхід дозволяє перейти від проведених раніше досліджень морфології, фізіології, а також геноміки процесів формування біоплівки до вивчення біохімічних механізмів переходу мікробних клітин від планктонного до біоплівкового фенотипу. В опублікованому нещодавно огляді (Zhang B., Powers R. Analysis of bacterial biofilms using NMR-based metabolomics. *Future Med. Chem.* 2012. Vol. 4. P. 1273–1306.) розглянуто приклади використання NMR-метаболоміки для дослідження важливих для медицини біоплівок. Наприклад, показано участь цілого ряду зовнішніх чинників і хімічних речовин (етанолу, олеїнової кислоти, глюкози, уридин-дифосфат-N-ацетилглюкозаміну, деяких антибіотиків в субінгібіторних концентраціях, гіпоксії, осмотичного і теплового шоку) в індукції біоплівкової форми існування у *S. aureus* і *S. epidermidis*.

NMR використовували також для вимірювання хімічних та електрохімічних градієнтів в біоплівках *Shewanella oneidensis*, а також швидкості дифузії метаболітів через матрикс біоплівок *Geobacter sulfurreducens* і *S. oneidensis*. За допомогою цього методу виявлені відмінності в будові ліпополісахариду планктонних клітин *Pseudomonas chlororaphis* і клітин, що входять до складу біоплівок: у останніх ступінь ацетилювання 6-О-антигену різко (в 6 разів) знижена в порівнянні з аналогічною структурою планктонних клітин, що істотно впливає на антигенні властивості мікробних клітин.

Методи NMR і MALDI широко використовуються в дослідженні біоплівок прийомами метаболоміки (див. далі підпитання «БіофОміка»). Мікросенсорні пристрої, в яких використані мініатюрні датчики товщиною 10-20 мкм, застосовували для вимірювання рН, а також концентрацій O₂,

NH_4^+ , NO_2^- і NO_3^- в бактеріальному сульфатвідновлювальному угрупованні, яке формує мультивидові біоплівки в біореакторі для очищення стічних вод. За допомогою аналогічних датчиків вдалося вивчити локалізацію метаболічних процесів (зокрема, рівноважні концентрації H_2 , і CH_4), а також рН і окисно-відновний потенціал в гранульованих мультивидових біоплівках з анаеробного лабораторного біореактора. Використовуючи флуоресцентну мікроскопію і силікатні наночастинки (розміром 10 нм) в якості сенсорів, вдалося зафіксувати гетерогенність розподілу рН в біоплівці *E. coli* (в межах рН 5-7), викликане додаванням глюкози.

Цікавим прикладом використання мікросенсорів є також вивчення процесів очищення води від неорганічних сполук Нітрогену в анаммокс-біореакторі, що містить мультивидові гранули-біоплівки.

Іншим авторам вдалося зафіксувати динаміку міжпопуляційних взаємодій в бінарних біоплівках, що складаються з клітин *Methanococcus maripaludis* і *Desulfovibrio vulgaris*, а також двох несхрещуваних штамів дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* шляхом використання мікродифузіонної камери з об'єктивом розміром 700 мкм.

4. Біофоміка

Порівняно нещодавно запропонований термін «біофоміка» («biofOmics») - це свого роду «робочий стіл» («workbench»), призначений для об'єднання результатів різних підходів до вивчення біоплівок. Як ми вже відзначали, до них, зокрема, відносяться: секвенування геномів - (мета)геноміка; визначення профілів мРНК, що експресуються, за допомогою мікрочіпів (microarray) - (мета)транскриптоміка; аналіз білкових профілів - (мета)протеоміка; аналіз ключових метаболітів - метаболоміка. Крім перерахованих запропоновано включати в загальну базу даних і деякі інші підходи, наприклад, феноміку - вивчення метаболічних реакцій і зміни життєздатності клітин у відповідь на стресові умови зовнішнього середовища (або генетичні впливи). Новизна системи «біофоміки» складається в

систематизованому зборі даних, отриманих різними методами, зберіганні їх в цифровій формі і забезпеченні безкоштовного доступу до них. Це дозволить порівнювати результати різних дослідників, оцінювати відтворюваність методів і сприяти розробці нових аналітичних підходів.

Методологія цієї системи викладена в огляді (Lourenco A., Ferreira A., Veiga N., Machado I., Pereira M.O., Azevedo N.F. BiofOmics: a web platform for the systematic and standardized collection of high-throughput biofilm data. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7(6): e39960. doi:10.1371/journal.pone.0039960.), а комп'ютерний «робочий стіл» описаний в статті (Pérez-Rodríguez G., Glez-Pena D., Azevedo N.F., Pereira M.O., Fdez-Riverola F., Lourenco A. *Enabling systematic, harmonised and large scale biofilms data computation: the biofilms experiment workbench*. *Comp. Meth. Progr. Biomed.* 2015. Vol. 118. P. 309–321.) і представлений на сайті <http://sing.ei.uvigo.es/bew>.

Отже, більшість мікробного життя росте в поєднанні з поверхнями. Мікроорганізми, що адаптуються до росту на поверхнях, приймають різні складні форми поведінки, що включають адгезію до поверхні, експресію генів та ферментативні дії, що дозволяють адаптуватися до звичного способу життя. Діяльність мікроорганізмів у біоплівках не є рівномірною у всій біоплівці, і клітини адаптуються до свого місцевого середовища. Для вивчення метаболічної діяльності та фізичного та хімічного середовища спільнот, пов'язаних з біоплівкою, потрібно багато додаткових технологій.

Ці технології включають молекулярні підходи, такі як експресія генів та метаболомічні дослідження для характеристики активності мікробних клітин, аналітичні підходи до розуміння хімії організмів біоплівки та їх матриксових матеріалів, візуалізаційні підходи до характеристики структурно-функціональних зв'язків мікробних клітин та мініатюризаційні дослідження для характеристики фізичних та неоднорідних властивостей біоплівки. Поєднуючи ці та інші нові методи, тепер можна отримати розуміння цих складних мікробних угруповань від генного рівня до рівня систем.

Приклади підходів до вирощування біоплівки та їх дослідження представлено на рис. 3-8.

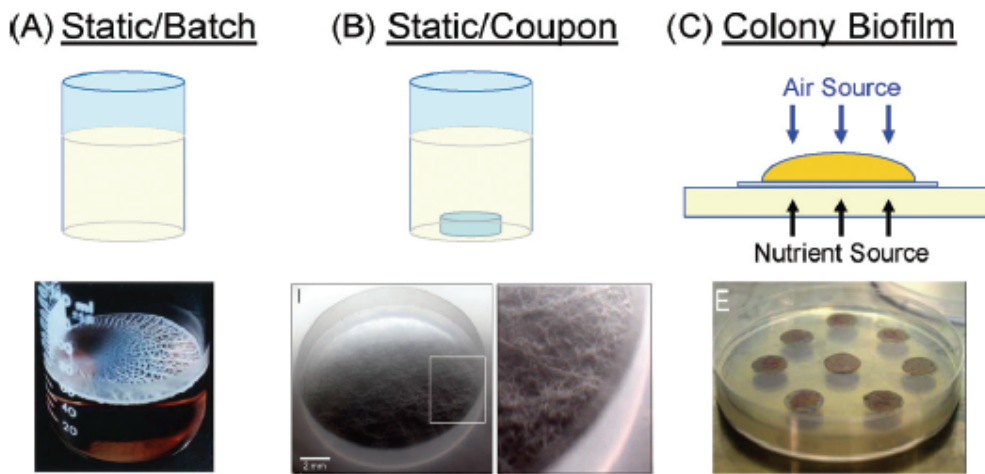


Рис. 3. Приклади способів вирощування біоплівки в статичних умовах. (А) Біоплівка культивується на межі повітря-вода, утворюючи пелікулу. (Б) Біоплівку культивують на скляному купоні в статичних умовах. (В) Приклад росту біоплівки як біоплівки колонії (Franklin et al., 2015)

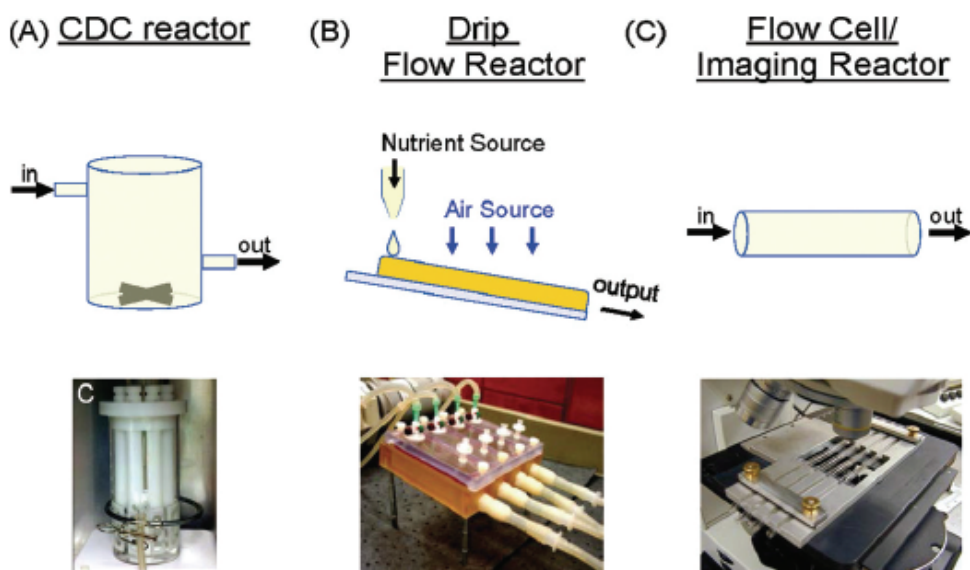


Рис.4. Приклади реакторів безперервного потоку для вирощування біоплівки. (А) CDC-реактор із середніми входними та вихідними портами. Біоплівки формуються на купонах, розташованих на знімних тefлонових стрижнях. (Б) Реактор краплинного потоку із середніми входними та вихідними портами та повітрообмінними портами. Біоплівки формуються на знімних слайдах. (С) Капілярна проточна камера для візуалізації біоплівки (Franklin et al., 2015)

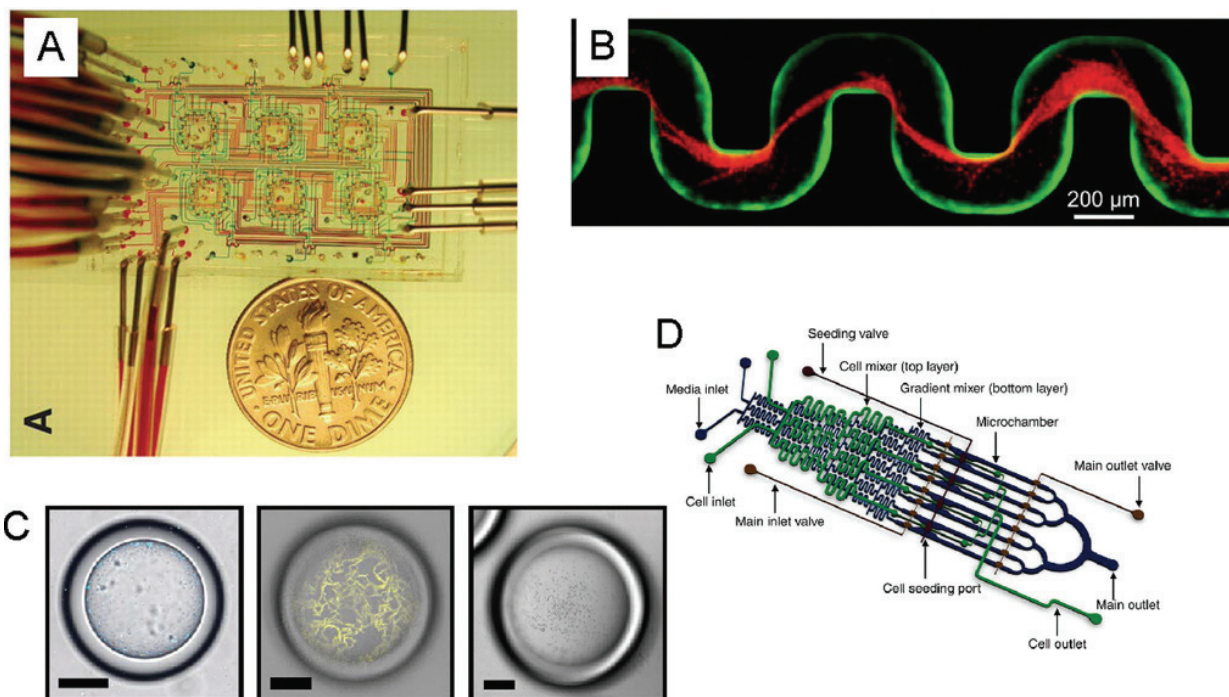


Рис. 5. Приклади мікрорідинних підходів, що застосовуються для досліджень біоплівки. (А) Приклад мікрорідинного пристрою для точного контролю рідин. (В) Стримери (вузькі стрічки) біоплівки, що утворюються в мікрорідинному потоковому каналі. (С) Мікрокраплинний біоплівковий реактор, що демонструє фенотипічне перемикання клітин та одночасну зміну експресії через зміну блакитного флуоресцентного білка на жовтий флуоресцентний білок; (D) Схематичне зображення мікрорідинної проточної камери (Franklin et al., 2015)

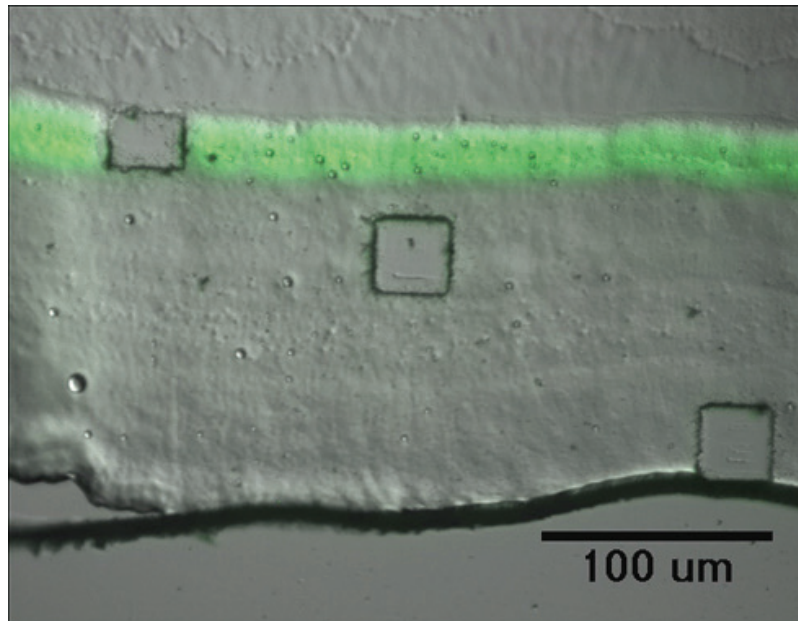


Рис. 6. Приклад вертикальної трансекти біоплівки, що демонструє неоднорідність експресії GFP-гена. Ділянки були вирізані з різних шарів біоплівки та відзняті для транскриптомічного аналізу (Franklin et al., 2015)

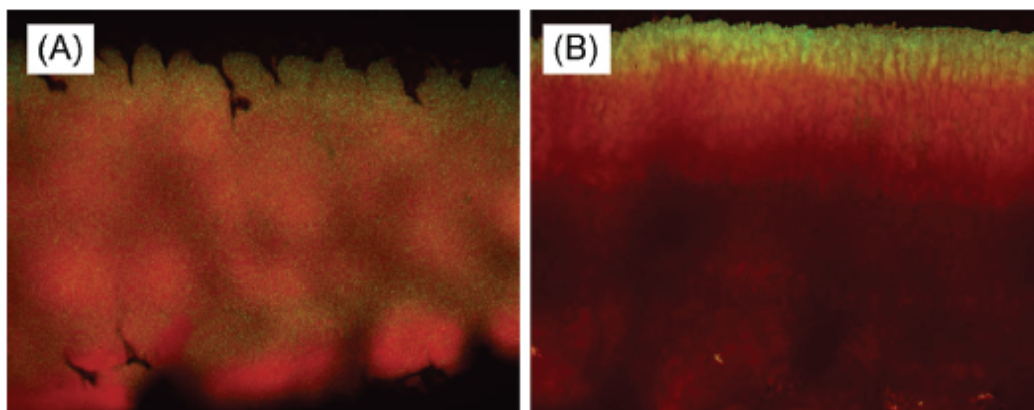


Рис. 7. Неоднорідність експресії генів, продемонстрована трансляційним злиттям білків-мішеней з жовтим флуоресцентним білком (YFP). (A) Трансляційне злиття білка IbrA до YFP, показуючи рівномірний розподіл IbrA по всій біоплівці. Клітини протиставляли флуоресцентному білку mCherry (mCFP). (B) Трансляційне злиття білка Rmf до YFP, показуючи, що більшість продукції Rmf відбувається в клітинах у верхній частині біоплівки. Клітини, протиставлені mCFP (Franklin et al., 2015)

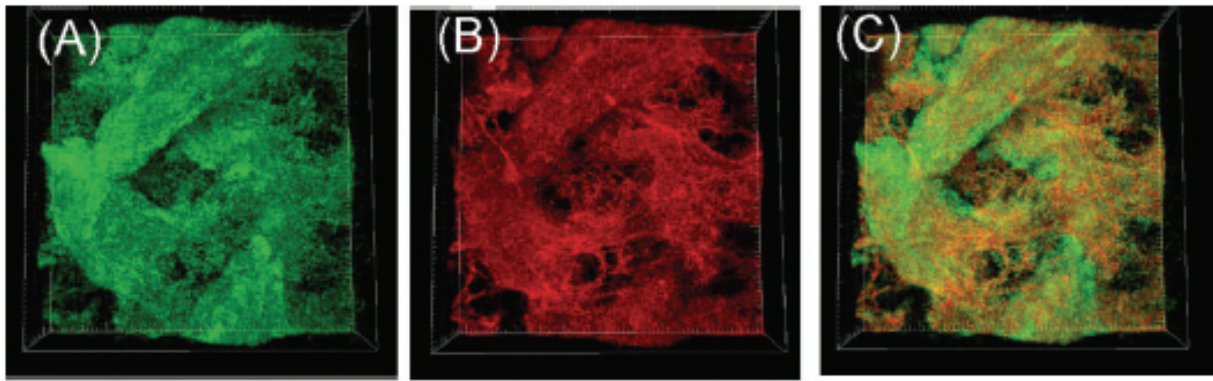


Рис. 8. (А) Зображення біоплівки *P. aeruginosa*, де клітини конститутивно експресують GFP. (В) Позаклітинний матричний матеріал, фарбований Bodipy 630/650-X NHS від Life Technologies. (С) Комбіноване зображення, що показує флуоресцентні бактерії GFP та матрикс, забарвлений Bodipy (Franklin et al., 2015)

Лекція 4

Біобростання

План

1. Поняття біобростання.
2. Історія проблеми біобростання.
3. Водні організми-обростачі.

Використані літературні джерела:

1. <https://en.wikipedia.org/wiki/Biofouling>
2. Биоповреждаемость товаров: учебное пособие / Н.В.Трегубова, Р.Х.Кочкаров, А.В.Моргунова, Н.А.Дрижд, Э.К.Динаев. Ставрополь: Издательско-информационный центр «Фабула», 2019. 100 с.

1. Поняття біобростання

Біобростання або біологічне обростання — це скупчення мікроорганізмів, рослин, водоростей або дрібних тварин там, де це не потрібно, на таких поверхнях, як корпуси кораблів і підводних човнів,

пристрої, такі як водозабірники, труби, решітки, ставки та річки, що спричиняють деградацію основного призначення цього предмета. Таке накопичення називають епібіозом, коли поверхня господаря є іншим організмом і зв'язок не є паразитарним. Оскільки біологічне обростання може виникнути майже у будь-якому місці, де є вода, біообростання створює ризики для широкого спектру об'єктів, таких як корпуси та обладнання човнів, медичні пристрої та мембрани, а також для цілих галузей промисловості, таких як виробництво паперу, харчова промисловість, підводне будівництво, опріснювальні установки, тощо.

Антиобростання — це здатність спеціально розроблених матеріалів (наприклад, токсичних біоцидних фарб або нетоксичних фарб) видаляти або запобігати біологічному обростанню.

Накопичення біологічного обростання на морських суднах становить значну проблему. У деяких випадках може бути пошкоджена конструкція корпусу та силові установки. Накопичення біообростання на корпусах може збільшити як гідродинамічний об'єм судна, так і гідродинамічне тертя, що призводить до збільшення опору до 60 %. Було помічено, що збільшення опору знижує швидкість до 10 %, що може вимагати збільшення палива до 40 % для компенсації. Оскільки паливо зазвичай становить до половини витрат на морський транспорт, методи протиобростання заощаджують судноплавній промисловості значну суму грошей. Крім того, збільшення споживання палива через біологічне обростання сприяє негативному впливу на навколишнє середовище і, за прогнозами, збільшить викиди вуглекислого газу та діоксиду Сульфуру на 38 % і 72 % до 2020 року відповідно.

2. Історія проблеми біообростання.

Біообростання, особливо на кораблях, стало проблемою з тих пір, як люди плавають океанами. Найбільш ранні письмові згадки про обростання були записані Плутархом, який записав таке пояснення його впливу на швидкість судна: «коли водорості, твань і бруд прилипають до його бортів,

хід корабля більш тупий і слабкий; і вода, що налітає на нього, стає більш тупою і слабкою. Ця липка матерія не так легко від неї відокремлюється, і ось чому вони зазвичай колють свої кораблі».

Використання смоли та мідного покриття для захисту від обростання приписувалося стародавнім мореплавцям, таким як фінікійці та карфагеняни (1500-300 рр. до н.е.). З давніх часів використовували віск, дьоготь і асфальт. Арамейський запис, датований 412 р. до н.е. розповідає про дно корабля, покрите сумішшю миш'яку, нафти та сірки. У «Deipnosophistae» Афіней описав зусилля проти обростання, вжиті при будівництві великого корабля Гієрона Сіракузьського (помер у 467 р. до н. е.).

До 18 століття використовувалися різні методи боротьби з обростанням із застосуванням трьох основних речовин: «біла речовина», суміш олії (китового жиру), каніфолі та сірки; «чорна речовина», суміш дьогтю і смоли; і «коричневий матеріал», який був просто сіркою, доданою до чорної речовини. У багатьох із цих випадків мета цих методів обробки неоднозначна. Існують суперечки, чи багато з цих методів обробки були реальними методами протиобростання, чи, коли вони використовувалися разом зі свинцем і дерев'яною обшивкою, вони були призначені просто для боротьби з корабельними черв'яками, що розточують дерево.

У 1708 році Чарльз Перрі прямо запропонував міднення як засіб проти обростання, але перші експерименти були проведені лише в 1761 році з покриттям HMS Alarm, після чого днища і борти кількох корабельних коліс і фальш-кілів були облицьовані мідними пластинами.

Мідь добре захищала корпус від зараження черв'яками і не давала проростати водоростям, оскільки при контакті з водою мідь утворювала отруйну плівку, що складається переважно з оксихлориду, яка відлякувала цих морських мешканців. Крім того, оскільки ця плівка була малорозчинною, вона поступово змивалася, не залишаючи місця для прикріплення морських мешканців до корабля. Цей процес був настільки успішним, що термін «мідне дно» став означати щось дуже надійне або безризикове.

З появою залізних корпусів у 19 столітті мідна оболонка більше не могла використовуватися через її гальванічну корозійну взаємодію із залізом. Були випробувані фарби проти обростання, і в 1860 році перша практична фарба, яка отримала широке застосування, була представлена в Ліверпулі і отримала назву гаряча пластикова фарба «McIness». Ці процедури мали короткий термін служби, були дорогими і відносно неефективними за сучасними мірками.

До середини двадцятого століття фарби на основі оксиду Купруму могли утримувати корабель від сухого доку цілих 18 місяців або лише 12 місяців у тропічних водах. Зменшення терміну служби було обумовлено швидким вилугуванням токсиканту та його хімічним перетворенням в менш токсичні солі, які накопичувалися у вигляді кірки, що пригнічує подальше вимивання активного оксиду Купруму з шару під кіркою.

1960-ті роки принесли прорив з самополірувальними фарбами, які повільно гідролізувалися, повільно виділяючи токсини. Ці фарби використовували токсиканти оловоорганічної хімії («на основі олова»), такі як оксид трибутилолова, і були ефективними протягом чотирьох років. Ці біотоксини пізніше були заборонені Міжнародною морською організацією, коли було встановлено, що вони дуже токсичні для різних організмів. Зокрема, оксид трибутилолова було описано як найбільш токсичний забруднювач, коли-небудь навмисно викинутий до океану.

Як альтернативу оловоорганічним токсинам відновлено інтерес до міді як діючої речовини в абляційних або самополіруючих фарбах з терміном служби до 5 років; а також інші методи, які не забезпечують покриття. Сучасні клеї дозволяють наносити мідні сплави на сталеві корпуси без створення гальванічної корозії. Однак сама мідь не є непроникною для обростання водоростями, зокрема діатомовими. Деякі дослідження показують, що мідь також може мати неприйнятний вплив на навколишнє середовище.

Вивчення біологічного обростання почалося на початку 19 століття з експериментів Дейві, які пов'язували ефективність міді з вмістом у ній розчиненої речовини. У 1930-х роках мікробіолог Клод ЗоБелл показав, що прикріпленню організмів передувала адсорбція органічних сполук, які тепер називаються позаклітинними полімерними речовинами.

Одним із напрямків дослідження є вивчення взаємозв'язку між змочуваністю та ефективністю протиобростання. Інша тенденція – вивчення живих організмів як джерела натхнення для нових функціональних матеріалів. Наприклад, механізми, які використовуються морськими тваринами для запобігання біологічного обростання на шкірі.

Дослідження матеріалів відмінних протиобростаючих поверхонь для реакторів із псевдозрідженим шаром показують, що пластмаси з низькою змочуваністю, такі як полівінілхлорид («ПВХ»), поліетилен високої щільності та поліметилметакрилат («оргскло»), демонструють високу кореляцію між їх стійкістю до бактеріальної адгезії та їх гідрофобністю.

Дослідження біотоксинів, які продукуються організмами, виявили кілька ефективних сполук, деякі з яких є більш потужними, ніж синтетичні сполуки. Буфалін, буфотоксин, був у 100 разів ефективнішим за оксид трибутилолова і більш ніж у 6000 разів ефективнішим проти колоній ракоподібних.

Один із підходів до захисту від забруднення включає покриття поверхонь поліетиленгліколем або PEG. Вирощування ланцюгів PEG на поверхнях є складним завданням. Цю проблему можна вирішити, зрозумівши механізми, за допомогою яких мідії прилипають до твердих поверхонь у морському середовищі. Мідії використовують адгезивні білки, або MAP. Термін служби PEG покриттів також викликає сумніви.

3. Водні організми-обростачі.

Морську воду по праву можна називати живою тому, що вона переповнена живими істотами та їх зародками. 68 із 70 класів тварин живуть у морі. Кожен предмет, що занурився у воду, відразу атакують осідаючі

морські мікроорганізми, зародки водоростей, тварин як місце поселення і перехоплення з товщі води кисню і їжі. Починається обростання цього предмета організмами обростачами. При гарній доступності їжі, тепла і кисню, кірка, створювана тілами, будівлями та виділеннями обростачів, швидко росте. На живий або відмерлий нижній шар організмів-обростачів з товщі вод осідають все нові і нові зародки. Відмерлі та слабкі стають здобиччю рухливих труподів та хижаків. Йде сукцесія - придушення та заміщення одних видів іншими. Розвивається, старіє та змінюється за віком та за сезонами співтовариство організмів – біоценоз обростачів. У зміні його складу беруть участь як самі обростачі, і рухливі прибульці - жителі обросту. Будівництво островів та природних захисних хвилеломів (наприклад, Бар'єрного рифу Австралії), зміцнення берегів, створення міцного каменю – черепашника та будівельного вапняку – не єдина користь від обростачів. Безхребетні тварини обростачі – найпотужніші фільтратори та седиментатори – очищувачі вод. З усіх жителів моря саме вони найбільше освітлюють змучену в шторм або потоками з гір морську воду, переводячи мутьові суспензії в донний мул, який видобувають у багатьох країнах з дна мілководдя і використовують як чудове добриво. Вони ж очищають воду і від викидів, і хвороботворних мікробів. Багато обростачів вилучають з неї і знешкоджують надлишки токсичних і шкідливих органічних і неорганічних речовин, накопичуючи їх у своїх тілах і переводячи у донні відкладення. Водорості-обростачі завершують біологічне самоочищення вод, насичуючи їх киснем.

Кожен предмет, що вноситься у воду, дозволяє організмам-обростачам, що осіли на нього, перехоплювати розчинені і зважені речовини і харчові частинки з води, що протікає повз них. Відходи їх життєдіяльності також легко уносяться. Тому темпи зростання організмів-обростачів нерідко на порядок вищі за темпи зростання тих же видів у донних співтовариствах (бентосі), де водообмін слабший, а води бідніші за їжу і кисню і багатші на шкідливі відходи завдяки життєдіяльності організмів-сусідів.

Запорука існування видів-обростачів - величезна продуктивність їх зародків та личинок. Розселення обростачів йде не тільки завдяки ширянню і плаванню зародків рослин і личинок тварин, але й поселенню дорослих на деревині та інших предметах, що виносяться річками у море, і дрейфують через течії і вітри.

Хто ж такі обростачі? У процесі обростання беруть участь майже всі класи бактерій, водоростей і безхребетних тварин. Це понад 3000 видів. Масовими з них вважають від 40 до 90 видів (крім бактерій (зокрема, ціанобактерій), діатомових водоростей і мікроскопічних грибів). Родів, найбільш поширених, витривалих (еврибіонтних), масових, таких, що створюють основу обросту, які відіграють головну роль обростанні судів, підводних споруд та водоводів, близько 20.

Мікрообростачі - організми, тіла яких не більше 1 мм. Це бактерії, що використовують розчинені органічні речовини, залишки організмів та відходи життєдіяльності – детрит. Для осідання на субстрат деяких тварин-обростачів необхідна первинна слизова плівка бактерій (зокрема, ціанобактерій), мікроводоростей (діатомей, зелених та ін), мікроскопічних грибів та найпростіших тварин.

Вони можуть або екранувати отрути від необростаючих фарб, захищаючи організми-обростачі, або навпаки - вилуговувати отруту з основи фарби або поводити себе індиферентно.

Небагато видів ціанобактерій здатні давати темно-зелений, іноді чорний наліт або нитки. Широко поширені діатомові водорості. Навіть у небагатій видовій флорі Каспію на теплообмінниках виявили 140 видів та різновидів діатомей.

Мікроскопічні гриби нечисленні та мало вивчені. Серед них є види, що мешкають на поверхні обросту. Є й паразити - вороги обростачів, що вражають масу ікри або зовнішні вапняні скелети вусоногих раків - баланусів.

Найпростіші тварини присутні в обрості, але не відіграють значної ролі, бо їхня біомаса невелика.

Макрообростачі - багатоклітинні організми, видимі простим оком.

З зелених водоростей найбільш масові нитчасті - улотрикс, що не гілкується, і кладофора, що гілкується. Численні види енторморфи (морські, соло та оватоводні, прісноводні та еврибіонтні) витримують забруднення органічними і навіть токсичними речовинами. З червоних водоростей найбільш поширені полісифонія, нераміум, каллітамніон та кам'яноподібний літотамній. Бурі водорості різноманітні за розмірами та будовою. Дрібний ектокарпус прикріплює до інших обростачів пучки ниток, що гілкуються. Ламінарія («морська капуста») має «коріння» - ризоїди для прикріплення та «стебло», що переходить у шкірясту зелено-буру платівку - «лист». Всі водорості ростуть тільки на освітлюваних місцях і стримують поселення та розвиток тварин обростачів. Гнучкістю водоростей визначається мала величина збитків, завданих ними судам.

Тварини - макрообростачі завдають найбільшої шкоди, бо багато хто прикріплюється надзвичайно міцно і має твердий скелет. Деякі можуть навіть продавлювати або прорізати до металу пластичні лакофарбові покриття.

Губки утворюють нижче 0,5 м нерівні м'які різнокольорові пористі нарости на малорухливих спорудах, частіше на затінених або темнозabarвлених поверхнях, іноді поверх інших обростачів.

Кишковопорожнинні майже завжди беруть участь в обростанні. Це густі поселення гідроїдів, що помітно знижують швидкість ходу суден. Шматки колоній, що відірвалися, часто викликають засмічення у водозаборах і водоводах. Рідше це корали та одиночні поліпи.

Черви в біоценозі обростання представлені нечисленними видами родини серпулід, які вільно пересуваються та є злісними обростачами, що будують міцні трубки. Широко поширилася на судах мерцисрелла. Вона виживає і в опріснених естуаріях річок, і в Каспії, і сильносолених озерах Тунісу. Трубки-будиночки прикріплені так міцно, що вцілює на лопатях

суднових гребних гвинтів при швидкості до 700 об/хв на відстані 15 см від центру обертання.

Моховатки краще за інших безхребетних витримують нафтове забруднення. Вапняні кіркові моховатки здавна відомі геологам як будівельники рифів. При обростанні віх, буїв і палів вони сильно збільшують поверхню, у яку б'ють хвилі, і тим сприяють розхитуванню і зриву цих навігаційних огорож, необхідних для безпеки мореплавання.

Двостулкові молюски - найвідоміший з давніх-давен масовий клас обростачів, який зазвичай завершує процес обростання. Мідії, мітіластер, дрейсена міцно прикріплюються нитками бісусу.

Устриці цементуються нижньою сплющеною стулкою до металу та каменю настільки міцно, що збивати їх доводиться киркою або відбійним молотком.

Слимаки не тільки живуть у обрості, але прикріплюють до нього кладки яєць. Саме так на судах була завезений у вигляді щіток рожевих коконів наприкінці 40-х років з Японського до Чорного моря хижий равлик рапан.

Ракоподібні займають, як правило, перше місце у морському обростанні. Прибережні вусоногі баланіди зазвичай першими створюють макрообростання і поступаються панування двостулкам мітілідам не раніше осені. Численні балануси сприяють утворенню виразок у обшивці до 4 мм глибини за рік (з 8 мм товщини обшивки середніх суден). Вони не тільки псують фарбування, сприяючи виразковій корозії корпусу, а й викликають втрату 18% швидкості ходу судна. Вусоногі морські качечки (лепадіди) - обростачі з відкритих вод океану. Викликають великі втрати ходу суден та сильні перешкоди у роботі океанологічних приладів. Корофіїди живуть головним чином у солонуватих водах і будують численні шкірясто-мулові будиночки-трубочки, що корою одягають поверхні поблизу урізу води. Інші, бокоплавці та креветки, часто живляться обростом стаціонарних споруд і дещо зменшують його біомасу, але суттєвої ролі у процесі обростання не відіграють.

Краби зазвичай поїдають обростачів. Особливо численний дрібний краб рітропанопеус, що розселюється з моря в море судами.

Голкошкірі – рухливі вороги обростачів: зірки поїдають двостулкових молюсків, їжаки – водоростей. Найчастіше очищають від обростачів моли та інші нерухомі споруди.

Покривники – нижчі хордові тварини. Найбільш поширені колоніальні асцидії ботриллюс. Подібно до мідій і моховаток, ботриллюси, розвиваючись до осені великими плівками, можуть задушити всіх обростачів шару обросту, що підстилає їх знизу. Майже всесвітньо поширені поодинокі асцидії, добре переносять опріснення: молгули, зелена ціона, що досягає довжини 10 см, яйцеподібна з грубою зморшкуватою шкірою стіела.

Чим менше кількість видів обростачів у цьому місці, тим більше зростання окремих особин і вище загальна біомаса обросту. Взаємозв'язки видів дуже складні. Навіть у однорідних умовах для спільноти, що складається лише з чотирьох нерухомих безхребетних і двох хижих рухомих безхребетних, у водозаборі на Азовському морі встановлено понад 30 взаємозалежностей, причому найменші річні або сезонні відхилення сильно впливають на склад і динаміку всього угруповання.

Склад та швидкість розвитку обросту залежать і від матеріалу та форми поверхні виробу, її освітленості та омивності водою. Асбоцемент і кераміка обростають сильніше, ніж дерево та пофарбований метал, скло та оргскло. Горизонтальний і вертикальний розподіл обростачів найчіткіше у Чорному морі біля суден із постійною ватерлінією.

Збитки від обростання величезні. Це втрата 20-42 % швидкості суден, засмічення, перегрів та передчасне зношування системи двигунів, втрата ходу, вібрація, кавітація та корозія гвинта. Обростають навіть сітчасті стінки садків для риби. Оброст корпусів суден і буїв, паль, естакад і веж посилює у кілька разів руйнівний вплив ударів хвиль. Обростання підводних приладів спотворює їх показання та виводить прилади з ладу. Практично всі обростачі сприяють корозії: своєю присутністю створюють диференціальну аерацію,

впливають виділеннями, деякі руйнують протикорозійні захисні покриття. Крім обростання та біокорозії, організми можуть викликати засмічення водоводів, захисних ґрат гідроспоруд тощо. Тут важливі і обростачі, і рухливі жителі обросту, і навіть планкатори (вихід з ладу водозаборів при нагоні вітром медуз).

У проектах водних споруд необхідно передбачати можливість експлуатаційних умов, що сприяють не лише місцевим, а й чужорідним організмам, які постійно заносяться при транспортних та акліматизаційних роботах.

Змістовий модуль 2. Біоплівки та біообростання в природі та практичній діяльності людини

Лекція 5

Корисні та природні біоплівки

План

1. Формування біоплівок у природних умовах. Особливості формування мультивидових біоплівок.
2. Мультивидові біоплівки у біотехнології:
 - 2.1. Біоплівки у біоремедіації та очистці природних середовищ.
 - 2.2. Біоплівки та сільське господарство.
 - 2.3. Біоплівки для захисту від корозії.

Використані літературні джерела:

1. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. 2004. Vol.2. P. 95-108.
2. Yadav M.K. Role of Biofilms in Environment Pollution and Control. *Microbial Biotechnology*. Vol.1. Applications in Agroculture and

Environment. Patra J.K., Vishnuprasad Ch.N., Das G. [eds]. Singapore: Springer Nature, 2017. P. 377-398.

3. Ножевникова А.Н., Бочкова Е.А., Плакунов В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии. *Микробиология*. 2015. Т. 84, № 6. С. 623–644. doi: 10.7868/S0026365615060117

1. Формування біоплівки у природних умовах. Особливості формування мультивидових біоплівок.

Є дані про утворення біоплівки на початку видобутку копалин, особливо у гідротермальних середовищах. Біоплівкові мікроколонії були ідентифіковані за морфологією в південноафриканському утворенні Корнберга (вік 3–3,4 мільярдів років), а ниткоподібні біоплівки були виявлені в глибоководних гідротермальних скелях у Пільбара Кратон, Австралія (вік 3,2 мільярдів років). Подібні структури біоплівки можна знайти в сучасних гідротермальних середовищах, таких як гарячі джерела та глибоководні отвори. Цікаво, що формування біоплівки є також характеристикою прокариотичних «живих копалин» у найдавніших родоводах філогенетичного дерева як в *Archaea* (*Korarchaeota*), так і в *Bacteria* (*Aquificales*). У сукупності отримані дані вказують на те, що здатність утворювати біоплівки є давньою і цілісною характеристикою прокариотів. В умовах еволюції та адаптації ймовірно, що біоплівки забезпечили гомеостаз на тлі коливальних та суворих умов первісної землі (екстремальні температури, рН та вплив ультрафіолетового (УФ) світла), тим самим сприяючи розвитку складних взаємодій між окремими клітинами і забезпечення середовища, яке було достатнім для розвитку сигнальних шляхів та хемотактичної моторики. Крім полегшення взаємодії клітина-клітина, яка потребує близького розташування, поверхні також можуть концентрувати поживні речовини. Загальноприйнято вважати, що планктонні клітини виникали до розвитку більш складного угруповання біоплівки. Однак ми припускаємо, що каталітичні та захисні умови, пропоновані життям на поверхнях, могли призвести до одночасного

розвитку як сесильних, так і планктонних форм у клітинних угрупованнях біоплівки. Ця концепція біоплівки не тільки розширює наше існуюче розуміння прокаріотичної поведінки, але й наші стратегії контролю проти відомої стійкості біоплівки, що була набута за мільярди років еволюційної адаптації.

Адаптація структури біоплівки для виживання в різних умовах. Вражаючі візуальні характеристики біоплівки, що ростуть у різних середовищах, надзвичайно схожі, що свідчить про існування важливих конвергентних стратегій виживання, які частково надаються структурною спеціалізацією (рис. 9).

Біоплівки, що ростуть у швидкоплинній воді, як правило, утворюють нитчасті страймери незалежно від того, чи виникають вони в дренажному стоку з кислих шахт, у гідротермальних фотосинтетичних матах (водорості чи бактерії) або як перифітон у річках (рис.9). У спокійних водах біоплівки, як правило, утворюють грибні або курганоподібні структури, схожі на структури строматолітів. Загальна закономірність є ізотропною, без чітких ознак напрямку потоку. Структура біоплівки змінюється також із поживними умовами. Здатність прокаріотів приймати різні структури біоплівки у відповідь на умови навколишнього середовища - завдяки або генетичній регуляції, або селекції, або їм обом, або ж локалізованим моделям росту, визначеним масовим переносом - дає їм гнучкість швидко адаптуватися до такої міри, яка неможлива для багатоклітинних еукаріотичних організмів. Спроможність бактерій прилипати до поверхонь і утворювати біоплівки в багатьох середовищах, безсумнівно, пов'язана із селективною перевагою, яку надає поверхнева асоціація.

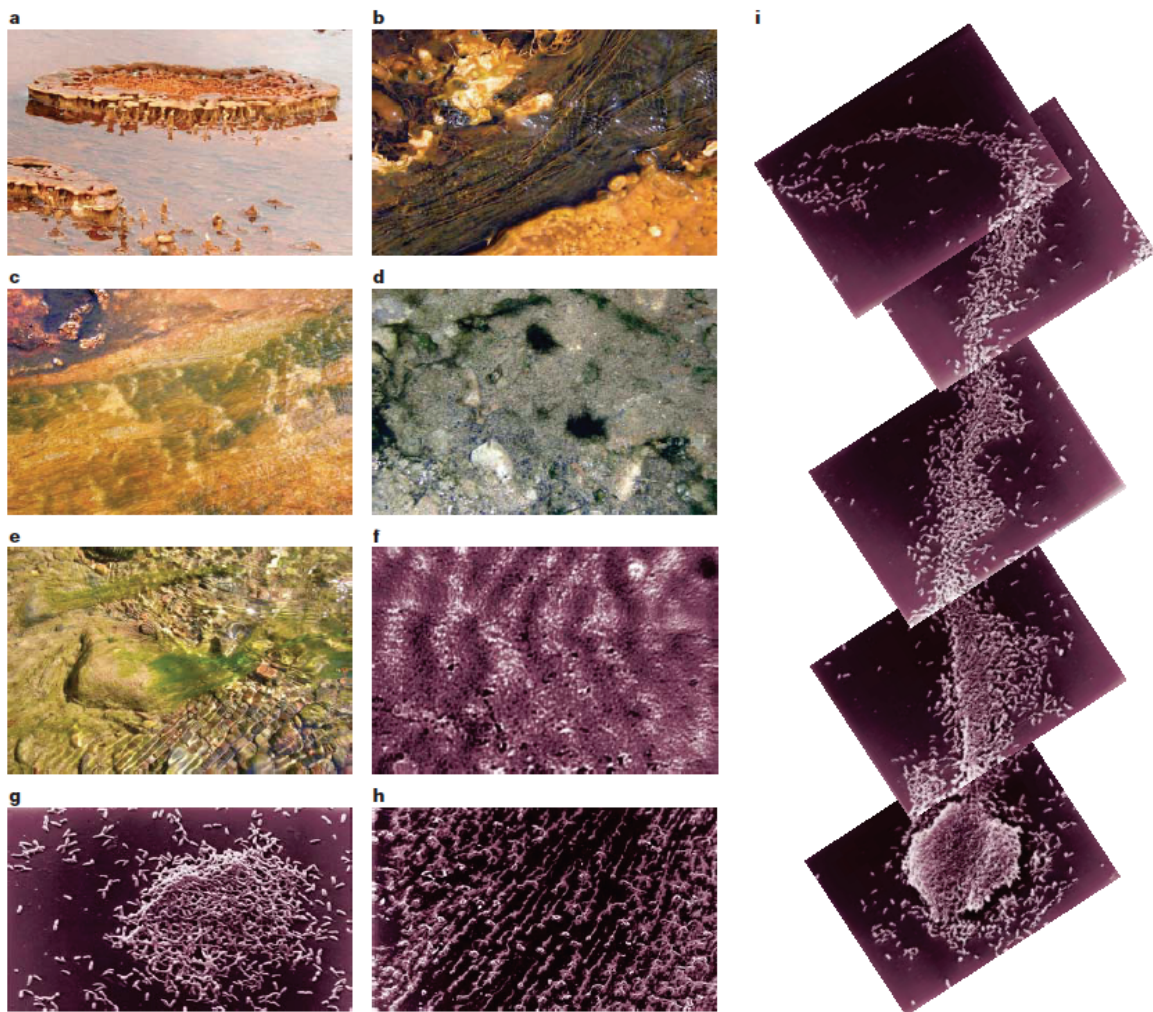


Рис. 9. Структурна схожість біоплівки, що ростуть в гідротермальних джерелах, прісноводних річках та лабораторних проточних камерах. Подібні структури спостерігаються у біоплівках, що ростуть у гідротермальних гарячих джерелах (**a – c**), біоплівках, що ростуть у прісноводних річках (**d, e**) та лабораторних проточних камерах (**f – h**). Біоплівки, що ростуть в умовах спокою або з низьким зсувом, мають тенденцію утворювати кругові структури, такі як «гриби» або кургани (**a, d, g**). Біоплівкові страймери (розтяжки, вузькі стрічки) (**b, e, h, i**) та пульсаційні структури (**c, f**) формуються у швидших потоках з високим зсувом. Біоплівки з термальної зони Бісквітного басейну, Національного парку Йеллоустоун, США (**a-c**), річки Гарденер, Національного парку Йеллоустоун, США (**d**), Гіаліт-Крик, Боземан, штат Монтана, США (**e**), біоплівки змішаних видів, вирощені за швидкості потоку 1 м/с та біоплівка *Pseudomonas aeruginosa* PAN067, вирощена у проточній камері із потоком 0,03 м/с (**g**) або 1 м/с (**h, i**). Панель **c** модифікована (Hall-Stoodley et al., 2004)

Особливості формування мультивидових біоплівок.

Більшість досліджень, присвячених процесу формування біоплівки, проведено на моновидових їх зразках, проте методичні підходи, навіть в разі використання одного і того ж мікроорганізму, можуть істотно різнитися. Більш складна картина, ніж для формування лабораторних біоплівки, характерна для природних мультивидових біоплівки, оскільки в залежності від місця їх локалізації склад, а, отже, і шляхи формування можуть істотно відрізнятися.

У мультивидових біоплівках на перший план виходить взаємодія популяцій, що утворюють біоплівки, яке може перешкоджати (рідше) або сприяти (значно частіше) формуванню цього угруповання. Одним з широко поширених механізмів взаємодії є «коагрегація», тобто посилення адгезії клітин до поверхні розділу фаз. Особливо докладно цей механізм вивчений у разі формування оральних біоплівки. Початкова стадія - адгезія - багато в чому визначає долю мікробної популяції, а саме, чи залишиться вона в планктонному стані або перейде до біоплівкового способу існування. Тому ми докладніше зупинимося на цій проблемі, що має велике екологічне значення. Наприклад, добре відомий факт, що в умовах високої «сили зсуву» (швидкої течії води, перемішування та ін.) перевагу для колонізації цієї екологічної ніші отримують ті мікроорганізми, які здатні прикріплюватися до поверхні розділу. При цьому в процесі формування мультивидових біоплівки визначальну роль відіграють «первинні колонізатори», тобто мікроорганізми, що створюють первинну біоплівку, в яку в подальшому вселяються мікроорганізми-супутники. У модельних дослідах показано, наприклад, що при формуванні «зубного нальоту» в якості первинних колонізаторів виступають бактерії родів *Actinomyces oris*, *Streptococcus gordonii* і *S. oralis*. За ними (за часом) слідують *Porphyromonas gingivalis* і *Veillonella parvula*, а пізніми колонізаторами є *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Цікаво, що пара *S. oralis-V. parvula* дуже сильно стимулює зростання спільних

модельних біоплівки з будь-яким з перерахованих партнерів. Виявлено, що збудник періодонтиту *Fusobacterium nucleatum* містить ген *fap2*, що кодує утворення галактозочутливого гемаглютинину і адгезину, який бере участь в процесах коагрегації і, мабуть, визначає вірулентність фузобактерій.

Відомі й інші приклади визначальної ролі коагрегації у формуванні мультивидових біоплівки. Показано, що бактерії кількох родів (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia*, *Methylobacterium* sp., *Mycobacterium mucogenicum*, *Sphingomonas capsulata*, *Staphylococcus* sp.), ізольовані з питної води, здатні до коагрегації за участю поверхневих клітинних структур, що включають білки і полісахариди. При цьому *A. calcoaceticus* відіграє ключову роль, виконуючи функції зв'язки або шунта («bridging organism»). Передбачається, що цей мікроорганізм містить комплементарні рецептори, які впізнаються специфічними адгезинами інших мікроорганізмів. Виявлено формування в душових головках коагредованих мультивидових біоплівки, що створюють неприємний запах і включають бактерій родів *Brevundimonas*, *Micrococcus* і *Lysobacter*. Ці біоплівки можуть служити резервуаром для умовно-патогенних мікроорганізмів. Мультивидові біоплівки виявлені в зливні кухонної раковини, звідки ізольовано та ідентифіковано 13 видів бактерій, в тому числі *Brevibacterium casei*, *P. nitroreducens*, *M. lacticum*, *Klebsiella pneumonia*. Всі вони проявили здатність до коагрегації.

У мультивидових біоплівках, в яких партнери знаходяться в протокооперативних взаємовідносинах, продукти, що утворюються одним з них, можуть служити сигнальними молекулами або індукторами для інших. Це забезпечує більш ефективне біоплівкоутворення, використання поживних речовин і виживання в стресових умовах. Приклади подібних взаємодій будуть розглянуті далі.

Мультивидові біоплівки в екологічних системах

Незважаючи на те, що, за сучасними уявленнями, біоплівки з'явилися на Землі 3,5 млрд років тому, а в даний час 95-99 % мікробних популяцій в природі існують у вигляді біоплівки (переважно мультивидових), проблемам

еволюції та взаємодії мікроорганізмів в таких спільнотах приділяється недостатньо уваги. Справа, як правило, обмежується застосуванням методів (мета)геноміки, які, хоча і дозволяють встановити склад угруповання, але практично не допомагають зробити скільки-небудь певні висновки про взаємовідносини мікроорганізмів, а отже, і про їх екологічну роль. У даній лекції ми зупинимося на нечисленних дослідженнях, що дозволяють судити про механізми складних взаємодій між мікробними компонентами природних мультивидових біоплівки. Частина лекції присвячена міжпопуляційним взаємовідносинам в природних і штучних мультивидових асоціаціях, що мають біотехнологічне значення (див. далі).

Оскільки формування біоплівки, в першу чергу, забезпечує захист угруповання від несприятливих умов зовнішнього середовища, ці угруповання легко виявляються в екстремальних екотопах: в гарячих джерелах, глибоководних вулканах, а також в індустриальних спорудах і, нарешті, в клінічних умовах, тобто там, де мікробні клітини потребують захисту від екстремальних факторів і біоцидів. Дослідження показують, що захисний ефект біоплівки для мікроорганізмів, що входять до них, різко зростає в мультивидових варіантах. Однак це не єдина перевага мультивидових біоплівки. Одним із прикладів є найбільш вивчені в цьому відношенні угруповання мікроорганізмів - мікробні мати, які в даний час також відносять до макроскопічних біоплівкових формувань, де первинними структуроутворювальними мікроорганізмами служать ціанобактерії.

Відзначимо, що в завдання даної лекції не входить детальний розгляд фототрофних спільнот, тому зупинимося лише на деяких типових випадках.

Мікробні мати, як правило, являють собою стратифіковані в вертикальному напрямку бентосні угруповання, укладені в полімерний органічний матрикс, що містить різні кількості неорганічних речовин: силікатів і карбонатів. Основним їх фотосинтезуючим компонентом є кисисгенні фототрофні ціанобактерії, іноді супроводжувані фототрофними еукаріотами (діатомовими водоростями). Їх можна розглядати як аналоги

строматолітів, викопних решток, датованих віком 3,5 млрд років, тобто є одними з найдавніших біологічних екосистем на Землі.

Відомі три основних типи мікробних фототрофних матів: літоральні мікробні мати, мікробні мати гіперсолоних екосистем і, нарешті, мікробні мати гарячих джерел. Незважаючи на безліч досліджень, присвячених структурі, складу і взаємовідносинам мікроорганізмів, що входять до їх складу, чудова стабільність цих найдавніших екосистем багато в чому залишається загадкою.

Літоральні мікробні мати через припливно-відпливні явища відчувають сильні коливання солоності, проте, склад їх зберігає стабільність. На відміну від двох інших типів мікробних матів, вони включають значну кількість еукаріотичних водоростей, які виступають в якості одних з головних, якщо не основних, первинних продуцентів органічних речовин. Найбільш багато в цих матах представлені філумами *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes* і *Acidobacteria*. Число бета-протеобактерій збільшується з глибиною. Найбільш цікаві метаболічні взаємовідносини (вивчені методами транскриптоміки) в цих угрупованнях спостерігаються між представниками *Cyanobacteria* і *Chloroflexi*.

Ціанобактерії, головним чином представники *Microcoleus*, накопичують продукти фотосинтезу, що зберігаються у вигляді глікогену, який метаболізується ними в органічні кислоти, етанол, CO₂ і H₂, а некультивовані представники *Chloroflexi* утилізують ці продукти, накопичуючи в якості запасної речовини поліоксибутират.

За сучасними даними, угруповання мікробних матів гіперсолоних екосистем виявилися набагато різноманітнішими, ніж вважали раніше. Домінуючими фототрофними організмами в них є ціанобактерії роду *Microcoleus*.

Крім цього роду присутні інші ціанобактерії, а також представники родів *Chloroflexus*, *Halochromatium*, *Bacteroidetes*, *Beggiatoa* і ряд ще не ідентифікованих прокариотів. Зміна дня і ночі призводить до помітних змін

окисно-відновного потенціалу всередині мату і викликає просторові зміни в структурі угруповання. Ціанобактерії і в цих матах є доміантними продуцентами органічної речовини і утворюють основну частину позаклітинного матриксу, що оберігає, зокрема, мікробіоту від висихання. Сульфатвідновлювальні, сіркоокиснювальні і аноксигенні фототрофні бактерії стратифіковані в вертикальному напрямку відповідно до мікроградієнтами кисню і сульфідів, а також в залежності від інтенсивності освітлення (як і в інших типах мікробних матів). Хоча співвідношення бактеріальних, архейних і еукаріотичних генів рРНК в одному з прикладів склало (%) 90 : 9 : 1, археї вносять істотний внесок в загальну метаболічну активність. Цікаво, що різноманітність архей проявлялася в найбільшій мірі у верхній частині мату (2-3 см від вершини), де переважають евриархеоти, і різко зменшувалася у міру поглиблення в товщу мату, де переважають кренархеоти. Розподіл багатьох архей не збігався з основними хімічними градієнтами, що свідчить про їх фізіологічне різноманіття.

Дослідження мікробних матів гарячих джерел почалося в 50-і роки ХХ століття в зв'язку з увагою до термофільних бактерій. Значною мірою ці дослідження стимулювалися можливістю практичного використання термостабільних мікробних ферментів. Інтерес до таких ферментів зберігся досі.

Склад мікробіоти мікробних матів гарячих джерел багато в чому визначається їх температурою. Загальну закономірність можна сформулювати наступним чином: різноманітність угруповання знижується при підвищенні температури і, навпаки, підвищується при зниженні температури. Подібна чітка закономірність простежується, наприклад, для представників філума *Chloroflexi*. Встановлено, що в багатьох аноксигенних мікробних матах гарячих джерел домінують представники *Chloroflexi* або представники інших аноксигенних фототрофних бактерій (наприклад, роду *Chlorobium*), тоді як в оксигенних матах переважають термофільні

ціанобактерії, причому між цими групами фототрофів спостерігається конкуренція за лімітуючі субстрати.

В іншому типі мікробних матів гарячих джерел (лужних, сульфідогенних) ідентифіковано три фізіологічні групи бактерій.

Перш за все, це аеробні, хемолітотрофні, сульфідокиснювальні бактерії (*Sulfurihydrogenibium*), локалізовані на поверхні мату, де вони використовують атмосферний кисень, захищаючи, таким чином, аноксигенних фототрофів (роду *Chloroflexus*), а також сульфатвідновлювальні бактерії (групи *Thermodesulfobacterium/Thermodesulfatator*). Ці анаеробні бактерії використовують як донор електронів молекулярний водень, що утворюється при утилізації органічних речовин. Методами метатранскриптоміки показано, що в нічний період хлорофлексії утилізують глікоген (синтезується ціанобактеріями) і утворюють компоненти фотосинтетичного апарату, а також поліоксиалканоат і воскоподібні ефіри, які вдень використовуються як джерела Карбону.

Розглядаючи мікробні мати в цілому як специфічні біоплівкові екологічні системи, можна зробити наступні висновки. По-перше, в цих системах домінують бактерії, тоді як археї і еукаріоти складають лише невелику частину угруповання. Так, вміст архей (головним чином, метаногенів і галоархей) в угрупованні мікробних матів лежить в межах 1-20 %. У зв'язку з переважанням в багатьох мікробних матах бактерій циклу сульфур, метаногени можуть займати тільки ті ніші, які забезпечені субстратами (наприклад, метиламіном) недоступними для сульфатвідновлювальних бактерій. По-друге, літоральні і слабо галофільні мікробні мати являють собою угруповання з найбільшим мікробним різноманіттям, досяжним в земних умовах. Навпаки, мікробні мати гіперсолоних систем, а також гарячих джерел можна розглядати як екосистеми з найменшою різноманітністю, достатньою для підтримки їх стійкості.

В даний час робляться спроби розробити прийоми реконструкції штучних мультивидових мікробних систем (подібних матам), на моделі яких було б зручно вивчати вплив зовнішніх факторів на склад угруповання і функціонування шляхів метаболізму з метою передбачення наслідків екстремальних (в тому числі антропогенних) впливів на екосистеми, а також для вивчення можливості управління життєдіяльністю складних угруповань.

Іншим типовим прикладом екосистем, організованих за схемою мультивидових біоплівок, служать угруповання метанотрофних бактерій. Відомо, що існують метанмонооксигенази (ММО) двох типів: купрумвмісні зв'язані з мембранами, «корпускулярні» (pММО) і ферумвмісні цитоплазматичні, «розчинні» (sММО). Відповідно до цих і ряду інших ознак метанотрофи також поділяються на два типи: тип I включає представників родів *Methylobacter*, *Methylocaldium*, *Methylococcus*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas* і *Methylosphaera*, тоді як тип II представлений родами *Methylocystis* і *Methylosinus*. Метанотрофи обох типів містять pММО, але ряд представників типу II (а також *Methylococcus*, що відноситься до типу I) можуть одночасно містити sММО. Природні мультивидові біоплівки характеризуються різним співвідношенням метаногенів I і II типів, при цьому їх сумарна метаболічна активність також змінюється. На відміну від pММО, sММО володіє широкою субстратною специфічністю (може включати кисень не тільки в молекулу метану, але і в молекули інших алканів, алкенів, аліциклічних і ароматичних вуглеводнів), тому ріст метанотрофів, що містять її, стимулюється цими речовинами. У той же час, метанотрофи I типу мають більш високу швидкість росту і ефективніше утилізують в екосистемах (метанових біофільтрах) саме метан.

Крім згаданих ціано-бактеріальних матів археї широко поширені в природі у вигляді мультивидових біоплівок (найчастіше в співтоваристві з іншими бактеріями), що беруть участь в біогеохімічних процесах в антарктичних морях, високогірних джерелах, породжуваних альпійськими льодовиками, в кислих шахт-

них водах, в лужних озерах, в глибоководних гідротермальних джерелах. Археї також є компонентами угруповань, що здійснюють анаеробне окиснення метану.

Особливу проблему, поки ще дуже мало розроблену, становить дія летких сполук, що утворюються бактеріями, на формування біоплівки і міжпопуляційні контакти, а також на взаємодію бактерій з рослинами і найпростішими.

2. Мультивидові біоплівки у біотехнології

Мультивидові мікробні біоплівки знаходять широке застосування в різних галузях біотехнології. Пояснюється це вже згаданою стійкістю до зовнішніх впливів, а також стабільністю в умовах проточного культивування (особливо важливою для повільно зростаючих видів). У зв'язку з їх індіферентністю не потрібні додаткові тимчасові і матеріальні витрати на підтримку чистоти культури і боротьбу з контамінацією.

Найбільш важливі сфери практичного застосування біоплівок - очищення стічних і ґрунтових вод, а також ґрунтів від забруднюючих речовин. Різноманітність метаболічних процесів і здатність до утилізації ксенобіотиків в якості харчових речовин (без внесення додаткових субстратів) зробило їх перспективними об'єктами для використання в біоремедіації і біологічному очищенні природних середовищ.

2.1. Біоплівки у біоремедіації та очистці природних середовищ

Біоремедіація - це деградація токсичного забруднювача з ґрунту, води та повітря за допомогою мікроорганізмів. У біоремедіації використовуються екологічно чисті мікроорганізми, які можуть руйнувати забруднювачі навколишнього середовища. У природі різні мікроби, такі як бактерії та мікроскопічні гриби, природно володіють здатністю до деградації забруднювача, в якому він існує; ці властивості мікробів можна використовувати для біоремедіації. Крім того, цими мікробами можна легко генетично маніпулювати для деградації конкретних забруднюючих речовин. У біоремедіації багатовидові угруповання бактерій можуть рости за різними метаболічними шляхами, використовуючи різні ферменти та виробляючи

різні метаболіти. Кінцевий продукт одного виду може діяти як субстрат інших впливів при деградації складного забруднювача. Таким чином, мультивидова комбінація могла б завершити деградацію складних забруднюючих речовин (рис. 10). Крім того, повідомлялося, що в місці високої токсичної концентрації забруднюючих речовин бактерії існують у адгезійному стані, званому біоплівками.

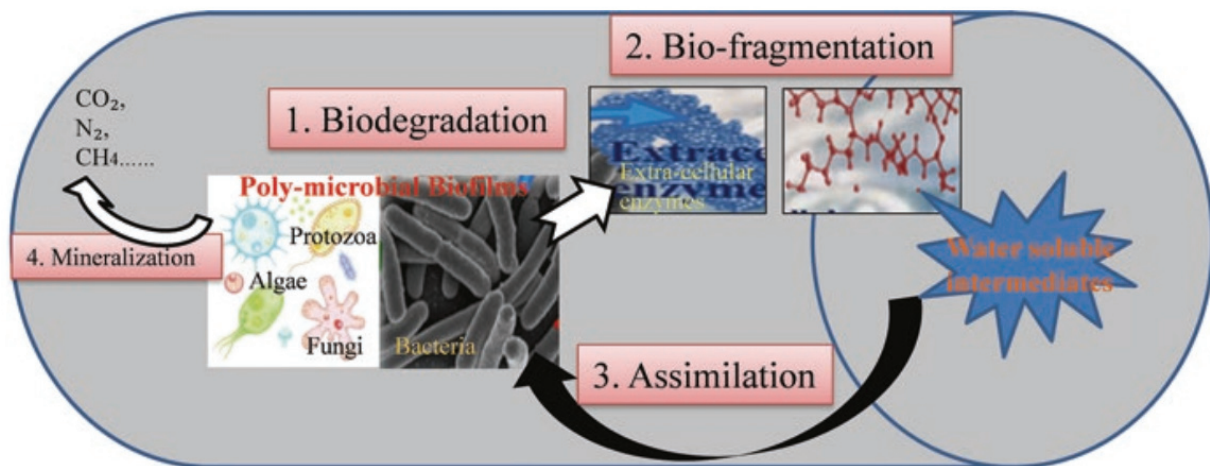


Рис. 10. Схематичне представлення біодеградації багатовидовими біоплівками (Yadav et al., 2017)

Переваги біоплівки в біоремедіації

Мікробіологічна біоплівка має різні переваги порівняно з планктонними бактеріями, такі як обмін генетичним матеріалом, захист від суворих умов навколишнього середовища, стійкість у різних обмінних станах, зв'язок один з одним та з навколишнім середовищем, доступність поживних речовин. Більше того, біоплівки, що утворюються з багатьох видів, складаються з мікроорганізмів, що походять з одного або декількох царств, таких як бактерії, археї, мікроскопічні гриби та водорості з різним метаболізмом та потребами, такими як акцептори/донори електронів. В результаті багатовидові біоплівки мають кооперативність серед мікробів для виживання під час суворих умов навколишнього середовища. У біоплівках, сформованих бактеріями, вбудованими в EPS (виділяються мікробами), під час їх дозрівання утворюється водний канал, який допомагає транспортувати

поживні речовини та кисень або інші відновлені сполуки. У багатовидовій біоплівці, що зустрічається на припливних площинах, корозійних трубах і руслах, а також на місцях інфекцій повідомлялося про кооперативність між різними мікробами. Хоча загальними складовими мікробних біоплівок у багатовидових або полімікробних біоплівках є білок, полісахариди, e-ДНК та ліпіди, однак деякі специфічні компоненти EPS допомагають у сольобілізації гідрофобних або стійких сполук, які були недоступні мікробам.

У біоремедіації та біотрансформації мікробні біоплівки мають переваги перед планктонними мікробами. Планктонні мікроби можуть бути пригнічені відповідними хімічними речовинами через більш високу концентрацію в забруднених місцях. Однак біоплівки толерантні до таких токсичних та небезпечних хімічних речовин. Сесильні біоплівки або плаваючі біоплівки мають здатність переносити зміни в умовах навколишнього середовища, таких як вплив високих доз забруднюючих речовин, антибіотиків, поживних речовин, рН, температури, концентрації солі та вмісту води. Висловлюється думка, що в сильно забруднених місцях та за наявності суб-мікроінгібуючих концентрацій антибіотиків бактерії переважно ростуть у режимі біоплівки. А для знищення бактерій біоплівки потрібні майже 100-1000 разів більш високі концентрації антибіотиків. Крім того, бактерії, що знаходяться в біоплівках, в стресових умовах вивільняють мембранні везикули (MVs). Повідомляється, що *E. coli* MVs могли нейтралізувати агенти навколишнього середовища та захищати клітини від лізису, тоді як *Pseudomonas putida* секретує MVs у відповідь на вуглеводні, змінює клітинну поверхню та гідрофобність.

Біоплівка, опосередкована біоремедіацією стійких органічних забруднювачів

Органічні сполуки, що виробляються промисловістю, включаючи поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ, РАНs), поліхлоровані біфеніли (ПХБ, РСВs), поліхлоровані дібензо-пара-діоксини та дифурани (ПХДД/ДФ, PCDD/Fs) та поліхлоровані етени (ПХЕ, РСЕs), є стійкими органічними

забруднювачами (persistent organic pollutants, POP), знайденими у воді, осадах та повітря. Поряд із цим добрива, гербіциди та пестициди, що використовуються для ведення сільського господарства, та ксенобіотичні сполуки є важливими забруднювачами, які містяться в осадах та воді. Висловлюється думка, що ці POP можна метаболізувати та мінералізувати, використовуючи бактерії навколишнього середовища.

Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) поглинаються в ґрунті і нерозчинні, що перешкоджає процесу біоремедіації. І можуть потрапляти в харчовий ланцюг і в жирові тканини, викликати мутацію та рак. Для успішної біоремедіації ПАВ використовуються біоплівки, що підвищують розчинність і перетворюють стійку сполуку у таку, що піддається біотрансформації. Ще одна перешкода в біоремедіації ПАВ - це суміш ПАВ. У навколишньому середовищі виявлено понад 100 різних типів ПАВ. Однак для біоремедіації можна використовувати багатовидові або змішані біоплівки. При цьому кожен вид з різним метаболізмом сприяє сольобілізації та трансформації ПАВ. Для біоремедіації хлорованих етенів використовували бактерії *Dehalococcooides*. Для відновного дехлорування хлорованого PBC використовували дехлоруючу *Chloroflexi*. Біоплівку застосовують для деградації пента-хлоробіфенілів. Багатовидові біоплівки *Burkholderia* sp. NK8 разом з *P. aeruginosa* PA01 використовували для деградації хлорованих бензоатів. Діоксини, присутні в ґрунті, були деградовані за допомогою біоплівки *Comamonas* sp. штам KD7.

Біоплівка та нафтовуглеводнева біоремедіація

Викид нафтохімічної речовини в ґрунт викликає забруднення ґрунту. Відновлення ґрунту методами цивільного будівництва є дорогим і не може роздрібно відновити ґрунт. Тому біоремедіація з використанням мікроорганізмів, що руйнують вуглеводні, поряд із фіто- та ризо-ремедіацією, може бути використана. До складу бактерій, що розкладають вуглеводні, входять *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Acintobactor*, *Mycobacterium*, *Gordonia*, *Dietzia*, *Burkholderia* та *Aeromicrobium*. Ці бактерії

мають гени, що кодують ферменти, необхідні для розкладання нафтових вуглеводнів. Наприклад, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhodococcus* мають алканові гідроксилази (наприклад, пов'язані з *alkB*), *Methylococcus*, *Methylocella*, або *Methylobacter* мають монооксигенази, *Acinetobacter*, *Caulobacter* та *Mycobacterium* мають бактеріальні P450 оксигенази, які можуть метаболізувати вуглеводні та перетворювати їх у менш токсичні або нетоксичні сполуки. Біоремедіація з використанням біоплівки бактерій може бути застосована для деградації вуглеводнів неводної фази. Біоплівки можуть покращити доступ мікробів до поверхні вуглеводнів, захистити мікроби від стресу, підвищити швидкість передачі генів та покращити загальне здоров'я мікробного угруповання. Нещодавно Balseiro-Romero та ін. (2017) виділили різні бактерії із місця забрудненого вуглеводнями нафти та повідомили про потенціал руйнування вуглеводнів.

Мультивидові біоплівки для видалення важких металів

Ще одна багатообіцяюча область застосування мультивидових біоплівок - біодетоксикація важких і радіоактивних металів. Певні успіхи в цій сфері вже досягнуті. Спектр мікроорганізмів, здатних до дисиміляційного відновлення металів, досить широкий: це різні представники філумів *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*. Наприклад, мультивидові біоплівки використано для створення спеціального біобар'єру, який ефективно (майже на 90%) очищує воду, що містить велику кількість іонів металів, головним чином, купруму. Такий біобар'єр складається з полімерної основи і зростаючих на ній біоплівок, що включають мікробів більше 50 видів, зокрема, стійких до підвищених концентрацій важких металів *Pseudomonas* sp. і *Sphingomonas* sp. Є повідомлення про видалення за допомогою мікробних біоплівок такого шкідливого для здоров'я людини і тварин елемента, як шестивалентний хром. У мікробному світі невідомі види, здатні рости безпосередньо на Cr(VI), однак існує ряд анаеробних мікроорганізмів, здатних відновлювати хром до засвоюваної форми. У біоплівках, виявлених поблизу сталеплавильного підприємства в Китаї, на

грунтах, забруднених відходами виробництва, здатність засвоювати хром пов'язують з діяльністю бактерії *Pannonibacter phragmitetus*. Великим потенціалом, згідно з даними щодо лабораторних біореакторів, володіють не тільки бактеріальні, але і змішані, бактеріально-грибні біоплівки. Можлива участь мікробних біоплівок в детоксикації радіоактивних металів, таких як уран, нептуній, плутоній, давно привертає увагу дослідників. На жаль, поки немає даних про впровадження біоплівок в практику біоремедіації забруднених цими металами ґрунтів і вод, тому проблема залишається маловивченою. Особливе значення має виявлення можливостей мікробних біоплівок в біоремедіації урану, оскільки саме цей актиноїд присутній в біосфері в найбільш значних концентраціях. Стратегія, в основному, пов'язана з відновленням U(VI) до U(IV), який менш розчинний у воді і, відповідно, менш небезпечний. Передбачається, що мікроорганізми відновлюють U(VI) до U(IV), який потім утримується в матриці біоплівок. Незрозуміло, чи має процес мікробного відновлення урану достатній потенціал для повного видалення таких концентрацій урану, які зустрічаються в реальних забруднених системах. Також нез'ясованим залишається взаємодія між відновленим ураном та іншими речовинами, які можуть бути присутніми в системі, зокрема, оксидами Fe(III).

Біоплівки в системах очищення стічних вод. Мабуть, з усіх областей біотехнології біоплівки знаходять найбільш широке застосування в біологічному очищенні стічних вод. Детально розроблено різні технологічні схеми, які успішно використовуються в повномасштабних спорудах по очищенню стічних вод різного походження і складу.

Переваги біоплівок перед вільноплаваючими клітинами в реакторах з очищення стічних вод можна пояснити кількома причинами. По-перше, в разі біоплівки істотно знижується ризик вимивання цінної мікробної біомаси з реактора разом з очищеною водою, що особливо важливо для повільно зростаючих мікроорганізмів, наприклад, анаммокс-бактерій.

Той факт, що в біоплівках співіснують мікроорганізми з різним метаболізмом і харчовими потребами, займаючи кожен свою мікронішу, є перспективним для створення систем очищення стічних вод, які могли б одночасно видаляти з води кілька забруднювачів, наприклад, нітроген- і фосфор-вмісних речовин, за рахунок співіснування в одному біореакторі нітрифікувальних і фосфатакумулювальних протеобактерій.

Існує кілька типів біореакторів, в яких біомаса повністю або частково імобілізована на носіях і являє собою біоплівки. Біореактори в деяких випадках мають циклічний режим роботи, тобто цикли подачі середовища і включення аерації можуть чергуватися. У кожному з таких циклів активними можуть бути різні групи мікроорганізмів, в залежності від їх фізіологічних потреб.

Таким чином, створюється можливість для співіснування різних груп мікроорганізмів не тільки в одному біореакторі, а й в одній біоплівці. Носії в біореакторах можуть бути з різних за складом матеріалів, але основні вимоги до них - інертність (іони і небезпечні компоненти не повинні переходити в середовище), а також принципова можливість утворення на них біоплівки (наприклад, наявність порової структури). В даний час спектр матеріалів, з яких виготовляють носії для таких біореакторів, досить широкий: диски, пластини, насадки з полімерних матеріалів, неткане полотно, частинки цеоліту, залізо-нікелева окалина, поліуретанові губчасті кубики. Залежно від локалізації всередині біореактора, форми, розміру носіїв та умов роботи реактора біоплівки можуть бути об'ємними, типу гранул, або тонкими, плоскими. Деякі типи реакторів (наприклад, OLAND і SBR) не оснащені спеціальними носіями і передбачають перемішування середовища в процесі культивування, проте навіть за таких умов спостерігається формування агрегатів: гранул діаметром 1-2 мм і флокул діаметром 0,5 мм, які також є біоплівками.

Стічні води, багаті нітрогенвмісними речовинами (солями амонію) і бідні органікою, такі як фільтраційні води твердих побутових відходів (ТПВ)

або стоки свинарських ферм, особливо ефективно можуть очищуватися мікроорганізмами мультивидових біоплівок, до складу яких входять анаеробно аммонійокиснювальні (анаммокс) бактерії (АОБ). Це порівняно нещодавно відкрита група хемолітоавтотрофних мікроорганізмів, які здійснюють анаеробне окиснення амонію нітритом з утворенням газоподібного азоту, що зробило їх перспективним об'єктом для біотехнологів. Жоден вид АОБ не виділено в чисту культуру, всі вони існують у складі угруповань. У біореакторах для очищення стічних вод складаються спеціалізовані угруповання мікроорганізмів, пов'язаних протокооперативними або, навпаки, антагоністичними взаємовідносинами і беруть участь у видаленні тих чи інших забруднюючих речовин. Спільноти в біореакторах, які беруть участь у видаленні нітрогенвмісних забруднювачів, можуть включати, крім АОБ, інші мікроорганізми циклу Нітрогену - нітрифікувальні і денітрифікувальні. Їх можуть супроводжувати представники інших фізіологічних груп мікроорганізмів, що виконують в такому угрупованні важливі (але не завжди відомі) функції. Самі АОБ мають сильну тенденцію до формування біоплівок. У природних середовищах існування вони існують у шарі придонних осадів. В антропогенних місцях проживання - також у вигляді придонного шару або різних обростань.

Однак тенденція до біоплівкоутворення властива не всім АОБ в однаковій мірі. Наприклад, у багатьох морських місцях існування представники роду *Candidatus «Scalindua»* часто (а іноді - навіть виключно) є планктонними формами. Наприклад, в зразках, взятих з товщі води Чорного моря на різній глибині АОБ роду *Candidatus «Scalindua»* знайдено тільки в складі фракцій частинок з діаметром менше 30 мкм. У цьому місці існування АОБ пристосовані до існування в оліготрофних умовах, що, ймовірно, обумовлює їх вільноплаваючу, не прикріплену форму існування. У біореакторах це можуть бути, в тому числі, і обростання спеціально введених всередину реактора носіїв (на зразок йоржів). Якщо в реакторі немає носіїв, то АОБ існують у вигляді флокул, завислих в товщі води/середовища.

Живі активні клітини АОБ всередині такої біоплівки зазвичай чітко локалізовані, як в ціанобактеріальному маті, і оточені товстим шаром матриксу, до складу якого входять білки, а також полісахариди, що представляють собою полімери α - і β -D-глюкопіранози.

Стратифікація залежить від метаболічних особливостей кожної групи мікроорганізмів, і, перш за все, від їх ставлення до кисню. Дуже часто можна спостерігати співіснування АОБ з нітрифікувальними бактеріями першого етапу, як у прикріплених біоплівках, так і у флокулах. Оскільки в біореакторах цього типу відбувається послідовна зміна аеробних і анаеробних циклів роботи, то необхідністю стає створення умов для захисту чутливих до кисню АОБ під час аеробного циклу. Будучи аеробами, нітрифікувальні бактерії мешкають на поверхні біоплівки, а клітини АОБ локалізовані всередині гранули, куди дифузія кисню істотно ускладнена. За таких умов, при формуванні біоплівки *de novo* первинними колонізаторами є саме нітрифікувальні бактерії, що формують біоплівки з анаеробними мікронішами, які пізніше заселяються АОБ. Процес може тривати до 5 місяців.

У деяких випадках, в біоплівці є ще один глибокий шар, який знаходиться в самому центрі гранули. Доступ кисню сюди сильно ускладнений, що створює оптимальні умови для існування облигатних анаеробів - метаногенів. До складу угруповання також входять гетеротрофні бактерії, найчастіше *Betaproteobacteria*.

Неодноразово наголошувалося на присутності серед мікроорганізмів гранул анаеробного окиснення анаммокс-реакторів представників філума *Chloroflexi*. Це мікроорганізми нитчастої морфології, з діаметром клітин близько 0,5-1 мкм. Їх нитки можуть досягати в довжину декількох десятків мікрометрів. Що стосується ролі цих мікроорганізмів, яку вони відіграють в угрупованні, є кілька точок зору. Вони можуть грати роль каркаса для створення об'ємної структури - мережі гранул. На користь цього говорить

той факт, що нитчасті клітини часто виявляють при аналізі *in situ* або на ультратонких зрізах гранул, навколо кластерів (мікроколоній) АОБ.

Вони можуть також брати участь в біодеградації макромолекул, що утворюються в ході відмирання мікробної біомаси. Клітини інших представників нитчастих бактерій філума *Bacteroidetes* розподілені по біоплівці рівномірно, що також може вказувати на їх каркасну, структуроутворюючу роль у біоплівці. Оскільки відомо, що деякі *Chloroflexi* здатні метаболізувати сполуки Сульфуру, запропоновано використовувати біоплівки, що містять представників цього філуму (а також інших фототрофів, пов'язаних з циклом сульфуру) для очищення стічних вод від сполук сульфуру, на противагу досить відомій системі біоочищення із застосуванням аеробних сіркобактерій (*Thiobacillus*). Основним недоліком останньої є необхідність додаткових витрат на аерацію, а також розподілу аеробних і анаеробних процесів очищення стічних вод. Вже є обнадійливі результати застосування біоплівок для анаеробної очистки стічних вод, а також газів, від сполук сульфуру, головним чином, H_2S .

Оскільки представники *Chloroflexi* дуже часто співіснують з АОБ, є певні перспективи створення систем, в яких стічні води могли б одночасно очищуватися як від нітроген-, так і від сульфурвмісних забруднюючих речовин.

Для очищення стічних вод знаходять застосування біоплівки фотосинтезуючих мікроорганізмів, ціанобактерій і водоростей, а також їх супутників. Ці біоплівки перспективні для використання в очищенні одночасно від нітроген- і фосфорвмісних забруднюючих речовин. Кисень, що виділяється в процесі оксигенного фотосинтезу у фототрофному маті, може забезпечувати потреби аеробних мікроорганізмів, що беруть участь безпосередньо в видаленні зі стічних вод різних забруднюючих речовин, наприклад, амонійного і нітритного нітрогену в процесі нітрифікації. Багато фототрофів і самі здатні асимілювати нітрогенвмісні речовини зі стічних вод. Не менш важливу роль фототрофні біоплівки виконують у видаленні зі стоків

фосфатів, оскільки багато фототрофних мікроорганізмів акумулюють фосфор всередині клітин в формі гранул поліфосфатів. Крім того, в ході життєдіяльності фототрофних мікроорганізмів відбувається збільшення рН середовища за рахунок споживання вуглекислоти, що сприяє осадженню розчинених фосфатів. Підлужування середовища в результаті діяльності фототрофів може сприяти зниженню чисельності фекальних мікроорганізмів в стічних водах. На жаль, поки ці багатообіцяючі ідеї не знайшли застосування в повномасштабних установках з очищення стічних вод.

Однак фототрофні біоплівки застосовуються у вторинному очищенні стоків з самих станцій очищення стічних вод - в так званих штучних болотах (constructed wetlands). Очищення цього типу стоків у великій мірі залежить від епіфітних фототрофних біоплівок з поверхні очеретяних заростей. Цікаво, що надлишкова бактеріальна біомаса, що отримується при використанні фототрофних біоплівок для очищення стічних вод, може бути використана вдруге, зокрема, в якості добрив для сільського господарства, а також в якості альтернативного джерела білка для різних водних тварин. Наприклад, ціанобактеріальні біоплівки з успіхом застосовуються в якості підгодівлі для риби *Thilapia*, вирощуваної в штучних водоймах. Однак необхідно пам'ятати, що багато ціанобактерій продукують токсичні для тварин речовини і тому їх біоплівки не можуть бути використані в якості такої підгодівлі.

Основне обмеження, пов'язане із застосуванням фототрофних біоплівок для очищення стічних вод - це необхідність наявності великих площ для розміщення таких систем, оскільки фототрофні біоплівки повинні оптимально експонуватися на світлі. Тому для районів з високою щільністю населення і високими цінами на землю такі системи не є найкращим рішенням. Однак на земній кулі чимало регіонів, де вартість землі невисока, а стічні води взагалі не піддаються очищенню.

Ще один важливий параметр - глибина розташування біоплівок, безпосередньо пов'язана з кількістю світла, одержуваного фототрофами. Чим глибше в товщі води розташована біоплівка, тим більш довгохвильові

промені до неї надходять. У різних фототрофних організмів існують різні потреби щодо світла певних довжин хвиль, що важливо враховувати при управлінні складом фототрофних біоплівки, використовуваних для очищення стічних вод.

Фототрофні біоплівки можуть бути ефективні при видаленні із забруднених вод іонів різних важких металів, завдяки, в першу чергу, природі свого позаклітинного полімерного матриксу. Як компонент матриксу в фототрофних біоплівках присутні значні концентрації полісахаридів, що мають негативний заряд. Завдяки цьому, катіони таких металів, як цинк, мідь, свинець і ряд інших, здатні акумулюватися на поверхні позаклітинного полімерного матриксу, утворюючи міцні комплекси. Крім того, деякі метали здатні осаджуватися в даних умовах із забруднених вод за рахунок підвищеного рН.

Методи видалення важких металів за допомогою фототрофних біоплівки привертають увагу технологів своєю дешевизною і ефективністю, однак важливо пам'ятати і про те, що при даному способі очищення метали не зникають безслідно, а лише переходять з очищуваних вод до складу біоплівкового матриксу. Тому створюється необхідність в подальшому видаляти катіони металів з самих біоплівки.

2.2. Біоплівки та сільське господарство

Фототрофні біоплівки знаходять застосування в різних областях, пов'язаних із землекористуванням і сільським господарством. Наприклад, позаклітинний полімерний матрикс біоплівки ціанобактерій і водоростей здатний значно підвищувати властивість утримувати вологу ґрунтами посушливих регіонів і запобігати їх ерозії. Мікробні біоплівки присутні на різних наземних і підземних частинах рослин, в тому числі культурних. Їх роль в житті рослин подвійна: багато патогенних як для рослин, так і для тварин та людини видів мікроорганізмів існують саме у вигляді біоплівки на листі, стеблах, в ризосфері. Механізм формування біоплівки на поверхні коренів до кінця не вивчений, проте відомо, що ці мікробні біоплівки можуть досягати значних розмірів, покриваючи

поверхню від дистальних ділянок коренів до зони елонгації. Відомо, що рослини секретують значну кількість органічних речовин, причому до 44% їх виділяється саме через коріння, забезпечуючи харчові потреби мікроорганізмів ризосфери. Кількість речовин, що секретується, варіює по довжині кореня, також як і значення рН поблизу кореневої поверхні, що створює умови для існування різних видів бактерій в біоплівці.

Біоплівки в ризосфері мають великий потенціал для використання в якості агентів біоконтролю, оскільки мікроорганізми, що входять до складу таких біоплівок, здатні синтезувати антимікробні та антигрибкові речовини, які використовуються для захисту від патогенів.

Розглянемо більш детально значення мікробних біоплівок для сільського господарства.

Зі збільшенням використання пестицидів для контролю фітопатогенів та хімічних добрив у сільському господарстві збільшилось забруднення ґрунту та накопичення токсичних хімічних речовин у ґрунті. Крім того, токсичні хімічні речовини можуть поширювати та забруднювати довкілля, спричиняючи захворювання людини. Альтернативним шляхом для екологічно чистого ведення сільського господарства може бути використання біологічного контролю. Біологічний контроль або біоконтроль - це мікроорганізм, який гальмує ріст патогенів або виробляє агенти, що захищають рослини та сприяють росту рослин.

В останні роки багато дослідників підкреслювали можливість формування біоплівки та переваги біоплівки біоконтролюючого агента. Бактерії можуть колонізувати рослини і утворювати біоплівки на стеблах, листі і ризосфері рослин, а також частинках ґрунту, грибах або органічному компості. Утворення біоплівки на рослинах відбувається наступними кроками (рис. 11). (1) Перший крок передбачає початкове приєднання вільно плаваючих планктонних бактерій. На цій стадії бактерії мають локомоторні органели. (2) Другий етап - це адгезія бактерій до субстрату та втрата локомоторних органел. (3) Тоді відбувається розмноження бактерій. (4) Тоді відбувається просторова організація клітин і

дозрівання біоплівки і продукція екзополісахаридів. (5) Старіння біоплівки або несприятливість умов навколишнього середовища для утримання біоплівки, призводять до регульованого розпорощення/поширення біоплівки.

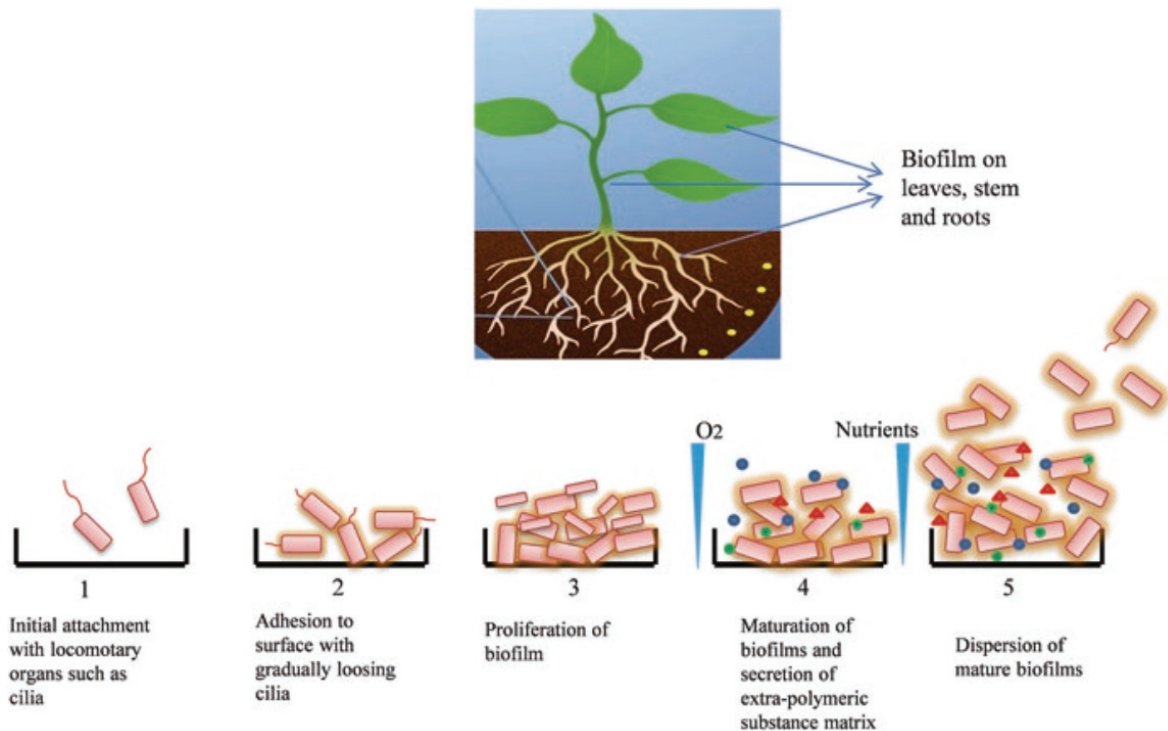


Рис. 11. Схематичне представлення різних стадій утворення біоплівки та її поширення на рослинах (Yadav et al., 2017)

Утворення біоплівки патогеном рослин на рослинах

Наприклад, *Dickeya dadantii* - це грамнегативні бактерії, що викликають хвороби м'якої гнилі у широкого кола видів рослин. Бактерії колонізують і утворюють біоплівки на листках цикорію і викликають захворювання завдяки виробленню деградативних ферментів. Однак зелена макроводорость *Ulvalactuca* стимулює утворення біоплівки морськими грамнегативними бактеріями *Pseudoalteromonas tunicate* (*P. tunicate*). *P. tunicate* - ендofітна бактерія, що виробляє сполуки проти обростання, що пригнічує колонізацію та утворення біоплівки. Так само біоплівки *Pseudomonas chlororaphis* формують біоплівки на ризосфері пшениці та захищають від грибкових захворювань.

Ґрунтові мікроби, включаючи біоконтролюючі бактерії, утворюють біоплівки та захищають різні рослини (рис. 11, табл. 1).

Види бацил відомі біоконтролюючою активністю і продукують баціломіцинові, фенгіцинові та сурфактинові ліпопептиди. Баціломіцини та фенгіцини мають антагоністичну активність щодо грибкових та бактеріальних збудників гарбузів. Деякі автори зауважують, що біоконтролююча активність *Bacillus* обумовлена координованою дією трьох родин ліпопептидів. Крім того, *Bacillus subtilis* виробляє поверхнево-активні речовини, що викликають утворення біоплівки у філоплані дині, що забезпечує тривалу стійкість та адекватну секрецію супресивних ліпопептидів, баціломіцинів та фенгіцинів, які ефективно націлюються на патогени. Дослідники у 2016 р. повідомляли, що сурфактини А і С з тонкими структурними відмінностями мають різну потужність сигналу щодо утворення біоплівки та колонізації коренів і діють спеціально на відповідний продукуючий штам. *Pseudomonas putida* захищає коріння цитрусових від фітопатогенної інфекції, утворюючи біоплівки. Бактерія спочатку колонізується на міцелії *Phytophthora parasitica* і харчується його ексудатом і поступово виробляє біоплівку навколо коріння цитрусових, що гальмує ріст патогенів. Біоплівки біоконтролюючих агентів можуть захистити господаря за допомогою наступного механізму: 1) Біоплівки біоконтролюючих бактерій можуть запобігти толерантності до стресу. 2) Біоплівка біоконтролюючих мікроорганізмів може гальмувати рослинний патоген, виробляючи протимікробні агенти. 3) Біоплівка може спричинити антагонізм і, таким чином, усунути патогена, а також створити конкуренцію за поживні речовини. 4) У багатовидових біоплівках метаболіт та ферменти можуть перешкоджати зростанню патогенів, або хазяїн може отримувати користь від співпраці. 5) Бактерії біоплівки можуть безпосередньо впливати на фізіологію рослин, наприклад, активізувати захист рослин та/або стимулювати ріст рослин.

Біоплівкоутворювальні бактерії на рослинах та механізми
(Yadav et al., 2017)

Біоплівкоутворювальні бактерії	Біоплівки на хазяїні	Ефект біоплівок на хазяїні
1	2	3
<i>Bacillus atrophaeus</i>	Біоплівки на томатах, рослинах цукрових буряків	Біоплівки продукують сурфактин та фенгіцин, які є антимікробними агентами та викликають системну стійкість
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9	Корінці огірка	Бактеріальні біоплівки продукують антимікробний агент баціломіцин
<i>Bacillus subtilis</i>	Насіння пшениці	Бактеріальні біоплівки на насінні пшениці попереджують ріст міцелію мікроскопічних грибів
<i>Bacillus subtilis</i> 3610	Корінці томатів	Біоплівки <i>Bacillus</i> продукують сурфактин, який є антимікробним агентом
<i>Bacillus subtilis</i> Bs916	Стебло рису	Біоплівки <i>Bacillus</i> продукують антимікробний агент фенгіцин
<i>Bacillus subtilis</i> UMAF6614	Філоплана дині	Біоплівки <i>Bacillus</i> продукують баціломіцин та фенгіцин – антимікробні агенти
<i>Bacillus subtilis</i> 6051	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Біоплівки <i>Bacillus subtilis</i> захищають <i>Arabidopsis thaliana</i> продукуючі антимікробний агент сурфактин

1	2	3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQR9	Корінці кукурудзи	Біоплівка бактерій показала активність з посилення росту рослин
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SQY162	Корінці томатів	На корінцях рослин томату біоплівки <i>Bacillus</i> продукують сурфактин та викликають системну резистентність
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Біоплівки надають механічний захист рослин та видаляють патогени з місць перебування
<i>Paenibacillus polymyxa</i> A26	Насіння пшениці	Біоплівки видаляють патогени з місць перебування
<i>Paenibacillus polymyxa</i> B5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Біоплівки видаляють патогени з місць інфекції
<i>Pseudomonas corrugate</i> CCR04 та CCR80	Корінці перцю	Біоплівки <i>Pseudomonas</i> інгібують інші патогени конкурентною колонізацією
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> PA23	Корінці рапсу, корінці пшениці	На корінцях біоплівки <i>Pseudomonas</i> продукують пірролінітин, який попереджає інфікування грибковими патогенами
<i>Pseudomonas putida</i> 06909	Корінці цитрусових	Біоплівки <i>Pseudomonas putida</i> захищають корінці попереджуючи міцеліальне прикріплення

1	2	3
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Коріння кукурудзи, <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	Біоплівки <i>Pseudomonas putida</i> індукують системну стійкість та посилюють ріст рослин
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Груша	Біоплівки <i>Pichia kudriavzevii</i> активують анти-оксидантну систему
<i>Kloeckera apiculata</i>	Цитрусові	Біоплівки видаляють патогени та надають механічний захист рослинам
<i>Pseudoalteromonas</i> <i>tunicate</i>	Зелені водорості, <i>Ulva lactuca</i>	Продукують анти-обростаючі сполуки, які інгібують колонізацію

2.3. Біоплівки для захисту від корозії.

Відомо, що багато мікроорганізмів беруть участь у процесах корозії (руйнування) різних субстанцій: металів і їх сплавів, бетонних і кам'яних будівель. Серед них можна, в першу чергу, назвати сульфатвідновлювальні, залізовідновлювальні, залізоокиснювальні, а також багато нітратвідновлювальних бактерій і фототрофних мікроорганізмів. Однак існують види мікроорганізмів, здатні пригнічувати процес корозії, сповільнюючи обмін іонами між поверхнею металу і навколишнім середовищем. Механізм дії мікробів-стимуляторів корозії пов'язаний з утворенням додаткової гальванічної пари між самими бактеріями (біоплівки) і поверхнею металів. В анаеробних умовах така біоплівка діє як катод, метал - як анод, і електрони надходять від металу до клітин. Позитивний заряд металу збільшується і зберігається до тих пір, поки зберігається активність бактерій. При мікробному інгібуванні корозії, бактерії, навпаки, виступають

в ролі анода, а метал - в ролі катода. Споживання бактеріями кисню знижує швидкість відриву електронів від поверхні металу. Таким чином, процес нагадує принцип небіологічного катодного захисту металів, широко застосовуваного для захисту від корозії.

Інгібування корозії мікроорганізмами пов'язують також з нейтралізацією речовин-стимуляторів корозії або з синтезом таких речовин, як екзополісахариди матриксу біоплівки, що створюють захисний шар на поверхні металу. Ці речовини зв'язуються з позитивно зарядженими іонами металу, формуючи комплексну сполуку з металом. Також показано, що бактерія *Geobacter sulfurreducens* синтезує захисну плівку з фосфату Феруму (II) на поверхні вуглецевої сталі.

Ще одним механізмом є синтез антибіотиків, що пригнічують діяльність мікроорганізмів-стимуляторів корозії. Вважається, що процес мікробного інгібування корозії пов'язаний не з одним, а з декількома видами мікробного метаболізму, властивими представникам різних видів, і, відповідно, з мультівідовими біоплівками, а модельні експериментальні моновидові біоплівки виявляються менш ефективними, ніж мультівидові. Слід зауважити також, що в деяких випадках інгібуюча дія мікробних біоплівок може змінюватися на протилежну, сприяючи корозії, за рахунок активності тих груп мікроорганізмів, які сприяють корозії і при цьому співіснують в одній біоплівці з видами, інгібуючими корозію. Велике значення мають адгезивні властивості самої біоплівки: чим міцніше зв'язується біоплівка з поверхнею металу, тим ефективніша вона для захисту від корозії.

Використання біоплівок мікроорганізмів для захисту від корозії металів і сплавів виглядає дуже перспективним і підтверджено в багатьох лабораторних експериментах. Це могла б бути гідна альтернатива традиційним методам боротьби з корозією: застосування все більш складних сплавів, стійких до корозії, механічного видалення біоплівок мікроорганізмів, що викликають корозію, а також застосування спеціальних антикорозійних покриттів, компоненти яких несприятливо впливають на

екологічну обстановку і нерідко є токсичними для всіх живих істот. Однак до широкого впровадження методів біозахисту від корозії ще далеко. Виняток становить лише приклад використання біоплівки, в складі якої були присутні 5 видів бацил, що синтезують поліміксин і граміцидин, для захисту від корозії об'єктів атомної станції. Однак в цьому випадку внесок мікроорганізмів на захист від корозії виявився мінімальним.

Можна послатися також на успішні приклади використання біоплівок для захисту кам'яних будівель завдяки так званому процесу карбонатогенезу: осадження карбонатів у вигляді захисного шару на поверхні будівель в результаті діяльності бактерій або водоростей.

Підсумовуючи вищенаведене, можна зробити висновок, що вивчення складу і структури мультिवидових біоплівок і, особливо, механізмів взаємовідносин мікроорганізмів, що входять до їх складу, стає пріоритетним напрямком досліджень мікробних угруповань в екології, медицині і біотехнології. Швидке вдосконалення інструментальних методів дозволяє сподіватися на серйозні успіхи в розшифровці цих механізмів і в розробці методів управління життєдіяльністю природних мікробних популяцій.

Лекція 6

Біоплівки та мікробно індукована корозія

План

1. Поняття мікробно індукованої корозії (МІК) та її характеристика.
2. Характеристика біоплівок, асоційованих з МІК.
3. Методи пом'якшення наслідків.
4. Механізми МІК:
 - 4.1. Біоплівка як хімічний бар'єр.
 - 4.2. Фізична структура біоплівки.

Використані літературні джерела:

Li K., Whitfield M., Van Vliet K.J. Beating the bugs: roles of microbial biofilms in corrosion. *Corros. Rev.* 2013. Issue 31(3-6). P. 73–84. DOI 10.1515/corrrev-2013-0019

1. Поняття мікробно індукованої корозії (МІК) та її характеристика.

Мікробно індукована корозія (МІК) може прискорити механічне руйнування металів у широкому діапазоні середовищ, починаючи від нафтових та водопровідних трубопроводів і машин до біомедичних пристроїв. Хоча цей спосіб екологічної корозії не має єдиного визначення, МІК незмінно включає корозію в присутності мікробних видів, включаючи бактерії та пов'язані з ними біоплівки, які утворюються цими бактеріями. Відзначено виникнення МІК для різних металів і сплавів, таких як залізо та сталь, мідь і титан, а також для неметалевих матеріалів, таких як бетон. Наприклад, оцінюється, що МІК і пов'язане з нею біообростання складають 20 % прямих витрат на цілісність і надійність паливопроводів, що перевищує 2 мільярди доларів США на рік. Нещодавно цей механізм корозії був причетний до кількох швидких, гучних відмов трубопроводу, включаючи відмову в трубопроводі легкої сирої нафти, відмову в трубопроводі для морської води протягом декількох років після встановлення, витіки в системі охолодження з нержавіючої сталі та витіки в Трансаяскінському трубопроводі.

Незважаючи на десятиліття досліджень, точні механізми, за допомогою яких посилюється корозія, і середовища, в яких відбувається МІК, погано вивчені. Дійсно, навіть у межах одного нафтового родовища чи трубопроводу деякі місця можуть демонструвати МІК, а інші – ні. Традиційно це явище вивчали або з біологічної точки зору – беручи до уваги складну природу консорціумів бактерій і утворення біоплівки, або з точки зору корозії матеріалів – беручи до уваги докази та пом'якшення наслідків піттингової корозії металу в контрольованих умовах. Таким чином, немає

консенсусу щодо того, як зменшити корозійні втрати через МІК. Тут ми розглядаємо найсучасніше розуміння механізмів МІК на сталі (тобто залізовуглецевих або чорних сплавах), стратегії пом'якшення МІК і роль бактеріальної біоплівки як у корозії, так і у пом'якшенні її.

2. Характеристика біоплівок, асоційованих з МІК

МІК може виникати як в аеробних, так і в анаеробних умовах і визначається, окрім корозії, присутністю мікробних видів (бактерій) та пов'язаних із ними біоплівок. Таким чином, МІК вважається біологічною корозією, а терміни «мікроби» та «бактерії» використовуються як синоніми. Оскільки бактерії всюдишні, присутні майже в усіх середовищах (повітря, вода, ґрунт та органічні рідини), сама присутність бактерій у місцях корозії не обов'язково означає, що бактерії були значним фактором, що сприяє ініціації або прискоренню корозії. МІК може виникнути в поєднанні з іншими типами абіотичної корозії, що ще більше ускладнює спроби виявити першопричину корозійного збою. Часто МІК пов'язана з точкою на поверхні, що призводить до більш швидкого корозійного руйнування, ніж до рівномірної корозії (рис. 12).

Таким чином, навіть кольорові метали, які мають природний пасивуючий шар на поверхні (наприклад, оксиди купруму та оксиди титану), демонструють МІК, коли метаболічні побічні продукти мікробів служать для хімічного відновлення та, таким чином, руйнують пасивуючу плівку в анаеробних умовах; це призводить до точкової корозії на межі метал-біоплівка. Оскільки багато характеристик поверхні, включаючи шорсткість, заряд і гідрофільність, можуть модулювати бактеріальну адгезію, поки що не ясно, чи бактерії ініціюють ямки чи переважно прилипають до вже існуючих ямок. Незважаючи на те, що кілька досліджень виявили докази того, що мікроби переважно прилипають до анодних металевих ділянок, таких як зварні з'єднання, подряпані краї, межі крихт або до попередньо корозійних ділянок, більш пізні дослідження не змогло підтвердити ці твердження щодо

конкретних місць. Коли багато видів бактерій прилипають і розмножуються на поверхні, вони виділяють збагачений полісахаридами матрикс; біоплівка включає позаклітинний полісахаридний матрикс і бактеріальні клітини всередині.

Спроби просторово співвіднести локалізовану корозію з поверхневою біоплівкою, наприклад, використовуючи методи електрохімічного картування, зазнали невдачі через природу самої біоплівки – її провідність. Крім того, хоча піттинг є відомою ознакою МПК, інші не знайшли унікальних характеристик, які б відрізняли морфологію ямок МПК від абіотичних ямок. На ділянках з підозрою на МПК завжди виявляється так званий консорціум кількох видів бактерій (а не один вид), хоча кількість і типи бактерій у цьому консорціумі значно варіюються від місця до місця. Оскільки умови культивування більшості видів бактерій недостатньо встановлені, визначити філогенетичний склад важко. Проте застосування молекулярних методів тепер дозволяє більш детально аналізувати екстракти, кількісно визначити типи та відносну кількість видів. Кілька досліджень провели детальну філогенетичну характеристику рідин із газо- та нафтопроводів і водовідвідних труб на нафтовидобувних об'єктах. Категорії бактерій, які зазвичай безпосередньо пов'язані з корозією, це сульфатвідновлювальні бактерії (СВБ), залізоокиснювальні бактерії, сульфуроокиснювальні бактерії, нітратвідновлювальні бактерії (НВБ) і метаногени. Ці бактерії можуть безпосередньо відновлювати метал, виробляти корозійні побічні продукти метаболізму та/або виробляти біоплівки, які опосередковано змінюють місцеве середовище, сприяючи корозії.

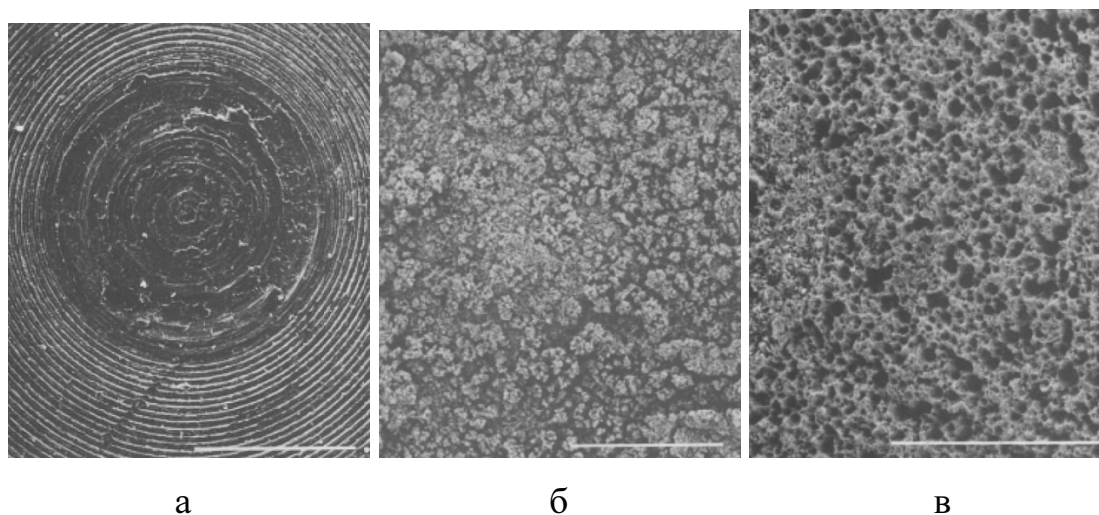


Рис. 12. Зображення скануючої електронної мікроскопії, які демонструють ріст і пошкодження, спричинені сульфатвідновлювальними бактеріями, зростаючими на шпильках зі сталі SAE 1020. (а) Контрольна шпилька, що показує концентричні кільця від токарного різання; шкала 500 мкм. (б) відкладення сульфатвідновлювальної бактеріальної біоплівки через 64 дні; шкала 500 мкм. (в) Кородована шпилька після видалення біоплівки з виявленням серйозних точкових пошкоджень; шкала 500 мкм (Li et al., 2013)

СВБ вважаються одними з головних винуватців біокорозії в анаеробних умовах. СВБ – це група бактерій, яка включає щонайменше 220 видів, які виробляють H_2S і використовують сульфати як кінцевий акцептор електронів. Більшість СВБ вважаються облігатними анаеробами, що означає, що клітини не можуть метаболізувати та/або розмножуватися в присутності кисню, хоча багато видів можуть тимчасово переносити низькі рівні кисню. Крім того, анаеробні умови, здатні підтримувати ріст СВБ, можуть бути створені в загальному аеробному середовищі завдяки мікронішам, створеним усередині шару бактеріальної біоплівки/продукту корозії. Хоча СВБ є найбільш вивченими та добре зрозумілими анаеробними бактеріями, що індукують корозію, зазначається, що МІК може відбуватися в анаеробних умовах за відсутності СВБ. Однак, враховуючи широке визнання присутності СВБ у промислових контекстах МІК, а також суттєве дослідження угруповання цих бактерій на генетичному та структурному рівнях, ми

зосередимося насамперед на ролі цього типу мікробів у консорціумі та біоплівках, що мають відношення до МІК сплавів заліза.

МІК приписують не планктонним бактеріям, а натомість бактеріям, що прилипають у формі біоплівок на поверхні. Багато типів бактерій прилипають до біоплівок, збагачених полісахаридами, і утворюють їх на поверхнях матеріалів, при цьому взаємодія значною мірою залежить від властивостей поверхні матеріалу, властивостей рідини та механізмів адгезії бактерій. Утворення біоплівки відбувається за серією критичних етапів: початкове швидке та оборотне прикріплення бактерій, більш стабільне, довгострокове прикріплення, розмноження бактерій та секреція матриксу, дозрівання біоплівки та, нарешті, розсіювання бактерій. Основні структурні компоненти біоплівок виробляються самими бактеріями шляхом секреції позаклітинних полімерних речовин (ЕПС – екзополісахаридні сполуки). ЕПС складаються в основному з полісахаридів, білків, нуклеїнових кислот і ліпідів. Біоплівки можуть мати будь-яку товщину від мкм до мм. Ці структури можуть розвиватися і дозрівати протягом годин, днів або місяців, залежно від виду бактерій і середовища (рис. 13).

Повторне утворення біоплівки потенційно може статися через скребки, навмисне механічне відшарування продуктів корозії, включаючи сульфіди Феруму, на внутрішніх поверхнях трубопроводу або через загальний розрив біоплівки. У контексті транспортування палива в трубопроводах спорадична швидкість потоку та склад рідини також можуть порушувати та сприяти утворенню біоплівки, а також наявність біоплівки може впливати на траєкторії потоку. По суті, через ці біоплівки бактерії створюють унікальне та стійке мікросередовище, яке може суттєво відрізнитися (з точки зору складу та розподілу твердих речовин, рідин і газів) від загального макросередовища. Утворення біоплівки саме по собі не потребує збільшення швидкості корозії та за певних обставин може призвести до стійкості до корозії. Певні бактерії в біоплівках можуть видаляти агенти, що сприяють корозії, такі як O_2 , як частину метаболізму бактерій, можуть виділяти

антимікробні агенти, які пригнічують ріст бактерій, що викликають корозію, і можуть створювати фізичні бар'єри, які захищають поверхні від корозії. Конкретний вид і умови навколишнього середовища значною мірою впливають на корозійний потенціал біоплівки. Ця варіація заплутала ідентифікацію загального причинно-наслідкового зв'язку між наявністю бактерій і корозією. Така складність не дозволяє науковцям робити загальні висновки щодо потенціалу, механізмів і швидкості корозії за межами конкретних умов, у яких проводилися спостереження.

Ця складність спонукала до розробки моделей для кращого прогнозування розвитку МІК та наслідків, але застосовність таких моделей наразі обмежена конкретними видами та умовами навколишнього середовища. Хоча дослідження окремих видів, природно, краще контролюються та їх легше інтерпретувати, визнання важливості взаємодії між різними видами бактерій у біоплівці спонукало до досліджень кількох видів. Наприклад, Okabe, Itoh, Satoh і Watanabe (1999) вивчали просторовий розподіл СВБ у біоплівці аеробних стічних вод і виявили, що, хоча СВБ були розташовані по всій біоплівці, відновлення сульфатів було зосереджено у вузькій безкисневій смужці. Andersson, Kuttuva Rajarao, Land і Dalhammar (2008) систематично вивчали початкове прилипання та утворення біоплівки з різними комбінаціями 13 видів бактерій, які часто зустрічаються в системах стічних вод, і виявили складні протагоністичні та антагоністичні взаємодії, які залежали від видового складу. Цікаво, що Lee, Buehler і Newman (2006) виявили, що подвійна біоплівка з СВБ і залізовідновлювальними бактеріями, призвела до зниження корозії порівняно з біоплівкою, що містить лише СВБ. Videla, Borgne, Panter і Singh Raman (2008) також виявили відмінності в корозії з залізовідновлювальними бактеріями та СВБ у змішаній культурі в різних середовищах.

Однак у цілому ці дослідження ілюструють складність процесу, а не дають конкретних висновків щодо механізмів МІК. Фактори навколишнього середовища, такі як зсувний потік рідини в трубопроводах, додають ще один

рівень складності до розвитку біоплівки та, отже, до МК у промислових умовах. Відомо, що сили зсуву можуть значною мірою впливати на адгезію бактерій і розвиток біоплівки, незалежно від контексту. Наприклад, в інших видів бактерій (наприклад, аеробних видів, таких як *Escherichia coli*) було показано, що адгезія посилюється за наявності помірної швидкості потоку. При більш низьких показниках так званий механізм «catch bond» («захоплюючий зв'язок» — це тип нековалентного зв'язку, час дисоціації якого збільшується разом із силою розтягування, прикладеною до зв'язку. Зазвичай очікується, що тривалість життя зв'язку зменшуватиметься із силою. Цей механізм допомагає пояснити біофізику міжклітинної адгезії) не активується, а при більш високих показниках зв'язування знову порушується; лише на проміжних швидкостях адгезивні структури на поверхні бактерій налаштовані на зв'язування з поверхнею з найвищою спорідненістю та найдовшим терміном служби. Для СВБ невідомо, чи існують подібні адгезивні структури та механізми. Проте було показано, що помірні швидкості потоку (0,1–0,5 м/с) змінюють морфологію біоплівки СВБ і збільшують жорсткість біоплівки та межу текучості при зсуві. При достатньо високих швидкостях потоку (3,5 м/с) адгезія СВБ і ріст біоплівки пригнічуються. Якісно ці результати подібні до більш широко вивчених аеробних біоплівок, що дає можливість поділитися розумінням механіки. У дослідженні, не пов'язаному безпосередньо з дослідженнями корозії, Rochex та ін. (2008) виявили, що підвищені напруги зсуву знижують видову різноманітність у біоплівках. Більш чітке розуміння того, як умови потоку впливають на структуру, різноманітність і корозійний потенціал біоплівки, пов'язаної з МК, дозволить покращити оцінку ризику та вибір швидкості потоку в трубопроводі та схеми потоку.

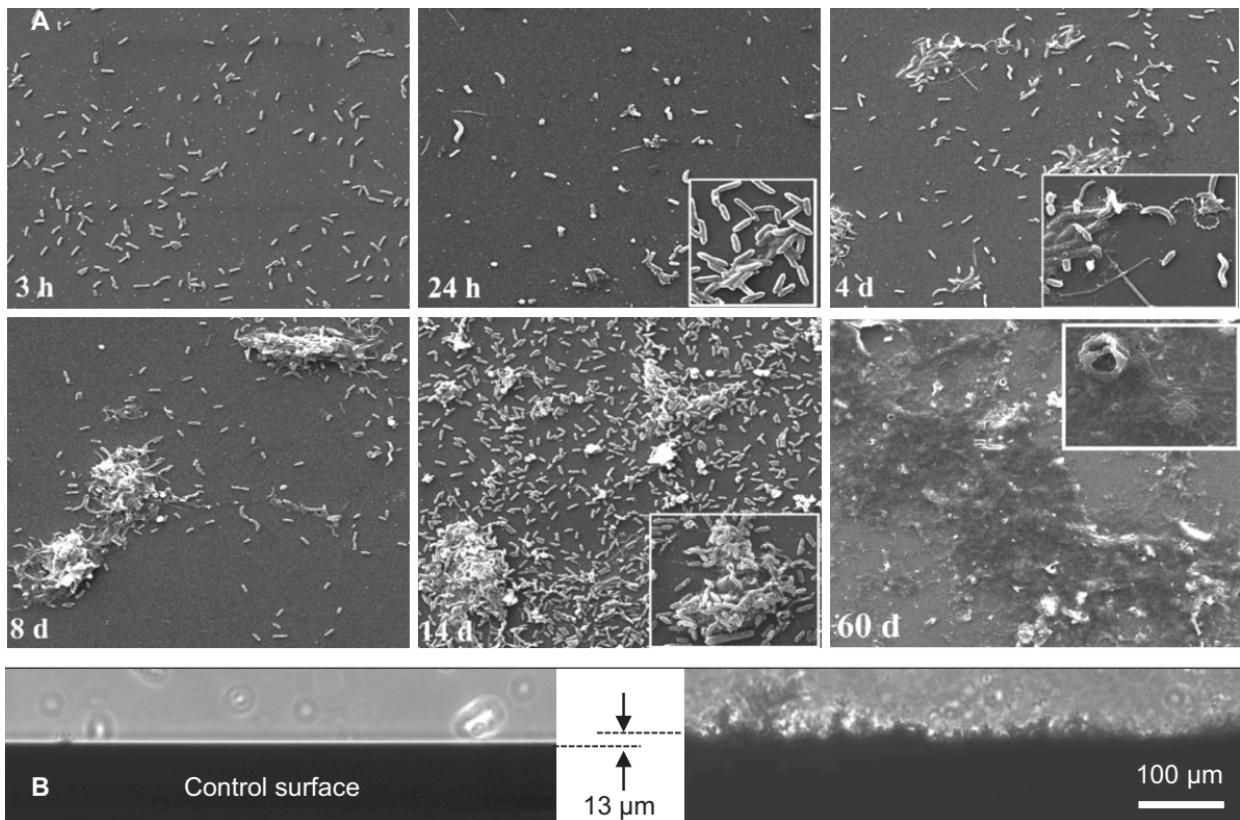


Рис. 13. (А) Зображення скануючої електронної мікроскопії, що демонструє ріст біоплівки протягом 60 днів. Усі зображення мають розмір 1000×, за винятком 60 днів, які становлять 200×. Внутрішні квадрати мають розмір 4000×. (В) Оригінальне зображення, що демонструє поперечний переріз комбінованого шару біоплівки/продукту корозії після 2 днів росту *Desulfovibrio vulgaris* на музичній пружині зі сталі марки (ASTM A228) (Li et al., 2013)

3. Методи пом'якшення наслідків.

Було досліджено декілька методів для пом'якшення впливу МПК. Сюди входить використання корозійностійких металів, захисних покриттів, очищення, анодного та катодного захисту, біоцидів, впровадження конкуруючих бактерій, а також додавання або видалення поживних речовин. Деякі методи, такі як чистка (тобто механічне відшарування продуктів корозії) і додавання біоцидів широко використовуються в польових умовах, які включають кислі (анаеробні, сірковмісні) середовища, такі як закопані трубопроводи. Інші підходи, такі як золь-гелеве покриття бар'єрів або

попереднє покриття очищеним EPS, все ще знаходяться на стадії експерименту. Одним з методів, нещодавно випробуваних у польових умовах – і таким, що спирається на надійне розуміння біоплівки – є зміна корозійної здатності біоплівки шляхом маніпулювання доступними поживними речовинами шляхом додавання нітратів або видалення сульфатів. Було показано, що в польових умовах додавання нітратів і видалення сульфатів впливають на активність СВБ і є певною мірою ефективними для зменшення або зміни корозії. Додавання нітратів може дозволити іншим бактеріям, таким як нітратвідновлювальні, витіснити більш корозійні СВБ (рис. 14). Крім того, є докази того, що нітрати можуть безпосередньо пригнічувати метаболізм і проліферацію СВБ. Однак додавання нітратів не є остаточним рішенням МПК. Хоча цей підхід зазвичай зменшує виробництво сульфідів, ефект є лише тимчасовим, і СВБ не знищуються. Таким чином, утворення сульфідів швидко відновлюється, якщо припиняється активна обробка нітратами. Інше дослідження показало, що додавання нітратів може зменшити рівномірну поверхневу корозію, але не точкову корозію, остання з яких часто є причиною поломок трубопроводів. Крім того, ті самі протоколи маніпулювання поживними речовинами працюють в деяких конвеєрах, але не в інших, що вимагає спроб і помилок у кожному місці для досягнення найкращих результатів. Одне дослідження навіть виявило, що нітрати можуть посилити корозію сталі. Нарешті, навіть коли інгібування корозії досягнуто, для таких застосувань, як відновлення та обробка палива, додавання таких хімікатів вимагає подальших процесів видалення рідини, що представляє інтерес; це не обробка, локалізована на металевій поверхні, і, таким чином, додавання та видалення хімічних речовин у великих обсягах впливає на вартість продукту і, отже, на рішення щодо застосування таких стратегій проти МПК. Таким чином, хоча зміна поживних речовин дала інтригуючі результати щодо пом'якшення МПК, вона ще не дала остаточного рішення.

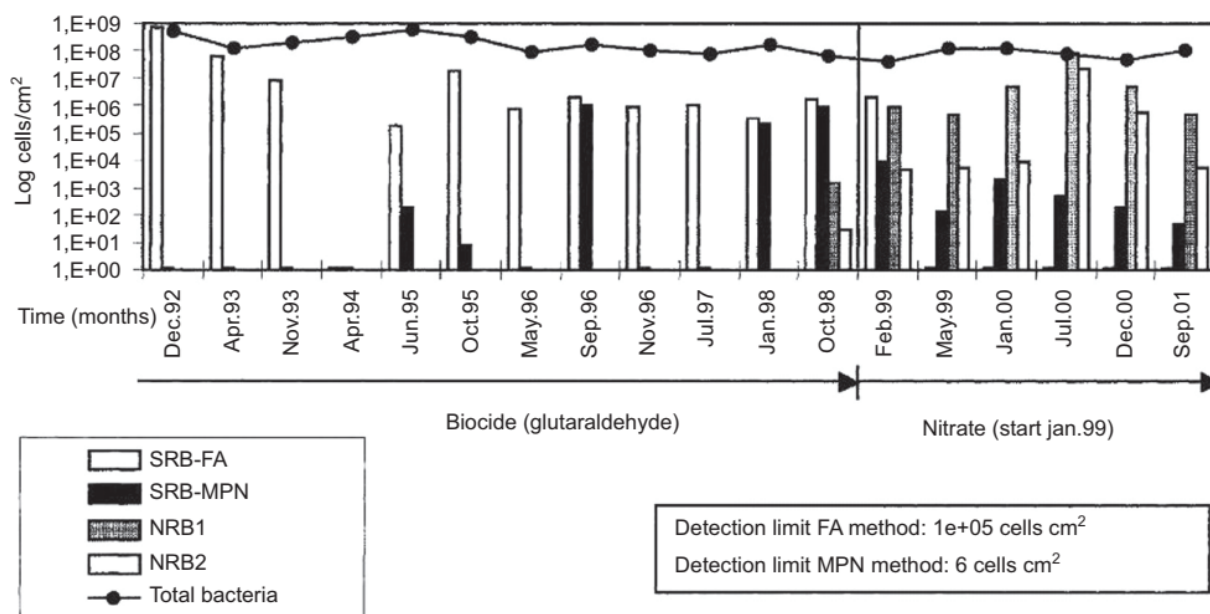


Рис. 14. Дані вимірювання вмісту бактерій у плавучій установці Веслефрікк, нафтовидобувного об'єкта в Північному морі. Виробництво почалося в 1989 році з використанням біоцидної обробки до січня 1999 року, коли його було припинено на користь введення нітратів. Спостерігалось подальше зменшення кількості сульфатвідновлювальних бактерій (SRB) і збільшення кількості нітратвідновлювальних бактерій (NRB). Популяцію SRB характеризували за допомогою методу флуоресцентних антитіл (FA), а також методу «найбільш вірогідного числа» (MPN). За допомогою методу MPN вимірювали два типи NRB: NRB1, які є факультативними анаеробами, і NRB2, які є облигатними анаеробами (Li et al., 2013)

4. Механізми МІК.

Через складність взаємодії мікроб-метал, основний механізм МІК залишається відкритим питанням і є предметом численних дискусій. Було запропоновано багато можливих механізмів МІК, і можливо, що не існує жодного переважного механізму. Це видається ймовірним, враховуючи високу різноманітність видів та умов, у яких спостерігається МІК. Відомо, що хімічні, механічні та структурні фактори відіграють певну роль, як біотичні, так і абіотичні за своєю природою, і всі вони можуть працювати разом, щоб спричинити та підтримувати МІК. Таким чином, слід

підкреслити, що докази однієї гіпотези не обов'язково суперечать іншій. Дані умови навколишнього середовища та присутні види бактерій можуть диктувати переважний механізм. Серед перших запропонованих механізмів для МІК - теорія катодної деполяризації, також відома як класична теорія. Вона була висунута в 1934 році Куром і Флугтом, щоб пояснити несподівано високий рівень корозійних руйнувань, які зустрічаються на заглиблених чавунних трубопроводах у голландській сільській місцевості. СВБ були визначені як винуватці через продукти корозії сульфиду Феруму, виявлені в поєднанні з цими несправностями. В анаеробних умовах, де процвітають СВБ, іони Гідрогену зазвичай служать кінцевими акцепторами електронів на катоді в реакції корозії. Цей відновлений Гідроген буде адсорбуватися на металевій поверхні, поляризуючи її. Відповідно до класичної теорії, роль СВБ полягала в споживанні цього катодного Гідрогену за допомогою ферменту гідрогенази, каталізуючи рекомбінацію адсорбованого атомарного Гідрогену в газоподібний водень і таким чином деполяризуючи катод.

Хоча класична теорія була заснована на електрохімії та знаходила загальне визнання протягом майже півстоліття, вона була остаточно скасована, коли нові методи показали, що гідрогеназа може діяти лише на молекулярний водень, а не на атомарний Гідроген. На підтримку цього висновку Корд-Рувіш (1996) показав, що нітратвідновлювальні бактерії з підвищеною здатністю споживати водень не викликали помітної корозії. Однак, незважаючи на ці висновки, дослідження ролі гідрогенази в МІК продовжуються, часто з суперечливими результатами. Дослідження 1991 та 2002 років показали позитивну кореляцію між наявністю гідрогенази та МІК, тоді як у дослідженні 1973 року такого зв'язку не виявлено. Після падіння класичної теорії було запропоновано безліч «альтернативних теорій», які часто намагалися пояснити МІК, мінімізуючи роль самих бактерій. Такі теорії включають анодну деполяризацію, присутність летких сполук фосфору, екзополімери, що зв'язують метали, корозійне розтріскування під напругою, викликане сульфідами, і утворення пухирців, спричинене воднем.

Однак тут ми обмежуємо нашу увагу біоплівкою та її роллю в МІК. Рисунок 15 ілюструє механізми, за допомогою яких біоплівка може сприяти ініціації корозії та прискоренню швидкості корозії.

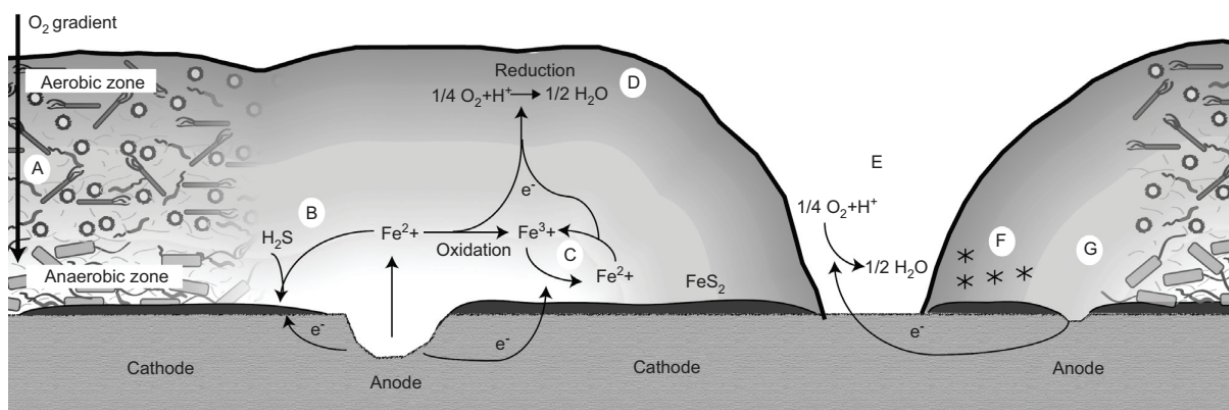


Рис. 15. Механізми, за допомогою яких біоплівка може сприяти корозії. (A) Створення анаеробних зон; (B) концентрація корозійних хімічних речовин; (C) концентрація іонів Феруму; (D) провідність електронів від поверхні; (E) створення зон диференціальної аерації; (F) зв'язування промоторів корозії; і (G) руйнування пасивуючої плівки (Li et al., 2013)

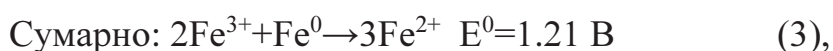
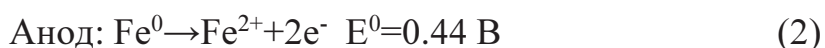
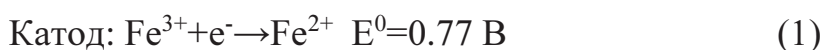
4.1. Біоплівка як хімічний бар'єр

Існування біоплівки може перешкоджати дифузії хімічних частинок – як у біоплівку, так і з неї – утворюючи локалізоване хімічне середовище, яке значно відрізняється від основної маси. Ці локалізовані середовища можуть, у свою чергу, значною мірою впливати на корозію, що лежить в основі, кількома способами (рис. 15). В аеробних умовах концентрація кисню може сильно відрізнятись в біоплівці як через обмеження дифузії O_2 , так і через споживання O_2 аеробними бактеріями. Таким чином, навіть в аерованому середовищі під біоплівкою можуть розвиватися анаеробні області, сприяючи проліферації СВБ та інших анаеробів, що посилюють корозію (рис. 15A). Перешкоджаючи дифузії корозійних хімічних речовин від поверхні металу, біоплівка може ефективно діяти як мультиплікатор концентрації. H_2S , що утворюється СВБ в анаеробних ділянках, потенційно є набагато потужнішим, коли він інкапсульований під біоплівкою, ніж в іншому випадку (рис. 15B).

Кінг та ін. (1973) продемонстрували значну різницю у швидкості корозії між середовищем з СВБ і стерильним середовищем, до якого періодично додавали еквівалентну кількість сульфідів. У першому випадку біогенні сульфідні утворювалися під біоплівкою та біля поверхні металу, тоді як у другому випадку абіотичний сульфід додавали безпосередньо до масового розчину.

Окрім концентрації H_2S , біоплівка також може концентрувати корозійні іони двовалентного Феруму, що є ключовим фактором МІК (рис. 15С). Попередні дослідження показали, що присутність іонів двовалентного Феруму є головним фактором виникнення МІС на чавуні або сталі у водному середовищі. Lee & Characklis (1993) виростили чисту культуру СВБ за відсутності іонів двовалентного Феруму, і в дослідженні майже не спостерігалося корозії, незважаючи на високий рівень мікробної активності. Встановлено позитивну кореляцію між концентрацією іонів Феруму та швидкістю корозії. Ця сильна кореляція означає, що іони Феруму відіграють невід'ємну роль у механізмі корозії МІК, принаймні за присутності СВБ. Можна запропонувати дві можливі ролі: важливу роль відіграє окисно-відновна пара іонів Fe^{2+}/Fe^{3+} та/або продукти корозії Феруму. Слід зазначити, що іони двовалентного Феруму не впливають будь-яким чином на метаболізм СВБ, хоча відомо, що інші бактерії використовують їх для процесу корозії металів, крім сталі, наприклад *Acidithiobacillus ferrooxidans* у промисловому процесі біовилуговування.

На межі розділу метал/розчин між залізом і водними іонами двовалентного та тривалентного Феруму встановлюється гальванічний елемент і відбуваються такі дві реакції напівелемента:



де стандартні електродні потенціали відносяться до стандартного водневого електрода. При зв'язуванні з функціональними групами в біоплівці

ці потенціали можуть стати ще більш сприятливими для корозії, як обговорювалося раніше. Тим не менш, як окисник, іони Феруму(III) ($E_0 = 0,77 \text{ В}$) є більш відновлювальними, ніж водень ($E_0 = 0 \text{ В}$), але меншими, ніж кисень ($E_0 = 1,23 \text{ В}$), що означає, що за однакових концентрацій іонів катодна реакція за участю кисню буде переважною. Однак сила іонів Феруму (III) як окисника в корозії чавуну або сталі є позитивною петлею зворотного зв'язку, як показано на малюнку 15С. Іони двовалентного Феруму постійно регенеруються під час цієї реакції корозії. Крім того, кожен новий іон двовалентного Феруму генерується на межі розділу, запобігаючи розвитку обмеженої дифузійною кінетики. Потім ці іони двовалентного Феруму можуть бути окиснені киснем для відновлення концентрації іонів Феруму (III). Відомо, що для $\text{pH} > 4,5$ швидкість цієї реакції дуже висока і, отже, не обмежує швидкість корозії.

Наявність біоплівки сприяє цьому механізму двома способами: по-перше, вона додатково концентрує іони Феруму (III) біля поверхні металу; по-друге, вона просторово розділяє дві реакції окиснення. Рисунок 15D ілюструє другий момент: електрони, втрачені іонами двовалентного Феруму в анаеробній зоні, можуть проходити через провідну біоплівку, щоб бути прийнятими киснем в аеробній зоні. Усунувши потребу будь-якого виду дифундувати через біоплівку, швидкість корозійної реакції може бути значно збільшена. Це свідчить про те, що присутність біоплівки, а не присутність бактерій, які створили та стабілізували цю біоплівку, безпосередньо збільшує швидкість корозії. Окремо зазначимо, що види бактерій, що окиснюють Ферум, які в рамках свого метаболізму окиснюють Fe^{2+} до Fe^{3+} , були ідентифіковані під час подій МІК, і вони також були залучені як потенційна причина МІК.

4.2. Фізична структура біоплівки.

Фізична структура та гетерогенна природа біоплівки також сприяють процесу корозії. Біоплівки часто нерівні та мають різну товщину у мікромасштабі, створюючи ізольовані вогнища виснаження кисню, які можуть

спровокувати локалізовану корозію через створення комірок диференціальної аерації (Рис. 15E). Ро, Левандовські та Функ (1996) продемонстрували цей ефект. Вони помістили ділянку агарози (біогелю з коефіцієнтом дифузії кисню трохи нижчим, ніж у води) товщиною у мкм поверх зразка з низьковуглецевої сталі та спостерігали локальну корозію під абіотичною плівкою. Крім того, було запропоновано, що ферменти, вбудовані в біоплівку, такі як гідрогеназа, або інші хімічні властивості біоплівки також можуть посилювати корозію (рис. 15F). Вважається, що комплексоутворення іонів металу функціональними групами, наприклад, посилює корозію шляхом зміни окисно-відновного потенціалу іонів двовалентного Феруму в біоплівці, хоча Roe et al. (1996) не знайшли доказів на підтримку цієї гіпотези. У присутності СВБ іони Феруму (II) також утворюють продукти корозії, такі як сульфід Феруму, точну форму та склад яких важко передбачити. Відомо, що сульфід Феруму можуть переходити з нестабільних, реакційноздатних до кисню фаз, таких як макінавіт, піротин та стабільний пірит FeS_2 , але на практиці перетворення є просторово та часово неоднорідним.

Cwalina & Dzierzewicz (1999) відзначили різницю в структурі сульфідів Феруму, утворених біотичним і абіотичним шляхом, перші називають «аморфними преципітатами», а другі — «кристалічними преципітатами». Незважаючи на це, сульфід Феруму виступають як катод щодо заліза, але цей ефект може бути як захисним, так і руйнівним. Подібно до пасивної плівки оксиду хрому на нержавіючій сталі, стійка плівка сульфід Феруму може захистити металеву поверхню від подальшої корозії, але навіть невелике пошкодження цієї плівки може призвести до високої швидкості щілинної або точкової корозії через величезну різницю розмірів між катодом із сульфід Феруму та відкритим анодом із заліза (чавуну або сталі). З різних форм сульфід Феруму пірит (кубічний FeS_2), як відомо, є найстабільнішим, а також найбільш корозійним у будь-яких місцях руйнування плівки. Відомо також, що FeS_2 чутливий до розчинення в присутності певних бактерій, таких як *A. ferrooxidans*. Проте вплив біоплівки на цю пасивну плівку є предметом

багатьох дискусій. Його присутність може стабілізувати цю пасивну плівку, діючи як фізичне сполучне та захисне покриття. Навпаки, наявність біоплівки може потенційно перешкоджати утворенню такої плівки або сприяти локальній дестабілізації такого покриття (Рис. 15G). Інтригуюче те, що експерименти Лі та Чаракліса (1993) демонструють обидві можливості, відрізняючись лише порядком надходження біоплівки проти плівки сульфідів Феруму. Менш контрольовані промислові середовища, такі як нафтопроводи, включають потік рідини та постійне утворення та руйнування як сульфідів Феруму, так і біоплівок. У таких контекстах порядок надходження будь-якої плівки на сплав заліза, а отже і ефект біоплівки, залишається неоднозначним.

Отже, за десятиліття досліджень з точки зору як корозії, так і мікробіології було досягнуто значного прогресу в розумінні МІК. Однак цей спосіб екологічної корозії залишається поширеним механізмом відмови в широкому діапазоні промислових контекстів. Ми знаємо більше про бактеріальні види та біоплівки, ніж будь-коли раніше, але складна взаємодія між видами в екстремальних середовищах, таких як поверхні розділу анаеробні розчини/метал, не піддається ефективним стратегіям пом'якшення. Загострення уваги до біоплівки як до біотичного покриття, яке потенційно може сприяти або пом'якшувати корозію чорних сплавів у кислих середовищах, викликає кілька невирішених питань. Чим відрізняються біотичні та абіотичні ями та швидкості корозії? Яке поєднання видів бактерій і факторів навколишнього середовища сприяє МІК? Як потік рідини впливає на стабільність біоплівки СВБ і як це залежить від генетичного різноманіття цього виду? Відповіді на подібні запитання вимагатимуть нових аналізів біотичної корозії *in situ* та дозволять покращити прогнози умов навколишнього середовища, чутливих до МІК. Разом це сприятиме економічно ефективному моніторингу ризику корозії. Підходячи до цієї складної проблеми МІК як з точки зору матеріалознавства, так і з біологічної точки зору, кількісне розуміння взаємодії клітина-матеріал готове запропонувати нове розуміння та стратегії пом'якшення.

Лекція 7

Біоплівки у охороні здоров'я та медицині

План

1. Біоплівкові інфекції.
2. Мікробні угруповання, оточені матриксом та адгезовані на небіологічних та біологічних поверхнях
3. Інфекції, пов'язані з приладами.
4. Інфекційний ендокардит.
5. Муковісцидоз, пневмонія.

Використані літературні джерела:

1. Dufour D., Leung V., Lévesque C.M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2012. N 22. P. 2–16.
2. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. 2004. Vol.2. P. 95-108.
3. Yadav M.K. Role of Biofilms in Environment Pollution and Control. In: *Microbial Biotechnology. Vol.1. Applications in Agroculture and Environment*. Patra J.K., Vishnuprasad Ch.N., Das G. [eds]. Singapore: Springer Nature, 2017. P. 377-398.

1. Біоплівкові інфекції

Мікробні біоплівки викликають багато інфекційних захворювань у людини.

Кілька патогенів, пов'язаних з хронічними інфекціями, пов'язані з інфекціями біоплівки, включаючи періодонтит, муковісцидоз, пневмонію, хронічні інфекції сечовивідних шляхів, хронічний отит та хронічні інфекції рани (табл. 2). На відміну від гострих інфекцій, які в основному є результатом планктонного (вільноплаваючого) росту, при хронічних бактеріальних інфекціях планктонний фенотип, як правило, існує лише

тимчасово, і, як правило, як мінорна популяція. Оскільки хронічні інфекції принципово відрізняються від гострих інфекцій, необхідні різні стратегії для ефективнішого лікування інфекцій біоплівки. Те, що мікробні біоплівки являють собою захищений спосіб росту, який дозволяє клітинам виживати у ворожому середовищі, є проблемою для лікування хронічних інфекцій біоплівки. Хронічні інфекції, таким чином, важливі в клінічному плані, оскільки бактерії в біоплівках протистоять імунній відповіді господаря та лікуванню антибіотиками, і ці характеристики часто наводяться як причина, чому бактерії здатні тривалий час зберігатися в організмі людини.

Таблиця 2

Різноманіття інфекцій людини із залученням біоплівок (Dufour et al., 2012)

Анатомічна локалізація	Інфекційна хвороба	Мікроорганізми
1	2	3
Око	Інфекції очей	<i>S. aureus</i>
Вухо	Отит середнього вуха	Нетиповані <i>H. influenzae</i>
Рот	Карієс зубів Ендодонтичні інфекції Періодонтити	Кислотоутворювальні грам-позитивні коки Грам-позитивні анаеробні види, <i>Bacteroides</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Fusobacterium</i> Грам-негативні анаеробні бактерії ротової порожнини
Дихальний тракт	СФ пневмонія Хронічний синусит	<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. cepacia</i> <i>S. aureus</i> та коагулазо- негативні стафілококи
Серце	Ендокардит	Зеленячі стрептококи
М'язи	М'язо-скелетні інфекції	Грам-позитивні коки
Кістки	Остеомієліт	Різні бактеріальні види

1	2	3
Шкіра	Некротизуючий фасциїт	Стрептококи групи А
Стопа	Інфекція діабетичної стопи	<i>Corynebacterium</i> spp. та різні облигатні анаероби
Простата	Бактеріальний простатит	<i>E. coli</i> та інші грам-негативні види
Піхва	Синдром стафілококового токсичного шоку	<i>S. aureus</i>
Жовчовивідна система	Жовчні камені	Бактерії кишківника
Сечова система	Інфекція сечової системи	<i>E. coli</i> , ентерококи, <i>Klebsiella</i>
Товста кишка	Персистентна діарея	<i>E. coli</i>

Інфекції, пов'язані з біоплівками, важко піддаються лікуванню через стійкість біоплівки до антибіотиків, що призводить до збільшення вартості лікування та часу відновлення. За даними Національних інститутів здоров'я (НІЗ), понад 75% бактерій утворюють біоплівки за різних умов навколишнього середовища. Багато бактерій, включаючи *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *E. coli* тощо, утворюють біоплівки на тканинах людини та на медичних пристроях. *Streptococcus pneumoniae* - це грампозитивні бактерії, які часто виділяються з біоплівки. *S. pneumoniae* у дітей, людей похилого віку та хворих зі зниженим імунітетом викликає важкі інвазивні інфекції, такі як пневмонія, септицемія та менінгіт.

Висловлюється думка, що початкова колонізація пневмокока в носоглотці є необхідною умовою спричинення інфекції. Пневмококи протягом місяців зберігаються в носоглотці, утворюючи спеціалізовані

структури, що називаються біоплівками. Пневмококи можуть мігрувати на інші анатомічні ділянки з біоплівки, щоб викликати важкі захворювання, пов'язані з біоплівкою, такі як пневмонія та отит. З легень пацієнтів із пневмококовою пневмонією або вушної порожнини хворих на отит, планктонні пневмококи можуть розійтися зі структури біоплівки та вторгнутись у стерильні ділянки, такі як кровотік або мозок, щоб викликати летальну бактеріємію або менінгіт відповідно. Золотистий стафілокок (*Staphylococcus aureus*) викликає різні інфекції у людини, включаючи синдром токсичного шоку, сепсис, бактеріємію, ендокардит, шкірні інфекції, респіраторні тканинні інфекції та інфекції кісткових суглобів. Відомо, що золотистий стафілокок та синьогнійна паличка (*Pseudomonas aeruginosa*) викликають інфекції, пов'язані з біоплівкою, а стійкий до метициліну *S. aureus* (MRSA) став клінічно важливим збудником через його стійкість до антибіотиків та здатність утворювати біоплівки. MRSA та *Pseudomonas aeruginosa* виділено з біоплівки хронічного нагноєння при отиті (CSOM) та хронічних інфекцій середнього вуха, хронічного отиту, холестеатоми, хронічного аденоїдиту, хронічного синуситу та поліпозу носа. Багато видів *Staphylococcal aureus* та *Pseudomonas* виявлено у хворих на хронічний риносинусит (CRS) з посиленням запаленням слизової оболонки, більш вираженим остеїтом, більшою частотою рецидивуючої інфекції та післяопераційними наслідками та прогресуванням після операції. Багато повідомлень припускають, що *Pseudomonas* виробляє метаболіти, які гальмують або видаляють стафілокок, проте при полімікробній колонізації *Pseudomonas aeruginosa* та *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* не повністю пригнічує колонізацію *S. aureus*; скоріше, *S. aureus* використовує численні стратегії захисту для свого виживання в тій же екологічній ніші та зростає, як варіант малих колоній (small-colony variant - SCV). Полімікробна колонізація призводить до конкурентних взаємодій між *S. aureus* та *Pseudomonas aeruginosa*, призводить до появи більш стійкого та антибіотикорезистентного штаму зі зміненою морфологією колонії (а саме SCV) із посиленням

вірулентності. На бактерії впливають фактори навколишнього середовища, в яких вони ростуть, і взаємодії, присутні в багатовидових біоплівках, можна отримати з кількох аспектів соціомікробіології. У людини бактерії викликають різні інфекції, які ростуть в режимі біоплівки. Крім того, у біоплівці з різними видами види приносять користь один одному для виживання та потреб у поживних речовинах (рис. 16).

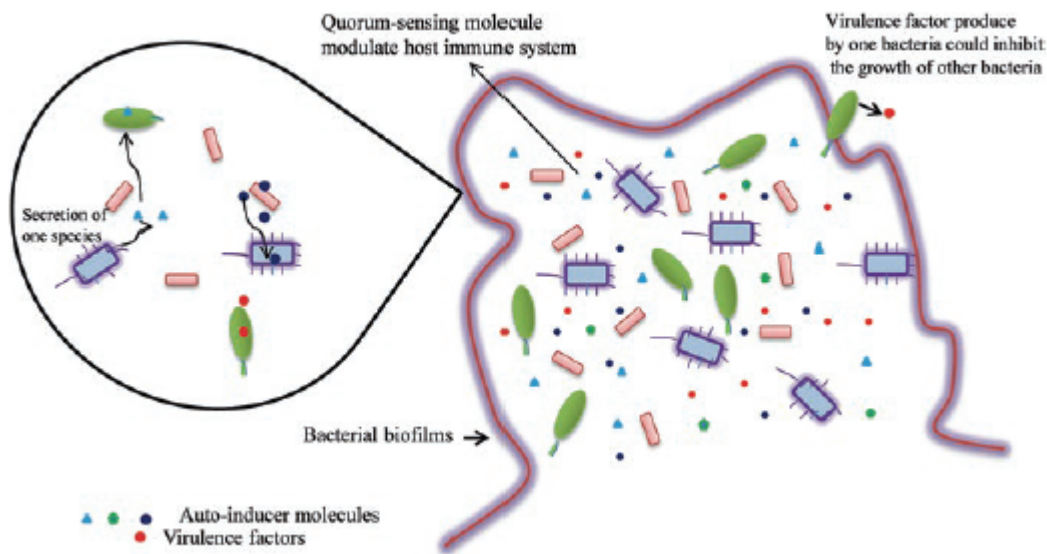


Рис. 16. Схематичне представлення синергізму у багатовидовій біоплівці (Yadav et al., 2017)

Наприклад, при утворенні біоплівки у ротовій порожнині повідомляється, що різні види бактерій у біоплівках впливають один на одного позитивно чи негативно. Перевагою кооперації є спільне агрегування клітин, кон'югація та захист одного або декількох видів від видалення, коли біоплівка піддається впливу антимікробних сполук. Цьому захисту чи перевагам сприяє ряд факторів, включаючи комплементування ферментів та організований просторовий розподіл клітин у біоплівці. Асоціація бактерій у багатовидовій біоплівці є синергетичним результатом спільного утворення біоплівки штамами, які не змогли сформувати біоплівку самотійно. Однак негативна взаємодія у багатовидових біоплівках також спостерігається. Негативна взаємодія відбувається у видів, що продукують антибактеріальні

агенти, такі як бактеріотоксини та зниження рН на одного члена консорціуму. У 2006 р. повідомляли про синергетичний ефект у суміші епіфітних бактерій багатовидових біоплівки *Microbacterium phyllosphaerae*, *Shewanella japonica*, *Dokdonia donghaensis* та *Acinetobacter lwoffii*. Також бактеріальні види отримують переваги пристосування для проживання в консорціумах біоплівки багатовидових видів порівняно з їх біологією як одновидові біоплівки.

Мікробні біоплівки були виявлені на використаних медичних пристроях, включаючи контактні лінзи, протезні клапани серця, сечові катетери, внутрішньовенні катетери, шунти спинномозкової рідини, суглобові протези та ортопедичні пристрої для фіксації, судинний протез, серцеві кардіостимулятори, катетери для перитонеального діалізу, грудні імпланти, внутрішньоматкові прилади, стенти жовчних шляхів, зубні протези і в області карієсу і пародонтиту зубів.

2. Мікробні угруповання, оточені матриксом та адгезовані на небіологічних та біологічних поверхнях

Особливістю біоплівки від інших колонізуючих інфекцій є наявність агрегованих мікроколоній клітин, які прикріплені до поверхні. Важливо, що утворення біоплівки як захисного механізму може мати глибокі наслідки для господаря, оскільки мікроорганізми, які ростуть у цих укладених матриксових агрегатах, мають більшу стійкість до антибіотиків та захисних сил господаря. Модель біоплівки припускає, що мікробні клітини, які ростуть у біоплівках, кластеризовані. Це принципово заперечує припущення про те, що інфекційні агенти розподіляються рівномірно і тому однаково чутливі до імунної відповіді господаря або антибіотикотерапії. Крім того, це може спричинити декілька проблемних клінічних викликів, таких як запалення, резистентність до антибіотиків, рецидиви чи персистенція, метастази або поширення інфекційних емболій.

Однак проблема з оцінкою внеску біоплівки у хворобу людини полягає у відсутності визначених критеріїв, за допомогою яких можна характеризувати індукований біоплівкою патогенез. Парсек і Сінгх пропонують чотири критерії для визначення етіології біоплівкової інфекції: патогенні бактерії поверхнево асоційовані або приєднуються до субстрату; безпосереднє обстеження виявляє бактерії в скупченнях, занурених у матрикс бактеріальних складових або складових хазяїна; інфекція локалізована; і інфекція є стійкою до антибіотикотерапії, незважаючи на чутливість до антибіотиків складових планктонних організмів.

Інфекції, обговорювані в цій лекції, були обрані, оскільки вони ілюструють узгодженість між зростанням біоплівки в навколишньому середовищі та опубліковану літературу, що досліджує клінічні інфекції. Інфекції, пов'язані з пристроями (девайсами), були першими клінічними інфекціями, які були ідентифіковані як такі, що мають біоплівкову етіологію, і показали, що утворення біоплівки може бути полегшене запальною реакцією господаря, оскільки запальні молекули господаря полегшують адгезію до поверхні пристрою. Бактеріальний ендокардит показує, як мікроорганізми на шкірі або в ротовій порожнині, які швидко проникають у кров, можуть колонізувати ненормальні (хворі) або імплантовані клапани або змінені поверхні ендотелію в серці (рис. 17). Поверхнєве прикріплення всередині розростань (vegetations) відбувається в результаті взаємодії між мікробними клітинами та продуктами господаря. Муковісцидоз (Cystic fibrosis - CF) ілюструє, як умовно-патогенний збудник *P. aeruginosa* експлуатує унікальне середовище легенів CF та реагує на екологічні ознаки, змінюючи їх фенотип.

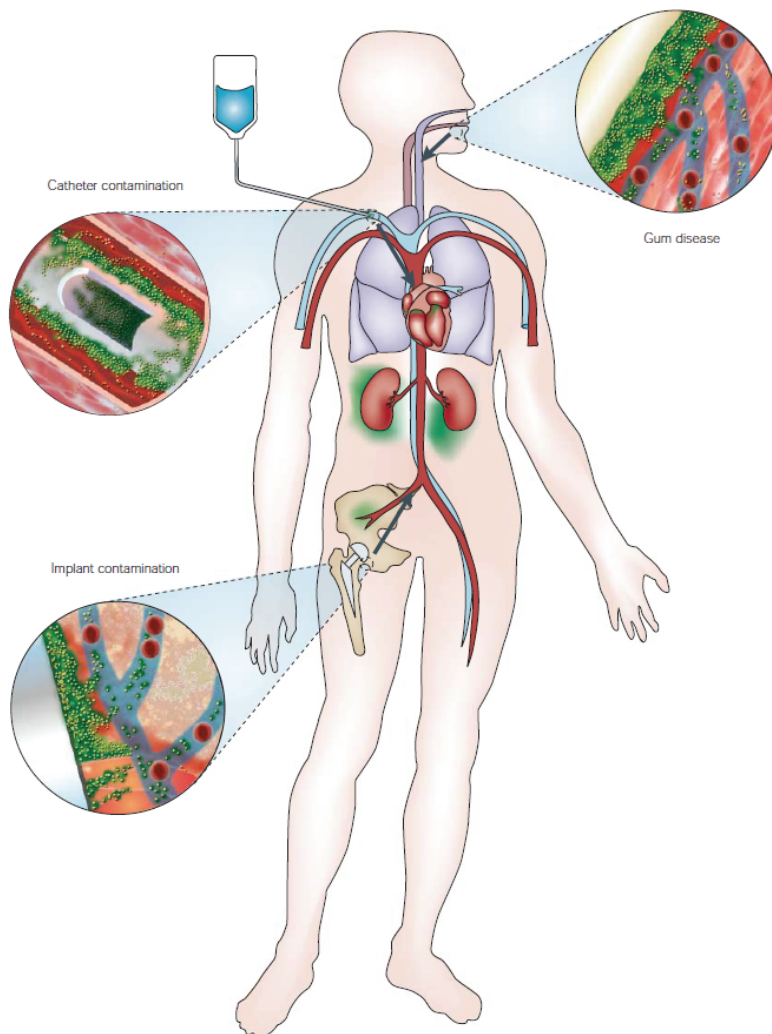


Рис. 17. Схематично показано три приклади можливих точок потрапляння в організм інфекційних біоплівок; катетер, заміна кульшового суглобу та пародонтоз. Стрілки показують, як біоплівка (зелений колір) може поширюватися по всьому тілу, або окремими клітинами, або грудками захищених емболій, використовуючи приклад нативного або штучного ендокардиту серцевого клапана як загального центрального місця для емболізації. Спорадичне відшарування може призвести до циклів бактеріємії. (Hall-Stoodley et al., 2004)

3. Інфекції, пов'язані з пристроями

Внутрішньовенні катетери, протезні серцеві клапани, суглобові протези, катетери для перитонеального діалізу, серцеві кардіостимулятори, шунти спинномозкової рідини та ендотрахеальні трубки рятують мільйони життів,

але всі вони мають внутрішній ризик поверхнево-асоційованих інфекцій. Біоплівки, пов'язані з медичними приладами, вперше були виявлені на початку 1980-х років, коли електронна мікроскопія виявила бактерії, осаджені на поверхні внутрішньоорганізових пристроїв, таких як внутрішньовенні катетери та серцеві кардіостимулятори.

Мікроорганізми, які найчастіше асоціюються з медичними приладами, - це стафілококи (зокрема, *S. epidermidis* та *S. aureus*), а потім *P. aeruginosa* та безліч інших бактерій навколишнього середовища, які опортуністично (умовно-інфекційно) заражають господаря, який піддається інвазивному медичному втручанню, хіміотерапії або має раніше існуючий хворобливий стан. Утворення біоплівки на медичних імплантатах навіть призвело до характеристики нового інфекційного захворювання під назвою **хронічна полімерно-асоційована інфекція**. Стафілококи зазвичай колонізують шкіру і часто зустрічаються в ранах та імплантатах. Цікаво, що *S. epidermidis* не вважався умовно-патогенним збудником до широкого використання медичних засобів. Утворення біоплівки, таким чином, можна розглядати як фактор вірулентності - бактеріальна стратегія, яка сприяє її здатності викликати інфекцію.

Найбільш помітною характеристикою прикріплених стафілококів, що колонізують медичні імплантати, є велика кількість EPS (також відомий як глікокалікс або «слиз»), який охоплює і захищає клітини від захисних сил та лікування антибіотиками (рис. 18с).

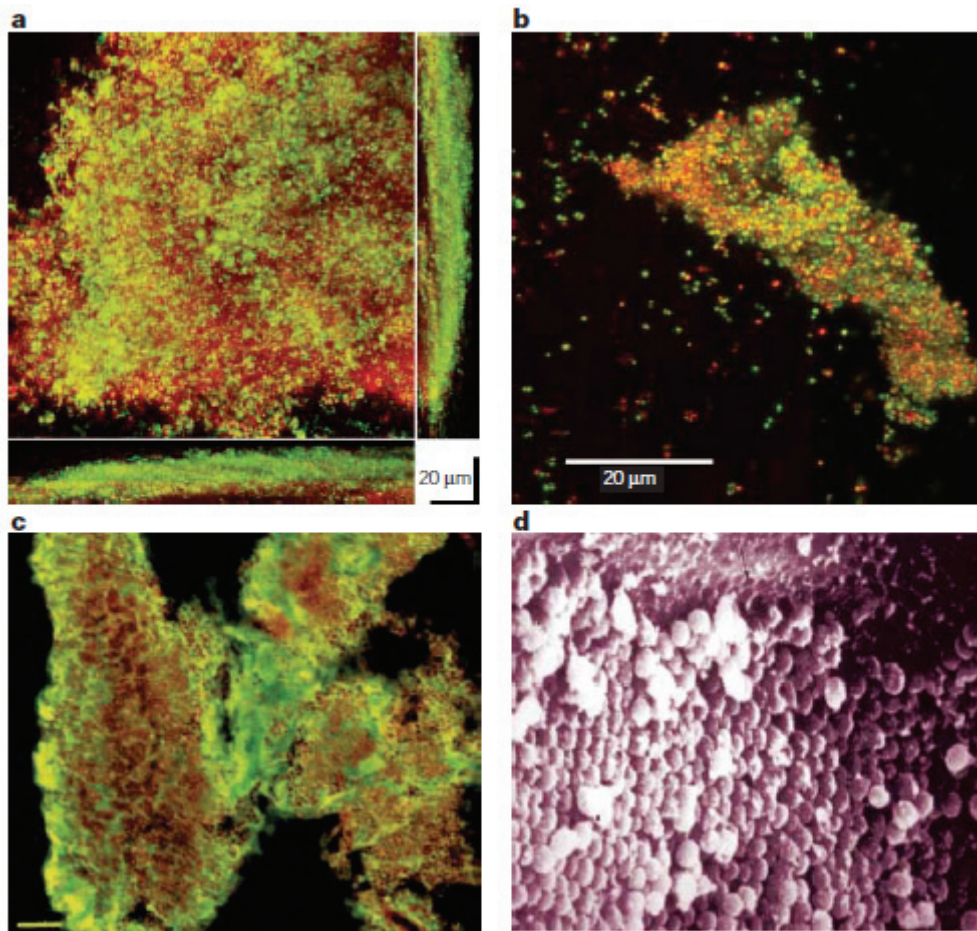


Рис. 18. Біоплівки золотистого стафілокока (*Staphylococcus aureus*). **a** - конфокальне лазерне мікроскопічне зображення біоплівки, що росте в проточній комірці зі швидкістю потоку 1 мл хв⁻¹. Квадратна панель - вигляд у плані, а бічні панелі - вертикальний і горизонтальний перерізи відповідно. **b** - відокремлені клітини з біоплівки, показані у частині (**a**), зняті на полікарбонатному фільтрі. Відокремлена фракція складалася з одиничних клітин і великих скупчень, що містять тисячі клітин. Біоплівки в частинах **a** і **b** фарбували набором Molecular Probes Live/Dead™, так що живі клітини виявлялися зеленими, а мертві клітини - червоними. **c** - біоплівка, вирощена в шкірному зрізі нейтропенічної миші. Позаклітинна полімерна речовина (EPS) біоплівки фарбувалась FITC-ConA (зелений) та сафранін (червоний). **d** - скануюча електронна мікрофотографія біоплівки *S. aureus*, що розвинулася на дистальному кінчику серцевого кардіостимулятора у пацієнта (Hall-Stoodley et al., 2004)

Формування біоплівки характеризується двома основними стадіями стафілококів: адгезія бактерій до твердої поверхні з подальшим залежним від росту нагромадженням клітин, що генерує кілька шарів клітинних скупчень. У *S. epidermidis* утворення декількох шарів клітин було віднесено спеціально до механізмів адгезії між клітинами і клітинами, які асоціюються з β -1,6-з'язаним полісахаридом глікозаміноглікану, відомим як полісахаридний міжклітинний адгезин (polysaccharide intercellular adhesin - PIA). Протеїни, які беруть участь у синтезі матричних полісахаридів регулюються локусом гена *ica* у *S. epidermidis*, локусі, який зберігається у *S. epidermidis*, *S. aureus* та інших філогенетично пов'язаних стафілококах. Мутації в цьому локусі порушують утворення біоплівки, насамперед, порушуючи агрегацію та акумуляцію. Однак штами з PIA та *ica* все ж можуть не утворювати біоплівки, якщо вони дефектні за початковим прикріпленням. Багато джерел про *S. epidermidis* та *S. aureus* показують, що один лише ступінь адгезії є багатофакторним і залежить як від фізико-хімічних властивостей біомедичного полімерного матеріалу, так і від характеру поверхні бактеріальних клітин. Зокрема, гідрофобність та електростатичний заряд матеріалу впливатимуть на взаємодію між полімером та поверхнею бактеріальної клітини.

Поверхневі білки бактерій суттєво сприяють адгезії, і кілька ключових білків були визначені як важливі для формування стафілокової біоплівки. Прихильність *S. epidermidis* до полістиролу опосередковується AtlE, головним автолізином. Мутант AtlE, дефектний за утворенням біоплівки на полістиролі, але не на скляних поверхнях, також є менш гідрофобним та утворює великі клітинні кластери порівняно з диким типом. Цей білок також опосередковує зв'язування з вітронектином, компонентом позаклітинного матриксу господаря. У *S. aureus* мутанти, яким не вистачає D-аланіну в теїхоєвій кислоті (*dltA*), виявили зміну поверхневого заряду, що погіршило їх здатність прикріплюватися до полістиролу чи скла, хоча виробництво PIA було незмінним. Етап адгезії при цьому дефекті при утворенні біоплівки був

відновлений додаванням Mg^{2+} . Крім того, утворення біоплівки *S. epidermidis* посилювалося Mg^{2+} та інгібувалося EDTA, що ілюструє роль факторів навколишнього середовища у розвитку біоплівки. Інші поверхневі білки, включаючи біоплівка-асоційований білок (biofilm-associated protein - Bap) та білок, пов'язаний з накопиченням (accumulation-associated protein - AAP), важливі для формування біоплівки. Мутації в Bap впливають на формування біоплівки та патогенез у моделі зараження мишей чужорідним тілом.

Нарешті, господар може значною мірою сприяти адгезії при інфекціях, пов'язаних із пристроями, особливо зі стафілококами. Кілька специфічних рецепторів на клітинній поверхні, званих адгезинами, зв'язуються з молекулами господаря (наприклад, білкові/глікопротеїнові компоненти в плазмі або тромбоцити або компоненти позаклітинного матриксу господаря). Багато з цих білків належать до родини мікробних поверхневих компонентів, які розпізнають адгезивні матриксові молекули (adhesive matrix molecules - MSCRAMM), які опосередковують адгезію до різних типів клітин господаря, а також до полімерних поверхонь, вкритих білками плазми господаря. Кілька бактерій мають адгезини до фібронектину, який є білком господаря, і часто асоціюється з прикріпленням бактерій до поверхонь, за яким слідує фібриноген/фібрин, колаген, ламінін та вітронектин. Фібронектин також бере участь в адгезії, з'єднуючи асоціації з фібрином, колагеном, гепарином та іншими глікозаміногліканами поверхні клітини господаря.

Виявлено два фібронектинові адгезини у *S. aureus* - FnBPA та FnBPB. До родини MSCRAMM також належать колаген-зв'язуючий білок (Cna) і два фібриноген-зв'язуючі білки, відомі як фактори злипання A і B (ClfA і ClfB). Також показано, що ClfA є важливим при зв'язуванні *S. aureus* при адгезії до поліетиленових та полівінілових поверхонь. Так, певні бактерії, здається, мають здатність експлуатувати білки господаря, що виробляються при загоєнні ран або запаленні, що вказує на те, що бактеріальні адгезини забезпечують механізм, завдяки якому колонізація господаря може відбуватися на життєздатних, але пошкоджених тканинах та на пристроях в

умовах, де є ці запальні молекули господаря, і вони можуть характеризуватися біоплівкоподібними інфекціями.

Таблиця 3

Біоплівки на медичних пристроях (Dufour et al., 2012)

Медичний пристрій	Принципові мікроорганізми
Контактні лінзи	<i>P. aeruginosa</i> , грам-позитивні коки
Зубний протез	<i>Candida</i> spp.
Сечовий катетер	<i>E. coli</i> , <i>Candida</i> spp., <i>E. faecalis</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Катетер центральної вени	Коагулазо-негативні стафілококи, <i>S. aureus</i>
Механічний клапан серця	Коагулазо-негативні стафілококи, <i>S. aureus</i>
Штучний протез стегна	Коагулазо-негативні стафілококи, <i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus</i> spp.
Голосовий протез	<i>C. albicans</i> , коагулазо-негативні стафілококи
Ендотрахеїтні трубки	Грам-негативні види кишківника

4. Інфекційний ендокардит.

Матрикс біоплівки найчастіше пов'язують з бактеріальним походженням. Хоча це стосується біоплівки, вирощеної на абіотичній поверхні в лабораторії, біоплівкові інфекції в організмі, для яких характерні прикріплені бактерії на тканині, можуть також включати клітини та молекули господаря як частину поверхнево-асоційованої інфекції. Цікавий приклад - бактеріальний ендокардит.

Стрептококи є етіологічними агентами у більш ніж половині випадків інфекційного ендокардиту, причому стафілококи становлять ще чверть випадків. Багато штамів є звичайними комменсалами шкіри та ротової порожнини. Клінічно, про ураження бактеріальним ендокардитом говорять, коли розростання (vegetations) містять агрегати бактеріальних клітин, тромбоцитів і фібрину, які прилягають до пошкодженого епітелію серцевих клапанів.

Ендокардит асоціюється з вродженими вадами серця, протезними клапанами серця та судинними трансплантатами і, швидше за все, викликаний згустками тромбоцитів і фібрину, які накопичуються там, де турбулентний потік посилюється аномальною тканиною, наявними захворюваннями серця або судинним катетером. Пошкоджений ендотелій викриває переважну основну мембрану, яка складається з колагенів, ламініну, вітронектину і фібронектину, тим самим забезпечуючи субстрат для приєднання бактерій (початкова стадія патогенезу ендокардиту). Крім того, після ендотеліального пошкодження та турбулентного кровотоку запальні процеси стимулюють систему згортання, що призводить до відкладення фібрину та утворення нерозчинного згустку фібрину та тромбоцитів.

Було показано, що *Streptococcus sanguis* прилипли до поверхні стерильного розростання (вегетації) протягом 30 хвилин після ін'єкції у катетеризованих кроликів і почали розмножуватися. Стрептококові мікроколонії розвивалися в тромбі і були оточені нитками фібринових «капсул», які, здавалося, затримували взаємодію лейкоцитів. Коли розростання (вегетації) були досліджені через чотири тижні після зараження, життєздатні стрептококи були присутніми в результаті кальцифікованого ураження, оточеного фібробластами, що лежать в основі ендотелію. Метаболічна активність організмів у вегетації здавалася зниженою порівняно з бактеріями на периферії - що відповідає утворенню біоплівки у вегетації. З часом вегетації зростали шляхом додавання шарів фібрину і тромбоцитів, між ними «сендвіч» бактеріальних колоній, що свідчить про цикли тромбозу та подальшу бактеріальну колонізацію шарів.

Однак, використовуючи модель кроликів, Хьок і Сенд показали, що колонізація бактерій відбулася навіть тоді, коли розростанню запобігали антикоагулянтним лікуванням, що свідчило про те, що наявність згустка достатня, але не потрібна для ендокардиту.

Цікаво, що перебіг захворювання був надзвичайно іншим. У кроликів, яких лікували антикоагулянтами, хвороба виявилася більш бурхливою, і тварини мали більш високу бактеріємію та нижчий рівень виживання. Навпаки, тварини без антикоагулянтного лікування виявляли підгостру хронічну інфекцію, яка була більш чутливою до антибіотикотерапії. Ультраструктура одержаних розростань складалася з великих бактеріальних колоній, густо упакованих фібрином і тромбоцитами і оточених фібриною сіткою. Автори припускали, що бактерії в межах розростання були метаболічно менш активними. Подібні структури спостерігалися в розростаннях людини. Отже, існують відповідні місцеві умови для колонізації основних тканин господаря бактеріями, що ростуть як мікроколонії, і патогенез ендокардиту як захворювання біоплівки узгоджується з бактеріями, що ростуть у біоплівках. Однак, ці звіти також свідчать про наявність тромбоцитів та фібрину внаслідок запальної відповіді господаря і вказують на характеристики біоплівки, які спостерігаються при ендокардиті - стійкій повторюваній інфекції, більш стійкій до лікування антибіотиками.

У кількох дослідженнях було вивчено здатність бактерій прилипати до тканинних поверхонь та встановлено локалізовану ділянку інфекції шляхом специфічних взаємодій між бактеріальними адгезинами та тканиною господаря. Рамірес-Ронда досліджував види стрептококів на їх здатність прикріплюватися до серцевих клапанів і виявив, що штами, які продукують EPS, що складаються з глюканів і декстранів, краще прилипають до пошкоджених серцевих клапанів. Зовсім нещодавно у *Streptococcus parasanguis*, колонізатора поверхні зуба людини і опортуніста, який виявляється як в ендокардиті нативного, так і протезованого клапана серця, ген, що кодує перитрихіальні фімбрії, *fap1*, асоціюється з утворенням біоплівки на пластику. Мутант *fap1* виявив обмежену адгезивність, але в основному не зміг агрегувати та утворювати мікроколонії.

Фей та ін. показали кореляцію між гемаглютинацією та утворенням біоплівки у *S. epidermidis*, що вказувало на зв'язок між PIA, міжклітинною адгезією та адгезією до еритроцитів. У моделі ендокардиту кролика виявлено, що дефектні штами PIA є менш вірулентними. Аналогічно, мутанти *S. aureus*, дефектні за приєднанням до тромбоцитів, корелюють зі зниженою вірулентністю у кролячій моделі ендокардиту, який характеризується меншою кількістю бактерій всередині розростання та зниженою емболізацією.

Мутант *S. aureus*, дефектний за зв'язуванням фібронектину, також показав зменшене зв'язування з пошкодженими клапанами серця. Фактор скупчення ClfA, фібриноген-зв'язуючий білок *S. aureus*, який також опосередковує адгезію *S. aureus* до пластику, схоже, має певну роль у моделі ендокардиту щура. Мутантні та комплементарні дослідження показали, що *clfA* важливий як при прилипанні до поверхонь, так і при вірулентності; однак ендокардит все-таки зустрічався з більш великим інокулятом мутантів *clfA*. Однак, коли ClfA та FnbA (інший адгезин) спільно експресувались у невірулентному організмі - *Lactococcus lactis* - ендокардит у моделі щурів був порівняним із тим, який спостерігали для патогенних видів. Також показано, що ClfA зв'язує *S. aureus* з тромбоцитами людини безпосередньо нехарактерним тромбоцитарним мембранним рецептором. Ці специфічні взаємодії показують, що, як на прикладі біоплівки при інфекціях, пов'язаних з пристроєм, розвиток біоплівки - це багатоступеневий процес початкового приєднання між специфічними бактеріальними адгезинами та молекулами господаря з подальшим міжклітинним накопиченням бактеріальних клітин та компонентів господарів, що генерують багатоклітинні шари клітин біоплівки розростання.

Бактеріальний ендокардит може також ілюструвати, як бурхливий потік сприяє утворенню розростань. Хоча традиційно вважається, що турбулентність викликає утворення згустків і пошкодження тканин, можливо, згустки клітин біоплівки реагують на бурхливий потік серцевого

середовища, виробляючи більше EPS. Велике розростання є особливо пухким і збільшує ризик емболізації (відшарування через розсипання), що може спричинити інфаркти та септичні абсцеси в інших тканинах.

Важливо, що антибіотикотерапія при лікуванні ендокардиту також сумісна з роллю біоплівки. У дослідженнях *in vivo* на моделі кролика з кишковою паличкою *E. coli* як інфекційним агентом необхідні стійкі концентрації антибіотиків, які в 220 разів перевищували мінімальні бактерицидні концентрації в сироватці крові. Навіть коли розростання оброблялися антибіотиками *ex vivo*, антибактеріальна дія в межах розростання вимагала 150-кратної мінімальної бактерицидної концентрації.

5. Муковісцидоз, пневмонія.

Муковісцидоз (МВ) (cystic fibrosis – CF) - це аутосомно-рецесивне захворювання, яке викликається мутаціями гена трансмембранного регулятора провідності кістозного фіброзу (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator - CFTR), що призводить до дисфункціональної секреції та абсорбції електролітів. Незважаючи на наявність безлічі складних фізіологічних дисфункцій, первинним місцем захворюваності є дихальна система. Зменшена гідратація поверхні дихальних шляхів, що робить дихальний слиз більш в'язким і погіршує мукоциліарний кліренс, призводить до основної клінічної особливості муковісцидозу - хронічної ендобронхіальної бактеріальної інфекції та запалення дихальних шляхів - що призводить до обструкції дихальних шляхів, прогресуючого руйнування епітелію дихальних шляхів і, зрештою, дихальної недостатності.

Легенева колонізація нижніх дихальних шляхів хворих на муковісцидоз починається в грудному та ранньому дитинстві, найчастіше *S. aureus* та *Haemophilus influenzae*. Однак у підлітковому віці та ранньому віці більшість хворих на муковісцидоз перебувають у стані колонізації *P. aeruginosa*. Перехід від колонізації іншими бактеріями до хронічної інфекції *P. aeruginosa*, здається, є результатом особливого оточення легені

муковісцидозом, що включає рецептори на епітеліальних клітинах, що сприяють псевдомонадальному прикріпленню на додаток до порушення мукоциліарного кліренсу.

Існують дві важливі особливості щодо колонізації муковісцидозних легенів *P. aeruginosa*. По-перше, *P. aeruginosa* росте в біоплівках в межах муковісцидозних легень. Мікроскопічний аналіз мокротиння у хворих на муковісцидоз виявляв, що *P. aeruginosa* утворює біоплівкоподібні структури, що складаються з скупчень бактерій, оточених щільним матриксом. Аналогічна структурна морфологія спостерігалася у зразках муковісцидозних легень.

Крім того, сигнали кворум сенсингового (QS) гомосеринового лактону (HSL), виміряні в муковісцидозному мокротинні, відповідали профілю QS *P. aeruginosa*, вирощеної в біоплівках, а не профілю з планктонно вирощених *P. aeruginosa*.

Другою характерною особливістю колонізації *P. aeruginosa* CF легень є вибір мукоїдних варіантів *P. aeruginosa*, які характеризуються надвиробництвом екзополісахариду альгінату та стійкістю щодо антибіотикотерапії. Спочатку *P. aeruginosa*, виділена з легенів хворих на муковісцидоз, немуккоїдна. Однак мукоїдні ізоляти зазвичай збігаються зі стійкою хронічною інфекцією. Цікаво, що мукоїдні варіанти відсутні серед екологічних ізолятів *P. aeruginosa*, хоча немуккоїдні штами, мабуть, мають генотип мукоїдності. Дослідження показують, що запальна реакція господаря сприяє мукоїдній конверсії.

Меті та ін. вирощували *P. aeruginosa* в біоплівках і піддавали ці біоплівки впливу екзогенного перекису водню (H₂O₂) або активованих людських поліморфоядерних нейтрофілів (polymorphoneutrophils - PMN) *in vitro*. Вони помітили, що конверсія мукоїдів узгоджується з видаленням у *tusA* відкритої рамки зчитування; така ж делеція спостерігалася також у 25 % мукоїдних ізолятів у хворих на МВ. Тому *P. aeruginosa* реагує на мікросередовище МВ легені, модифікуючи свій фенотип. Специфічний

механізм колонізації *P. aeruginosa* МВ легені не відомий. Одна з гіпотез передбачає, що запалення дихальних шляхів призводить до приєднання *P. aeruginosa* до епітелію дентурованих дихальних шляхів. В одному дослідженні було встановлено, що МВ бронхіальні секретії володіють протеолітичною активністю щодо фібронектину, що асоціюється із слизовою оболонкою дихальних шляхів, що забезпечує механізм, який може сприяти колонізації *P. aeruginosa*, а не колонізації *S. aureus*. Інше дослідження показало, що зв'язування *P. aeruginosa* з первинними культурами поліпа носа обумовлено модифікацією клітин епітелію бактеріальними екзопродуктами, які піддають впливу азіалогангліозид-зв'язуючих ділянок, які полегшують псевдомонадальне прилипання.

Використовуючи аналогічну модель *ex vivo*, було виявлено, що *P. aeruginosa* приєднується до недиференційованих епітеліальних клітин, які піддаються відновленню, зокрема між $\alpha_v\beta_1$ інтегринами та фібронектиновим RGD (Arg-Gly-Asp) рецептором на епітеліальних клітинах та зовнішнім мембранним білком *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* має кілька адгезинів і зв'язується з широким спектром рецепторів та типів клітин у дихальних шляхах.

Молекула QS 3-оксо-C12-HSL, що продукується *P. aeruginosa*, також має модуляторну дію на дихальний епітелій. Культивовані епітеліальні клітини бронхів продукували інтерлейкін (IL)-8, запальний цитокін, у відповідь на *P. aeruginosa*, і пізніше було показано, що цей ефект обумовлений 3-оксо-C12-HSL, а не іншими сигнальними молекулами.

Додатково 3-оксо-C12-HSL індукував експресію інших запальних цитокінів та хемокінів, таких як IL-1, IL-6 та інтерферон (INF)- γ , та декількох макрофагальних запальних білків. 3-оксо-C12-HSL також індукував циклооксигеназу 2 (COX-2) та простагландин E2 (PGE2) у фібробластах легенів людини.

Ці результати свідчать про те, що наявність *P. aeruginosa* викликає вивільнення медіаторів запалення та інфільтрації лейкоцитів у легеневу

тканину, що не пов'язано з кліренсом збудника, а швидше із тривалим запаленням та патологією легень.

Інший гіпотетичний механізм колонізації бактерій при МВ стосується слизового шару. У цій моделі підвищена в'язкість слизової оболонки МВ дихальних шляхів виконує роль матричного каркасу і важлива при зниженому кліренсі. Останнім часом Worlitzsch et al. вивчали хворих на МВ із хронічним захворюванням легень безпосередньо за допомогою електронної мікроскопії та тканинних експлантів, і виявили, що *P. aeruginosa* присутня у муко-гнійних гіпоксичних «макроколоніях» діаметром 100 мкм у просвіті дихальних шляхів, а не прикріплена до епітелію. Як експерименти *in vivo*, так і *in vitro* з використанням мікроелектродів показали, що в цих мукоїдних макроколоніях кисень виснажується. Крім того, рухлива *P. aeruginosa* проникала в гіпоксичні слизові шари і реагувала на анаеробні умови, виробляючи більше альгінату.

Ці результати стверджують, що локальне середовище в МВ легені, яке характеризується товстими слизовими бляшками та збідненим O_2 в дихальному епітелії, призводить до колонізації *P. aeruginosa*, що ще більше посилює патологію МВ пневмонії.

Уооп та ін. також показали, що анаеробний ріст може бути важливою особливістю росту *P. aeruginosa* в біоплівках у хворих на МВ. *P. aeruginosa* утворює потужні біоплівки в анаеробних умовах, що призводить до накопичення токсичних метаболітів нітрогену.

Протеомічний аналіз виявив зовнішньомембранний порин OprF, концентрація якого в анаеробній культурі зросла в 40 разів. OprF виявляли також у виділеннях із МВ легень, а циркулюючі антитіла проти OprF були виявлені у хронічно інфікованих хворих на МВ. Це дослідження свідчить про механізм, який пояснює декілька клінічних аспектів пневмонії МВ *P. aeruginosa*: неефективність фагоцитів проти *P. aeruginosa*, мукоїдний фенотип *P. aeruginosa* та стійкість біоплівки *P. aeruginosa* до тобраміцину.

Цікаво, що стійкість до антибіотиків *P. aeruginosa* та утворення біоплівки викликаються одночасно. Коли резистентність до антибіотиків вивчалася у клінічного ізолята *P. aeruginosa*, спостерігали інший фенотип, який пов'язаний як з посиленою здатністю утворювати біоплівки, так і з підвищеною антибіотикорезистентністю. Фенотип спостерігався як *in vitro*, так і у хворих на МВ, які проходили антибіотикотерапію, але не у нелікованих пацієнтів. Експериментально варіанти стійкості також виникають частіше у відповідь на екологічні сигнали, такі як зміни концентрації солі.

Було припущено, що стійкі до антибіотиків фенотипічні варіанти *P. aeruginosa*, що спостерігаються при МВ-інфекціях, були або відібрані всередині біоплівок при сублетальній антибіотикотерапії, або за специфічного середовища МВ легені (характеризується осмотичним та окиснювальним стресом). Це дослідження показало, що обидва відповідають за стійкий фенотип.

У складному середовищі МВ легені малоімовірно, що існує ексклюзивний механізм патології, і тому запальна реакція господаря, безсумнівно, викликає зміни в місцевому мікросередовищі, на які реагує *P. aeruginosa*. Зрозуміло, що при МВ пневмонії складна взаємодія між бактеріями та локальними сигналами середовища господаря внаслідок запальної реакції сприяє комплексній патології цього захворювання.

Лекція 8

Контроль біоплівок

План

1. Фактори, що впливають на біоплівкову сприйнятливість.
2. Антимікробна толерантність у біоплівках.
3. Підходи до інгібування утворення біоплівок.

Використані літературні джерела:

1. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S.J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013. 3:a010306. P. 1-23. URL: www.perspectivesinmedicine.org.
2. Stewart Ph.S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. In: *Microbial biofilms* / Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. [eds]. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 269-285.
3. Zhao X., Zhao F., Wang J., Zhong N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Adv.*, 2017. Vol. 7. P. 36670-36683. doi: 10.1039/C7RA02497E

1. Фактори, що впливають на біоплівкову сприйнятливість.

Приклади зниженої біоплівкової сприйнятливості

Толерантність до антимікробних засобів є загальною рисою формування мікробної біоплівки. У таблиці 4 представлено декілька прикладів толерантності біоплівки до біоцидів та антисептиків, а в таблиці 5 наведено деякі приклади толерантності до антибіотиків у біоплівках. Жоден з цих переліків не є вичерпним, але ці два набори даних можна проаналізувати, щоб отримати уявлення про фактори, що впливають на толерантність біоплівки. Приклади були відібрані, щоб проілюструвати широкий спектр мікробних видів, середовищ росту та антимікробних хімікатів, щодо яких біоплівка знижувала сприйнятливість. Короткий список у таблиці 4 охоплює дослідження, призначені для моделі біоплівки в зубних відкладеннях, гарячих ваннах, на паперових фабриках, питній воді, побутовій каналізації, сечових катетерах, харчових комбінатах, системах охолодження води та лікарнях. У цих прикладах використовується цілий ряд біоплівок окремих та змішаних видів та різноманітні біоцидні сполуки, включаючи галогени, фенольні сполуки, сполуки четвертинного амонію, альдегіди, ефірну олію рослин та пероксиди. Дослідження, викладені в таблиці 5, охоплюють

19 антибіотиків та 9 організмів, які включають аеробні бактерії, суворі анаероби та мікроскопічний гриб.

Знижена сприйнятливість біоплівки кількісно визначається в таблицях 4 і 5 коефіцієнтом толерантності (tolerance factor), TF, який визначається як:

$$TF = (LR_P * t_B * C_B / LR_B * t_P * C_P)$$

де C_P і C_B - концентрація дози біоциду для планктону та біоплівки відповідно, t_P та t_B - тривалість впливу дози біоциду для планктону та біоплівки відповідно, а LR_P та LR_B - вимірний log зменшення популяцій планктону та біоплівки відповідно.

TF порівнює швидкість загибелі в планктонному та біоплівковому станах. Наприклад, значення $TF = 10$ означає, що знищення біоплівки відбувається в 10 разів повільніше, ніж у планктонному стані. Швидкий огляд таблиць 4 і 5 виявляє, що коефіцієнт толерантності коливається в широких межах, від значення 1,0 (взагалі немає різниці між суспендованою та сесильною сприйнятливістю) до значення більше 1000.

Таблиця 4

Коефіцієнт толерантності за впливу різних антимікробних сполук
(Stewart et al., 2015)

Організми	Агент	Молекулярна вага (г моль ⁻¹)	Субстрат	(log ₁₀ КУО см ⁻²)X ₀	TF
1	2	3	4	5	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Гіпохлорит, рН 11	52,5	Нержавіюча сталь	9,9	767
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Хлоросульфамат	131	Нержавіюча сталь		272

Продовження табл. 4

1	2	3	4	5	6
<i>P. aeruginosa</i>	Пероцтова кислота	76,1	Полістирен	8	6,7
<i>Aggregatibacter actinomycetocoma mitans</i>	Хлоргексидин	506	Нітрат целюлози	7,48	2,7
	Цетилпіридиніум хлорид	340	Нітрат целюлози		3,4
<i>Legionella</i> у змішаних видах	Глутаральдегід	100	Червоний каучук	6,1	2,0
	Бromo- нітропропан- діол	200	Червоний каучук		1,0
<i>P. aeruginosa</i>	Гідроген пероксид	34	Поліестер	6,65	2,8
Змішана питна вода	Діоксид хлору	67,5	Скло	5,3	1,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Бензалконіум хлорид	360	Скло	7,9	52
<i>P. aeruginosa</i>	Бром	96,9	Полікарбонат	5,3	1,4
<i>P. aeruginosa</i>	Бензилхлоро- фенол	195	Скло	8,5	7,4
<i>S. aureus</i>	Фенілфенол		Скло		4,2

Продовження табл. 4

1	2	3	4	5	6
<i>Salmonella typhimurium</i>	Трідосан	290	Плівка	7,2	20
<i>Citrobacter diversus</i>	Повідон-йод	365	Силікон	8,8	11
<i>Listeria monocytogenes</i>	Йод	254	Нержавіюча сталь	5,2	1,7
Суміш білої води паперової фабрики	Тимол	150	Нержавіюча сталь	7,7	1,1
Ротова суміш	Хлоргексидин	506	Гідрокси-апатит	9	13,5

Таблиця 5

Обрані приклади толерантності бактерій або грибів у біоплівках щодо антибіотиків (Stewart et al., 2015)

Організми	Агент	Молекулярна вага (г моль ⁻¹)	Субстрат	(log ₁₀ КУО см ⁻²)X ₀	TF
1	2	3	4	5	6
<i>Propionibacterium acnes</i>	Ріфампін	823	Скло		4
	Даптоміцин	1620	Скло		16
	Ванкоміцин	1468	Скло		16
	Пеніцилін G	334	Скло		2

1	2	3	4	5	6
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	Ципрофлоксацин	330	Полістирен		2048
	Моксіфлоксацин	401	Полістирен		512
	Ванкоміцин	1468	Полістирен		512
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Гентаміцин	478			4
	Тобраміцин	468			4
	Ципрофлоксацин	330			8
	Офлоксацин	361			4
<i>P. aeruginosa</i>	Тобраміцин	468	Нержавіюча сталь	9,6	4,4
	Ципрофлоксацин	330	Нержавіюча сталь		3,5
<i>K. pneumoniae</i>	Ципрофлоксацин	330	Полікарбонат	10,3	90
	Ампіцилін	371	Полікарбонат	10,2	14
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ципрофлоксацин	330	Нержавіюча сталь	8,9	14
	Ріфампін	823	Нержавіюча сталь		7
<i>P. aeruginosa</i>	Тобраміцин	468	Полікарбонат	10,4	265
	Ципрофлоксацин	330	Полікарбонат		104
<i>P. aeruginosa</i>	Тобраміцин	468	Силікон	8,3	208
				7,4	1,5
<i>S. aureus</i>	Нізін	3354	Полістирен	7,5	5,3
	Ванкоміцин	1468	Полістирен	7,8	55

1	2	3	4	5	6
<i>S. epidermidis</i>	Левофлоксацин	350	Скло	10,3	12
	Ванкоміцин	1468	Скло		157
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Амоксицилін	365	Ацетат целюлози		3,3
	Доксіцилін	444	Ацетат целюлози		21
	Метронідазол	171	Ацетат целюлози		4,2
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	Цефазолін	456	Полістирен		256
	Ріфампін	823	Полістирен		4
	Даптоміцин	1620	Полістирен		64
	Моксіфлоксацин	401	Полістирен		4
	Нафіцилін	414	Полістирен		16
<i>Candida albicans</i>	Амфотеріцин В	923	Полівініл- хлорид		3,4
<i>C. albicans</i>	Флуконазол	306	Полівініл- хлорид		4,4

Фактори впливу на біоплівкову сприйнятливість

Однією з проблем розуміння толерантності біоплівки є велика кількість факторів, які, ймовірно, впливають на сприйнятливість конкретної біоплівки. Деякі фактори, які можуть бути важливими, - це хімія протимікробних речовин, матеріал субстрату, ареальна клітинна щільність або товщина, вік біоплівки, видова належність мікробів та склад середовища.

Антимікробна хімія

Коли коефіцієнти толерантності для біоцидів, наведені в таблиці 4, регресують у порівнянні з молекулярною масою антимікробного агента,

жодної кореляції очевидно не виявляється (рис. 19А; $R^2 = 0,0007$). Дійсно, це значення R^2 свідчить про те, що жодна із значних змін TF не може бути пов'язана з розміром самої антимікробної молекули. Подібний аналіз факторів толерантності до антибіотиків (табл. 5) також не виявляє кореляції (рис. 19В; $R^2 = 0,012$). У літературі немає звітів, що свідчать про те, що розмір антимікробних препаратів є предиктором ефективності щодо біоплівки.

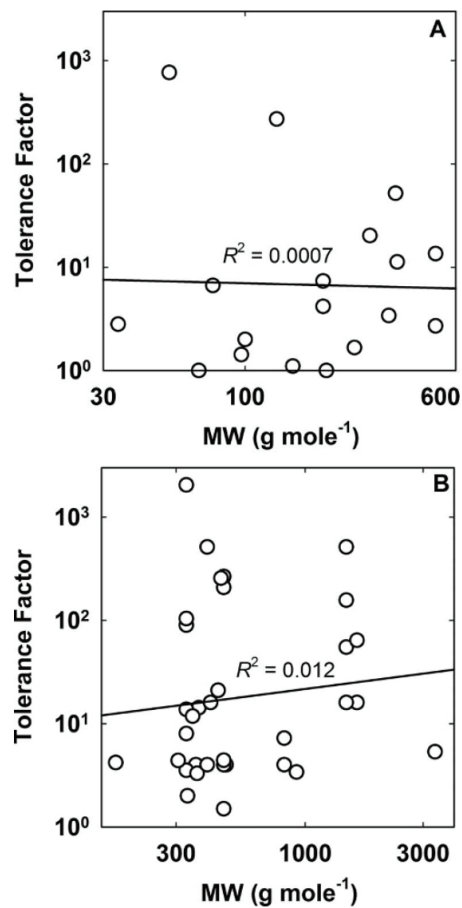


Рис.19. Фактори толерантності проти антимікробних засобів (молекулярна маса агента) для даних про (А) біоциди та антисептики з таблиці 4 та (В) антибіотики з таблиці 5 (Stewart et al., 2015)

TF коливається в широких межах навіть для окремого антимікробного агента. Наприклад, значення TF для тобраміцину, виміряні щодо однієї бактерії, *Pseudomonas aeruginosa*, коливаються від 1,5 до 265. Значення TF для ципрофлоксацину, виміряні щодо чотирьох різних бактерій, коливаються

від 3,5 до 2048. Незабаром буде видно, що швидкість загибелі біоплівки під дією хлору коливається в межах трьох порядків, навіть якщо масштабувати для концентрації дози. Ці спостереження дозволяють припустити, що чисельне значення ТГ не є специфічним для певного протимікробного агента. Іншими словами, принаймні на даний момент часу, хімія певного протимікробного засобу не дозволяє нам передбачити його відносну ефективність щодо біоплівки.

Ризикуючи надмірністю, важливо не екстраполювати значення ТГ, витягнуте з таблиць, складених тут, до іншої системи. Очікується, що якби було доступно більше вимірювань, ми виявили б, що значення ТГ для кожного антимікробного діапазону широкі.

Субстратний матеріал

Дані, упорядковані в таблицях 4 і 5, відображають вимірювання, зроблені з використанням біоплівки, сформованої на найрізноманітніших матеріалах: полістирол, скло, неіржавіюча сталь, ацетат або нітрат целюлози, полікарбонат, силікон, полівінілхлорид, каучук, поліестер та гідроксиапатит.

Хоча аналіз дисперсії цих даних (побудований на рис. 20) вказує на граничну статистично значущу різницю між п'ятьма групами ($p = 0,053$), підозрюється, що корінь цієї різниці полягає в методології, а не в матеріалі. Група полістиролу, яка має дещо вищі значення ТГ, - це всі дані з багатолункових планшетів. Більшість даних, зібраних в аналізах на планшетах, походять від ряду антимікробних концентрацій, на відміну від того, щоб вказати часові дані загибелі. Цей метод може отримати дуже високі значення ТГ при застосуванні антибіотиків у надзвичайно високих (і не фізіологічно значущих) концентраціях. Перевірка даних показує, що коефіцієнт корисної дії коливається на два порядки для даного матеріалу (рис. 20). Наприклад, коефіцієнти толерантності для біоплівок, вирощених на неіржавіючій сталі ($n = 8$), коливаються від 1,1 до 767.

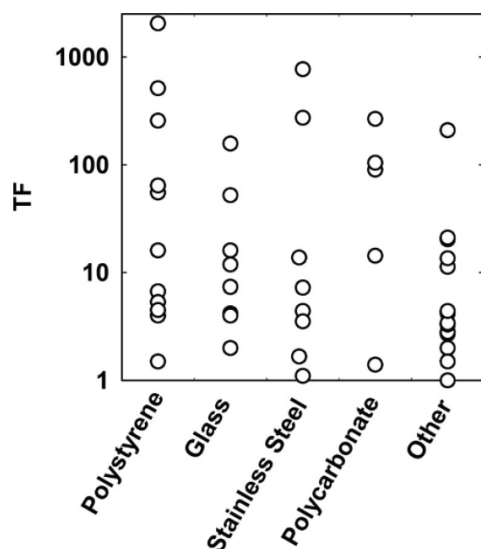


Рис. 20. Фактори толерантності згруповані та порівняні за матеріалом основи. (Stewart et al., 2015)

Можливі випадки, коли матеріал субстрату впливає на накопичення біоплівки та протимікробну толерантність. Наприклад, тоді як йод був відносно ефективним для знищення лістерій на неіржавіючій сталі (TF = 1,7), він був неефективним проти того самого штаму, коли біоплівки формувались на каучуку Буна (TF = 70). Було показано, що каучук Буна має незалежний бактеріостатичний ефект. Біоплівки, сформовані на м'якій сталі, в яких виявлялася деяка корозія металу, були менш сприйнятливі до знищення монохлораміном, ніж біоплівки на неіржавіючій сталі. Ці приклади дозволяють припустити, що матеріал субстрату, найімовірніше, впливає на сприйнятливість біоплівки, коли він вимивається або кородує.

Клітинна щільність

Коли регресують коефіцієнти толерантності для біоцидів та антисептиків, наведені в таблиці 4, щодо щільності клітин необробленої контрольної біоплівки (вимірюється в одиницях \log_{10} КУО см^{-2}), виникає чітка кореляція (рис. 21; $R^2 = 0,629$). Щоб поставити ці значення з точки зору приблизної товщини біоплівки, біоплівка $6,0 \log_{10}$ КУО см^{-2} приблизно

відповідає розрідженому моношару, тоді як найбільш масивна біоплівка в цьому наборі даних ($9,9 \log_{10}$ КУО см^{-2}) становила майже 1 мм товщини. Цей результат показує, що толерантність до біоцидів залежить від ступеня накопичення біоплівки.

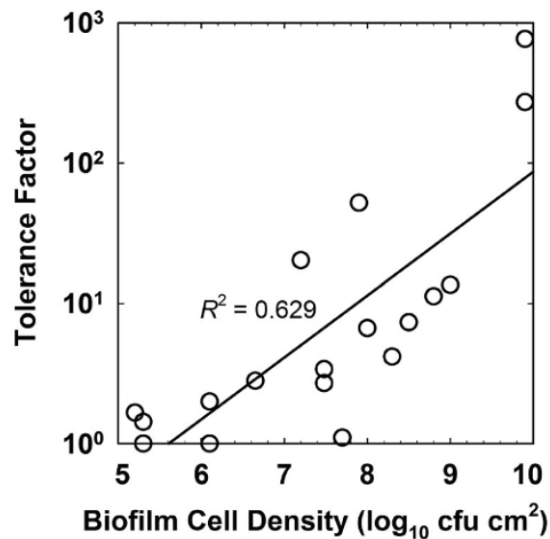


Рис. 21. Фактор толерантності проти щільності клітин біоплівки для даних таблиці 4. Лінія — це найменші квадрати регресії (Stewart et al., 2015)

Існує небагато біоцидів, для яких є достатньо даних для проведення агентоспецифічного аналізу ролі щільності клітин біоплівки у сприйнятливості. Хлор є одним із таких агентів, і на рисунку 22 представлена кореляція ($R^2 = 0,757$), яка підсилює важливу роль для ступеня накопичення біоплівки перед впливом у визначенні ефективності дози хлору. Цей аналіз включає дані дев'яти незалежних досліджень із використанням біоплівок *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Listeria*, *Salmonella* та змішаних видів.

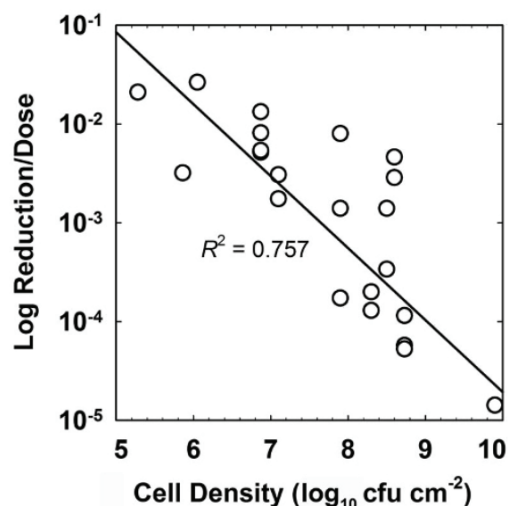


Рис. 22. Ефективність обробки хлором проти біоплівки як функція необробленого контролю за ареальною щільністю клітин біоплівки. Вісь ординат є логарифмом зменшення, поділеного на добуток дози концентрації та тривалість (C_{BtB}). Лінія – це регресійний підхід методом найменших квадратів (Stewart et al., 2015)

Існує також важлива залежність толерантності біоплівки до антибіотиків від щільності клітин біоплівки. Це найбільш чітко продемонстровано в дослідженнях біоплівок на різних стадіях розвитку з однаковою дозою антибіотика. Старі, товстіші біоплівки незмінно менш сприйнятливі, ніж молоді, менш щільні біоплівки (рис. 23). Загальна кореляція log зменшення з щільністю клітин у цьому випадку є поганою (R² = 0,125), але ефект у ході дослідження очевидний та послідовний.

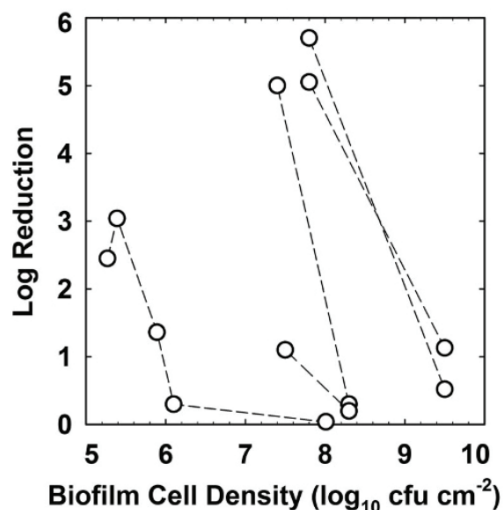


Рис. 23. Ефективність антибіотиків проти біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* як функція необробленої контрольної площі щільності клітин біоплівки. Штрихові лінії з'єднують точки даних з одного дослідження. Використовувані антибіотики включають тобраміцин, ципрофлоксацин і гентаміцин (Stewart et al., 2015)

Вік

Кілька досліджень порівнювали ефективність ідентичних антимікробних проблем щодо біоплівки різного віку. В рамках даної експериментальної системи біоплівки, як правило, стають менш сприйнятливими з віком (рис. 24), хоча тут знову ж загальна кореляція не є сильною ($R^2 = 0,217$). Припускаючи процес першого порядку, характерний час (виражений як період напіввиведення) для розвитку толерантності біоплівки, визначений з цих наборів даних, становив $2,7 \pm 2,0$ дня ($n = 12$). Це свідчить про те, що, принаймні *in vitro*, толерантність біоплівки проявляється протягом періоду часу в кілька днів. Цей результат також дає важливу підказку про те, що біологічний стан організмів у біоплівці є ключовим фактором у визначенні їх сприйнятливості.

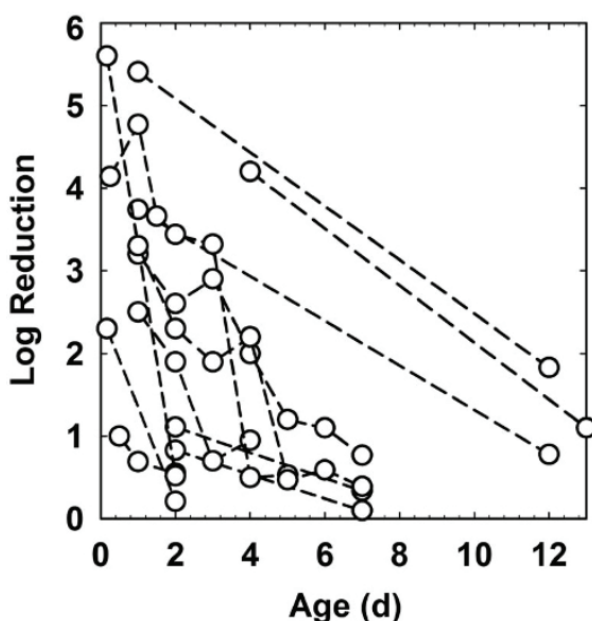


Рис. 24. Антимікробна ефективність як функція віку біоплівки. Пунктирні лінії з'єднують точки даних з того ж дослідження (Stewart et al., 2015)

Вік біоплівки та щільність клітин біоплівки зазвичай сильно корелюють. Отже, ефекти цих двох параметрів легко сплутати. Різниця у сприйнятливості між 2-денною та 7-денною біоплівками є функцією віку чи функцією суттєвої різниці накопичення біоплівки у ці два моменти часу? Тут можна

проаналізувати один набір даних, де випадково можна розділити ці два параметри. Волкотт та ін. повідомив про складну задачу біоплівки золотистого стафілокока з гентаміцином. Протягом більше 100 годин дозрівання біоплівки мало змінювалася щільність клітин біоплівки (рис. 25А). Біоплівки, вилучені у різному віці, обробляли гентаміцином, і визначали log зменшення життєздатних показників. Цей log зменшення не корелював з необробленою контрольною щільністю клітин біоплівки ($R^2 = 0,087$). Існувала кореляція між сприйнятливістю біоплівки до гентаміцину та віком біоплівки (рис. 25В; $R^2 = 0,470$).

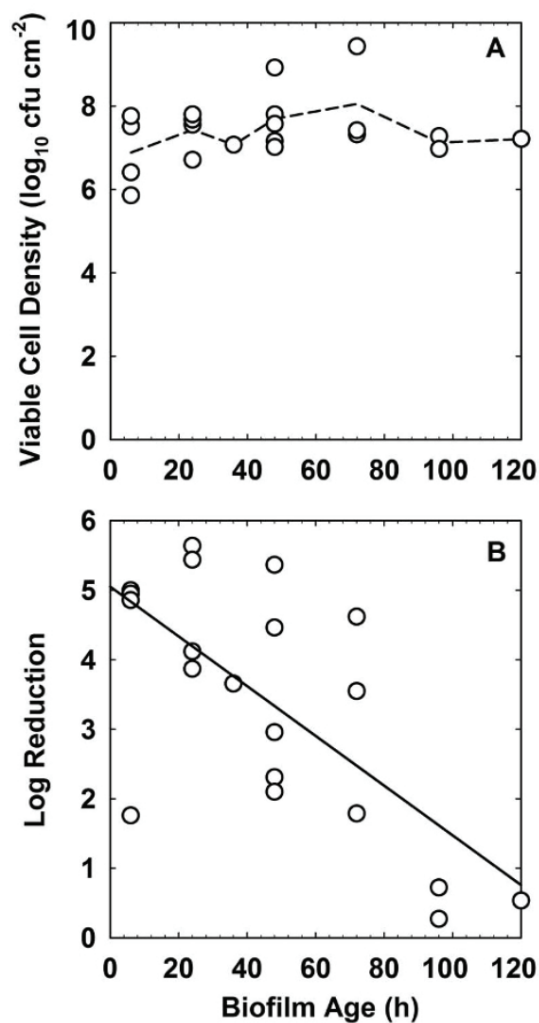


Рис. 25. (А) Дозрівання біоплівки *S. aureus* і (В) зміна чутливості до гентаміцину з віком. Пунктирна лінія на панелі А з'єднує середні значення у кожен момент часу. Суцільна лінія на панелі В – це регресійний підхід методом найменших квадратів (Stewart et al., 2015)

Хоча попередній приклад вказує на більш важливу роль віку біоплівки, ніж щільності клітин, загалом дуже важко роз'єднати індивідуальний внесок віку та щільності в толерантність біоплівки.

Видовий склад

Тут мова піде про роль мікробної композиції біоплівки на її антимікробну толерантність. Фактори толерантності як для біоцидів, так і для антибіотиків згруповані за типом на рисунку 26. Не існує статистично значущої різниці між середніми значеннями TF для будь-якого типу ($p = 0,26$ за допомогою дисперсійного аналізу). Для трьох типів, для яких існує чотири або більше точок даних (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*), коефіцієнт TF коливається щонайменше на два порядки.

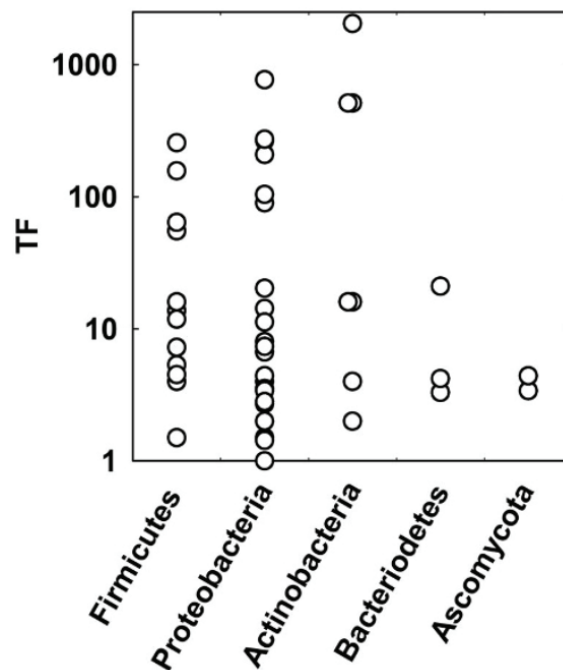


Рис. 26. Фактори толерантності до біоцидів і антибіотиків для чотирьох видів бактерій і мікроскопічного гриба (Stewart et al., 2015)

Ці дані свідчать про те, що толерантність не є специфічною для певної підгрупи мікроорганізмів. Дійсно, знижена сприйнятливість біоплівки, здається, є широко розповсюдженою здатністю у всьому мікробному світі.

Склад середовища

Сприйнятливість до антимікробних препаратів може бути дуже чутливою до складу середовища, що використовується в аналізі. Досі не розроблено інформативного способу перевірки впливу складу середовища на значення ТФ. Щоб оцінити вплив складу середовища, на рисунку 27 представлені деякі вимірювання, зроблені на молодих біоплівках кишкової палички або *P. aeruginosa*. На цій ранній стадії розвитку антибіотики можуть бути дуже ефективними проти бактерій за певних умов культивування. Однак зміни середовища можуть різко змінити сприйнятливість бактерій.

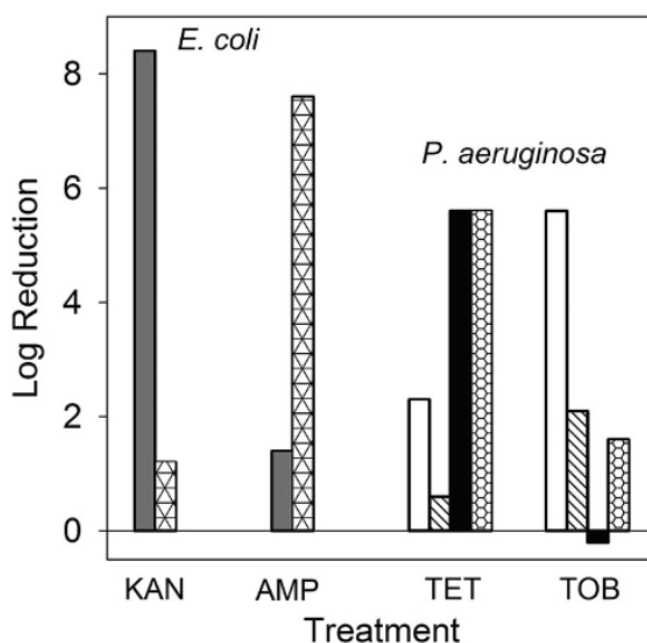


Рис. 27. Середній вплив на чутливість біоплівки до антибіотиків. Різні штрихові заливки позначають різні носії: LB (сірий); LB + глюкоза (трикутники); TSA, аеробний (білий); TSA, анаеробний (заштрихований); агар, аеробний (чорний); агар, анаеробний (бджолині соти) (Stewart et al., 2015)

Наприклад, 6-годинні біоплівки кишкової палички знищуються канаміцином при впливі на середовищі LB (log зменшення 8,4), але навряд чи антибіотик впливає, коли середовище доповнено глюкозою (log зменшення 1,2).

Подібний ефект спостерігається і при обробці ампіциліном, за винятком того, що він прямо протилежний: на середовищі LB ампіцилін неефективний (log зменшення 1,4), тоді як додавання глюкози значно покращує його антибіоплівкову дію (log зменшення 7,6). Аналогічні зміни сприйнятливості до антибіотиків можна спостерігати в 4-х годинних біоплівках *P. aeruginosa*, що піддаються дії тетрацикліну або тобраміцину на різних середовищах (рис. 27). Для кожного агента існують умови, за яких вони дуже ефективні, та умови, за яких вони неефективні.

Ці умови не однакові для різних антибіотиків. Ці дані приводять до гіпотези, що склад середовища впливає на фізіологію мікроорганізмів, що, в свою чергу, змінює чутливість до антимікробних препаратів.

Отже, до цього часу показано, що немає помітної узагальненої ролі розміру протимікробних речовин, хімії протимікробних речовин, матеріалу субстрату або видового складу мікробів щодо кількісного рівня толерантності, встановленого під час формування біоплівки. Тільки площинна щільність клітин та вік біоплівки частково корелюють з антимікробною толерантністю. Це свідчить про те, що під час дозрівання біоплівки відбувається щось, фізичне чи фізіологічне, що є важливим для повної толерантності біоплівки.

Результати тематичного дослідження також вказують на важливу роль складу середовища, а отже і фізіології, в толерантності біоплівки. Іншими словами, деталі вирощування біоплівки для певного тесту, ймовірно, будуть важливішими, ніж вибір антимікробного агента чи мікроорганізму.

2. Антимікробна толерантність у біоплівках.

Антимікробне виснаження

Одним простим і, можливо, недооціненим механізмом захисту біоплівки є виснаження антимікробного агента в рідині, що омиває біоплівку. Антимікробний засіб може виснажуватися або за допомогою реакції в рідкій фазі, за допомогою реакції з біоплівкою або прикріпленим субстратом, або

шляхом сорбції до складових біоплівки або матеріалу субстрату. Цей механізм особливо вірогідний у системах із відносно високим відношенням площі поверхні до об'єму, таких як 96-лунковий мікротитраційний планшет. У цьому типі систем потреби біоплівки можуть швидко зменшити розчинену концентрацію антимікробних препаратів.

Очевидним способом контролю виснаження антимікробних препаратів є аналіз обсягу рідини протягом курсу процедури (лікування) або, принаймні, до та після періоду впливу, щоб перевірити, чи підтримується концентрація антимікробних препаратів. Зазвичай це не робиться.

Оскільки відношення площі поверхні до об'єму є критичною фізичною характеристикою системи, що визначає потенціал антимікробного виснаження, і оскільки більшість наборів даних у таблицях 4 та 5 містять деталі, що дозволяють розрахувати це відношення, можна провести кількісний аналіз. Коли фактори толерантності у таблиці 4 регресують щодо відношення площі поверхні до об'єму, кореляція не виявляється ($R^2 = 0,022$). Так само TFs біоплівки для антибіотиків, наведені в таблиці 5, не корелюють із співвідношенням поверхні та об'єму системи тестування біоплівки ($R^2 = 0,010$). Ці аналізи вказують на те, що виснаження антимікробних препаратів, ймовірно, не є основною причиною толерантності до біоплівки на моделях *in vitro*.

Проникнення

Очікується, що ступінь проникнення антимікробної речовини в біоплівку залежить від товщини біоплівки, ефективної дифузійності агента в біоплівці, реакційної здатності агента в біоплівці, сорбційної здатності біоплівки для агента, концентрації дози та тривалості дії дози, і зовнішніх властивостей масообміну. Іншими словами, це складна взаємодія та проблема. Хорошим початковим місцем є вивчення фактичних вимірів проникнення антимікробних препаратів у біоплівки.

Огляд експериментально вимірюного часу проникнення антимікробних агентів у біоплівки представлений на рисунку 28. Цей набір даних виключає вимірювання, зроблені з використанням дифузійних камер, в яких біоплівка затиснута між двома відділеннями.

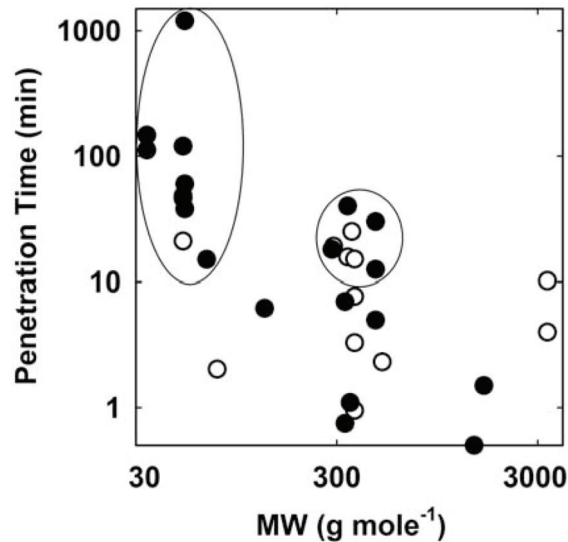


Рис. 28. Експериментально вимірювали час проникнення антимікробних препаратів у біоплівках проти молекулярної маси антимікробної речовини. Час проникнення визначався як час досягнення в основі або центрі біоплівки 50 % рівноважної концентрації антимікробного агента або шляхом безпосереднього вимірювання антимікробного агента (зафарбовані кола), або шляхом виявлення втрати цілісності мембрани з флуоресцентним зондом (незафарбовані кола). Час проникнення більше 12 хв обведено (Stewart et al., 2015)

Ці підходи можуть бути корисними для визначення того, чи відбувається проникнення, але не підходять для визначення абсолютного часу проникнення, оскільки постійні часу залежать від геометрії пристрою. Вимірювання, представлені на рисунку 27, проводились з використанням мікроелектродів, проміжної мікроскопії флуоресцентно-мічених препаратів (time lapse microscopy of fluorescent-tagged drugs; проміжна мікроскопія - це покадрова фотографія, що застосовується для мікроскопії; послідовності зображення з мікроскопу записуються і потім проглядаються з великою

швидкістю, щоб отримати прискорене уявлення про мікроскопічний процес), загальної внутрішньої відбивної спектроскопії та проміжної мікроскопії втрат флуоресценції з клітин, попередньо мічених флуорофором.

Час проникнення на рисунку 28 коливається від частки хвилини до майже цілого дня. Спокусливо судити про деякі з них як швидкі, а про інші як повільні, але майте на увазі, що важливим порівнянням є тривалість дози та час проникнення. Час проникнення 30 хв може бути швидким, якщо тривалість дози становить 8 год, і повільним, якщо тривалість дози становить 3 хв.

Час проникнення не збільшується із збільшенням молекулярної маси протимікробного препарату, як може передбачати інтуїція. Дійсно, з рисунка 28 можна зробити висновок, що навіть великі антибіотики або антимікробні пептиди можуть проникнути в біоплівку протягом декількох хвилин. Деякі приклади великих агентів, які відносно швидко надходять у внутрішню частину біоплівки, включають ванкоміцин (0,5 хв), даптоміцин (1,5 хв) і нізин (4-10 хв).

Є дві групи агентів, обведені на рисунку 28, із вимірним часом проникнення довшим за 12 хв. Протимікробними препаратами першої групи (з нижчою молекулярною масою) є всі реакційноздатні окисники: хлор, діоксид хлору, монохлорамін та гідроген пероксид.

Агентами другої групи (з вищою молекулярною масою) є переважно катіонні молекули, включаючи сполуки четвертинного амонію, такі як цетилпіридиній хлорид та бензалконій хлорид, та аміноглікозидний антибіотик. Уповільнене проникнення цих речовин у біоплівку відбувається внаслідок реакції або сорбції агента в біоплівці у міру її дифузії. Галогени реагують з нехарактерними компонентами біомаси і нейтралізуються. Гідроген пероксид руйнується під дією каталази. Агенти з позитивним зарядом, ймовірно, зв'язуються з негативно зарядженими полімерами або клітинними поверхнями, затримуючи проникнення. Сповільнене

проникнення внаслідок реакції та сорбції були проаналізовані математичними моделями.

Розглядаючи агенти, які піддаються реакції або сорбції в біоплівці, передбачається, що швидкість проникнення буде залежати від застосовуваної концентрації. Цей прогноз підтверджується підмножиною даних, нанесених на рисунку 29. Цей аналіз показує, що такі агенти, як хлор, ацетатна кислота та тобраміцин (усі представники кіл, зображених на рис. 28), проникають у певну біоплівку швидше, коли застосовувана концентрація збільшувалась.

Нахил регресованої лінії на рисунку 29 близький до -1. Це говорить нам, що час проникнення цих речовин обернено пропорційний концентраційній дозі. Наприклад, концентраційна доза, яка в 10 разів вища, призведе до часу проникнення, який на одну десятю довший. Не очікується, що це стосується антимікробних препаратів, які не реагують або сорбуються в біоплівці. Передбачається, що 50 % часу проникнення невзаємодіючої розчиненої речовини не залежить від застосованої концентрації.

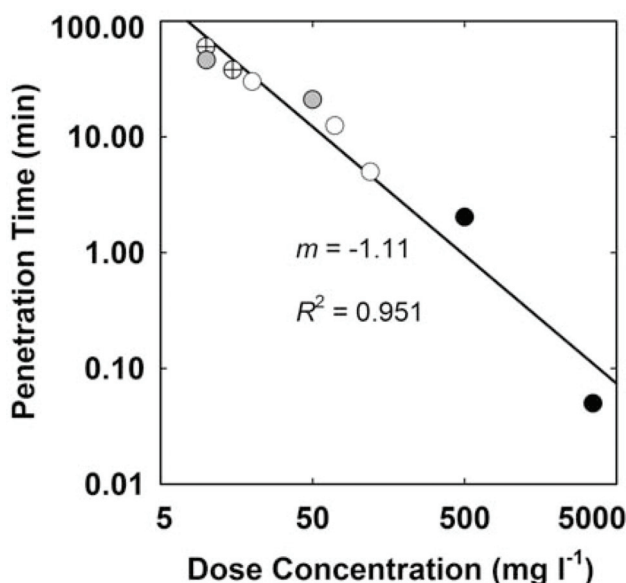


Рис. 29. Експериментально вимірювали час проникнення антимікробних препаратів у біоплівках залежно від дозової концентрації. Лінія - це регресійний підхід методом найменших квадратів. Символи позначають дані про хлор (перекреслене коло), хлорин (сіре коло), тобраміцин (біле коло), пероцтову кислоту (чорне коло) (Stewart et al., 2015)

Попередній аналіз та обговорення є корисними для отримання розуміння фундаментального явища проникнення антимікробних препаратів у біоплівку, але це не говорить нам про те, чи сповільнене проникнення насправді обмежує антимікробну ефективність на практиці. Найбільш імовірною ситуацією для неповного проникнення є ситуація, коли реактивні окисники надходять із відносно низькими концентраціями в товсті біоплівки протягом короткої тривалості дози. Антибіотики, ймовірно, проникають у біоплівку *in vivo*, оскільки тривалість дози порівняно велика. Іншим аргументом на користь проникнення антибіотиків, включаючи липкі аміноглікозиди, є те, що вони призводять до зменшення \log *in vivo*, що вказує на доступ до більшості бактерій. Наприклад, класичне клінічне дослідження інгаляційного тобраміцину у хворих на муковісцидоз повідомляє про логарифмічне зменшення *P. aeruginosa* у мокротинні трохи більше 2 після 2 тижнів терапії. Це говорить нам про те, що препарат досяг 99% бактерій. Навіть у тих випадках, коли тривалість дози коротка, наприклад, при полосканні порожнини рота, при обробці зубного нальоту, проникнення антимікробного препарату може не бути обмежуючим. Корбін не виявив кореляції між клінічною ефективністю активних інгредієнтів для полоскання ротової порожнини та часом їх проникнення *in vitro*.

Фізіологія

Мікроорганізми в біоплівках можуть бути толерантними до антимікробних агентів, оскільки вони впадають/переходять у менш сприйнятливі фізіологічні стани. Наприклад, широко прийнято вважати, що мікроорганізми в стаціонарній фазі періодичної планктонної культури, яка може уповільнюватися або не вирощуватися, можуть бути менш активними в метаболізмі, ніж зростаючі клітини, можуть бути менш чутливими до знищення антимікробними препаратами.

Декілька досліджень порівнювали загибель в експоненціальній фазі, стаціонарній фазі та біоплівках (рис. 30). Хоча в цьому аналізі бракує достатніх даних, щоб зробити вагомий висновок, він припускає, що тоді як

планктонні клітини експоненціальної фази явно менш сприйнятливі, ніж клітини біоплівки, планктонні клітини стаціонарної фази стало не відрізняються від клітин біоплівки.

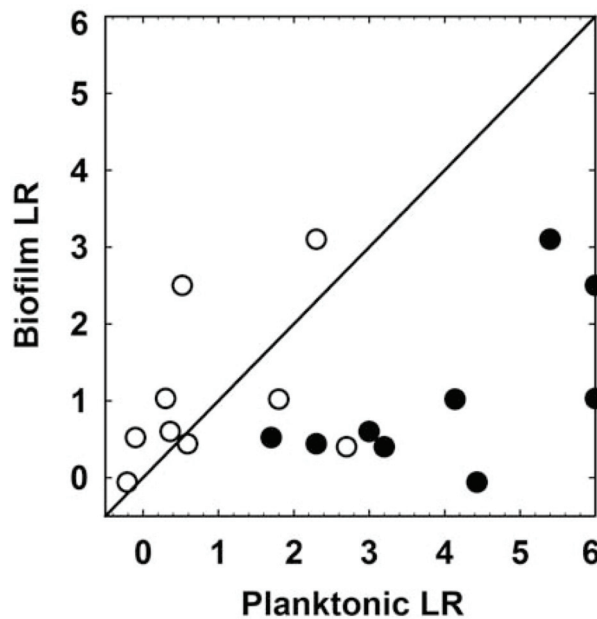


Рис. 30. Порівняння антимікробної сприйнятливості експоненціальної фази планктону (зафарбовані символи) або стаціонарної фази планктону (незафарбовані символи) до клітин біоплівки. Суцільна лінія - це лінія рівності. Точки під лінією вказують на те, що клітини біоплівки були менш сприйнятливими, ніж клітини планктону. Точки над лінією вказують на те, що планктонні клітини були менш сприйнятливими, ніж клітини біоплівки (Stewart et al., 2015)

Для характеристики фізіологічного стану мікробної клітини використовували найрізноманітніші терміни: експоненціальна фаза, стаціонарна фаза, фаза відставання, нерослі, стресові, адаптовані, неактивні, життєздатні, але не культивовані, персистуючі, сплячі. На рисунку 31 представлена спрощена категоризація фізіологічних станів на основі дискримінації трьох ознак:

1) ріст, 2) метаболічна та анаболічна активність та 3) розгортання специфічних стресoadаптивних реакцій. Хоча схематичне зображення на рисунку 31 представляє їх як дискретні стани, може бути більш реалістичним

вважати їх станціями вздовж континуумів. Сприйнятливість клітини буде залежати як від фізіологічного стану, так і від конкретного протимікробного агента.

Ось кілька прикладів, що ілюструють різноманітність захисних станів.

Загалом, коли біоплівки мікроорганізмів порівнюють із планктонними клітинами щодо сприйнятливості до антимікробних препаратів, порівняння відбувається зі зростаючою періодичною культурою (рис. 31А).

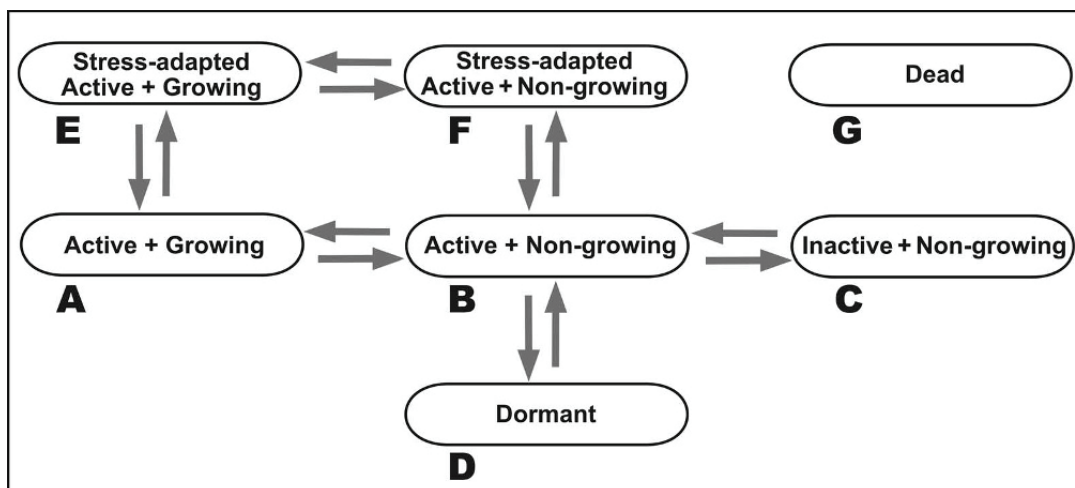


Рис. 31. Концептуальна схема окремих станів клітин, важливих для антимікробної чутливості. До стану мертвих клітин можна перейти з будь-яких інших станів (Stewart et al., 2015)

Це клітини, які можуть бути відносно чутливими до антимікробної атаки, оскільки їх поточне середовище є дозвільним для зростання, а їх поточні вкладання спрямовані на ріст та реплікацію клітин, а не на виживання. Клітини, які переходять у невірний, але все ще активний стан (рис. 31В), можуть швидко набутися толерантності до деяких агентів. У концептуалізації на рисунку 31 цей стан задуманий як клітини з активним мембранним потенціалом та здатністю до генерації деякої кількості АТФ разом із субмаксимальною здатністю до транскрипції та трансляції. У цих клітинах не спостерігається реплікації ДНК, синтезу клітинної стінки або збалансованої трансляції всіх білків, необхідних для створення нової клітини. У такому стані бактерії стають нечутливими до β -лактамних антибіотиків, які

лізують клітини, пригнічуючи синтез клітинної стінки, оскільки клітина продовжує збільшуватися. У клітинах, які переходять у неактивний, не зростаючий стан (рис. 31C), відсутні катаболізм чи анаболізм. Така клітина не може підтримувати мембранний потенціал і, отже, може стати нечутливою до аміноглікозидних антибіотиків, які залежать від активного транспорту для досягнення своїх внутрішньоклітинних мішеней. Сплячий стан (рис. 31D) розглядається як такий, що відрізняється від неактивного, не зростаючого стану (рис. 31C).

Сплячий стан також метаболічно неактивний і не зростаючий. Однак для переходу в сплячий стан клітина впровадила захисні модифікації. Такі модифікації можуть включати, гіпотетично, зміну складу ліпідів мембрани та порину для зменшення проникності, гібернацію (сплячку) рибосом, інгібування механізмів транскрипції та реплікації та розгортання ферментів, що захищають від окисного стресу без споживання АТФ (наприклад, каталази). На відміну від цього, нерослий, неактивний стан (рис. 31C) - це енергетично відключена клітина, яка не має інших захисних модифікацій.

Як аналогію, стан на рисунку 31C можна порівняти з автомобілем, у якого на узбіччі дороги закінчився бензин і який був покинутий, тоді як транспортний засіб, аналогічний стану клітини на рисунку 31D, також немає бензину, у нього були закриті вікна, виснажений радіатор, відключений акумулятор і покриття, зав'язане над ним. Такий бездіяльний стан клітин може пояснити толерантність до різноманітних антимікробних впливів. Часто обговорювана персистерна клітина може представляти такий бездіяльний стан. Метаболічно активні бактерії здатні відчувати навколишнє середовище та активно реагувати на наявність антимікробного стресу. На схемі, зображеній на рисунку 31, або зростаючі клітини (рис. 31A), або ще неростучі активні клітини (рис. 31B) здатні розгортати активні реакції на стрес (результуючі стани показані на рис. 31E та 31F, відповідно). Приклади реакцій на стрес, продемонстровані в бактеріальних біоплівках, включають індукцію каталази при обробці гідроген пероксидом, індукцію β -лактамази

при обробці імпенемом та індукцію оперону *prt*, що модифікує ліпополісахарид, при обробці колістином. У кожному з цих прикладів індукований ген або гени посилюють здатність біоплівки переносити антимікробну речовину або посилюючи руйнування антимікробного агента, або модифікуючи клітину, щоб зробити її менш сприйнятливою.

Оскільки відомо, що біоплівки містять ніші з різною хімією середовища та біологічною активністю, важливо визнати, що біоплівка може містити клітини в більш ніж одному, можливо, у всіх станах, показаних на рисунку 31. Ця фізіологічна неоднорідність або диверсифікація, швидше за все, є важливим фактором толерантності стану біоплівки. Зверніть увагу, що жоден із цих станів не є обов'язково виключно асоційованим ані з планктонною, ані з біоплівковою клітиною.

Однією зі складностей при аналізі фізіологічного різноманіття, наведеного на рисунку 31, є відсутність стандартних кількісних показників більшості фізіологічних характеристик. Існує чудовий кількісний параметр, що характеризує ріст мікробів: питома швидкість росту. Методи вимірювання місцевих темпів зростання в біоплівках можуть дати уявлення про спектр фізіологічних станів, що впливають на чутливість до антимікробних препаратів.

Крім того, було б корисно мати кількісні показники загальної здатності клітин до транскрипції або трансляції, відносного вираження адаптивних реакцій на стрес та деяке кількісне визначення спокою.

Стани клітин, зображені на рисунку 31, безумовно, пов'язані з диференціальною експресією конкретних наборів генів у певному організмі. Одне з питань, про яке слід пам'ятати, інтерпретуючи аналіз антимікробної сприйнятливості генетичних мутантів, вирощених як біоплівки, полягає в тому, що мутація, яка впливає на щільність площі клітин біоплівки, може побічно змінити її сприйнятливість. Дійсно, цього ефекту слід очікувати, як було обговорено вище.

Деякі системи, про які повідомляється, що сприяють антимікробній переносимості біоплівки, включають жорстку реакцію, SOS відповідь, насоси для витоку, кворум-сенсинг, модулі токсин-антитоксин, вироблення периплазматичних або позаклітинних полісахаридів та інші. На сьогоднішній день ще рано говорити про виявлення генетичної основи антимікробної толерантності біоплівки, але цих деталей, безумовно, слід дотримуватися.

3. Підходи до інгібування утворення біоплівок.

В даний час антибіотики є найкращою стратегією лікування бактеріальних інфекцій. Звичайні антибіотики працюють, або запобігаючи поділу бактеріальних клітин (бактеріостатичні), або вбиваючи клітини (бактерицидні). Незважаючи на те, що протягом багатьох років антибіотики виявилися важливими для усунення бактеріальних патогенів, переважна кількість даних свідчить про те, що вони сильно пошкоджують мікробіоту господаря, створюючи середовище, де можуть переважати умовно-патогенні мікроорганізми, і вони підвищують селективний тиск на стійкість до антибіотиків. Більше того, хоча профілактичне введення антибіотиків, яке передуює хірургічному втручанню, є дуже успішним у зменшенні рівня зараження, воно має незначний або зовсім не захисний ефект при хірургічних процедурах, що включають імплантати або протези. У більшості випадків найкращим методом лікування інфекцій, пов'язаних з біоплівками, пов'язаними з чужорідними тілами, є видалення зараженого пристрою. Однак у таких випадках, як імплантовані протези, кардіостимулятори та серцеві імплантати, видалення пристрою ускладнено.

Бактерії у біоплівках особливо нечутливі до лікування антибіотиками не тільки завдяки збільшеній передачі маркерів стійкості всередині біоплівкової спільноти, але також через обмеження дифузії, що викликаються позаклітинним матриксом, інактивацію антибіотиків високою концентрацією іонів металів і низьким рН, а також метаболічну присутність неактивних персистентних клітин, які переживають лікування. У сукупності ці атрибути

роблять бактерії біоплівки до 1000 разів більш толерантними та/або стійкими до антибіотиків, ніж планктонні клітини. Таким чином, необхідність у більш ефективних методах руйнування біоплівки стає необхідною. Нижче представлено деякі з останніх досягнень стратегій, спрямованих на перешкоджання утворенню біоплівки шляхом знищення бактерій або націлювання на різні стадії розвитку біоплівки (також узагальнено на рис. 32).

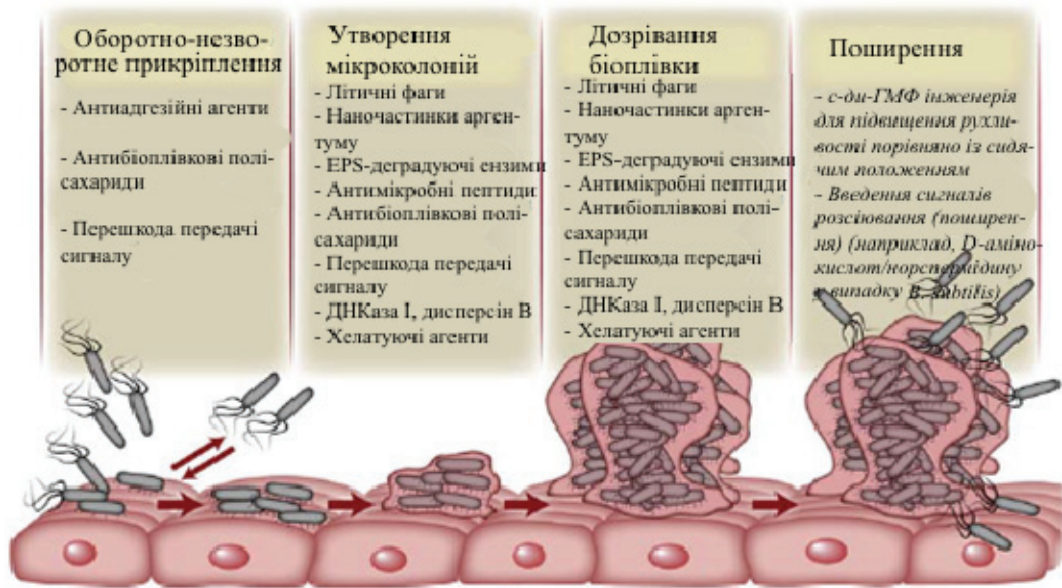


Рис. 32. Схематично окреслені етапи розвитку біоплівки та перелік стратегій, спрямованих на інгібування та/або зрив утворення біоплівки на конкретних стадіях (Kostakioti et al., 2013)

Бактерицидні стратегії

Фаготерапія

Фаготерапія - перспективна альтернатива антибіотикотерапії; фагів достатньо і їх можна легко виділити з широкого кола середовищ, вони, як правило, специфічні для вузьких діапазонів хазяїна (таким чином, ймовірно, не порушуючи мікробіоти хазяїна), і їх самовідтворюючий метод дозволяє низькі дози. Більше того, висока швидкість мутації фагів полегшує адаптацію, оскільки відповідні бактеріальні господарі накопичують мутації,

щоб зберегтись у даному середовищі. Фаготерапія використовує літичні фаги, які не переходять у профаговий стан і, отже, рідко містять або передають гени вірулентності, хоча вони призводять до швидкого руйнування бактеріальної клітини. Показано, що багато фагів кодують ферменти, що розкладають EPS, або поширюються на стаціонарно-фазових бактеріях, що робить їх більш вірогідними для збереження в біоплівці.

Наночастинки срібла

Просочення медичних виробів антимікробними препаратами було найбільш часто застосовуваним підходом для запобігання біоплівкам, які зв'язані (асоційовані) із пристроями. Одним із часто використовуваних засобів є срібло, яке протягом сотень років використовувалось як антиінфекційний засіб і широко застосовувалось для стерилізації раневих інфекцій під час Першої світової війни. Позитивно заряджені іони срібла полегшують електростатичні притягання між металом і негативно зарядженою мембраною бактерій, посилюючи поглинання та антимікробну активність. Летальність срібла для бактерій частково зумовлена реакціями тіолових груп, які інактивують ферменти. Як результат, обробка сріблом пригнічує реплікацію ДНК, експресію рибосомних та інших клітинних білків і втручається в ланцюг транспорту електронів бактерій.

Потенційна токсичність срібла в організмі людини призвела до того, що деякий час його використання зменшилося. Однак популярність срібла відновилася з появою нанотехнологій. Наночастинки, як правило, мають розмір не більше 100 нм, і їх біоцидна ефективність передбачається завдяки поєднанню їх малих розмірів та високого відношення поверхні до об'єму, які забезпечують тісну взаємодію з мікробними мембранами. Показано, що наночастинки срібла на 95 % інгібують біоплівки *P. aeruginosa* та *Staphylococcus epidermidis*. Дослідження на кроликах показали, що імпланти, іонно-вкриті наночастинками срібла, пригнічують формування біоплівки золотистого стафілокока, не викликаючи накопичення срібла в тканинах хазяїна, навіть через 28 днів після просочення.

Антимікробні пептиди

Антимікробні пептиди виробляються вродженою системою імунної відповіді і пропонуються як привабливі кандидати для розробки нових типів антибіотиків. Однак їхній спектр активності та механізм дії потрібно чіткіше визначити, перш ніж їх можна буде розглядати як можливі терапевтичні стратегії.

Кателіцидини складають один з найважливіших класів антимікробних пептидів. Нещодавня робота показала, що SMAP-29, VMAP-28 та VMAP-27 суттєво зменшили утворення біоплівки штамми *P. aeruginosa*, стійкими до різних лікарських засобів та виділеними від хворих на муковісцидоз, та вбивали бактерії в попередньо сформованих біоплівках. У цьому дослідженні порівнювали бактерицидну активність кателіцидинів з активністю тобраміцину, передового антибіотика, що використовується для лікування інфекцій дихальних шляхів *P. aeruginosa* у хворих на муковісцидоз. Помпіліо та ін. встановлено, що на відміну від тобраміцину, активні пептиди кателіцидину виявляли більш швидку кінетику, здійснюючи швидку бактерицидну активність незалежно від випробуваних видів. Хоча ступінь знищення бактерій загалом був вищим при застосуванні тобраміцину, це дослідження показує, що кателіцидини можуть мати потенціал як антибіоплівкові агенти у випадку штамів, стійких до різних лікарських засобів.

Літичні пептиди - це ще одна група антимікробних пептидів, що оцінюються на предмет їх інгібуючого впливу на формування біоплівки. Літичні пептиди зв'язують LPS (ліпополісахаридні) фрагменти клітинної мембрани бактерій, порушуючи стабільність мембрани. Дослідження на золотистому стафілококу показали, що літичний пептид RTP-7 запобігав утворенню біоплівки *in vitro*, а також був здатний дифундувати в глибокий шар попередньо сформованої біоплівки, вбиваючи 99,9 % бактерій біоплівки. Цей пептид зберігав активність у високоокислих середовищах та за присутності надлишку металів, в умовах, що імітують середовище біоплівки *S. aureus*.

Антиадгезійні засоби

Маннозиди, піліциди та курліциди

Прикріплення є першим кроком практично у всіх типах формування біоплівки, тому численні дослідження були зосереджені на зменшенні бактеріальної зчепленості.

Для уропатогенних кишкових паличок *E. coli* (UPEC) зусилля зосереджувались на розробці сполук, які заважають адгезивним властивостям або збірці пілів типу 1, оскільки вони є основним засобом для прилипання UPEC під час формування біоплівки *in vitro* та всередині хазяїна. Рентгенокристалічні структури адгезину FimH, зв'язаного з маннозою, використовувались для раціонального проектування молекул, які називаються маннозидами, які відповідають кишені, що зв'язує маннозу FimH, і конкурентно інгібують зв'язування FimH з рецептором господаря. Нещодавні досягнення в цій галузі призвели до розвитку мономерних біфенілманнозидів із значно посиленою ефективністю порівняно з раніше відомими інгібіторами FimH.

Ці оптимізовані маннозиди запобігали утворенню біоплівки UPEC *in vitro* і було показано, що вони порушують попередньо сформовані біоплівки. Дослідження *in vivo* показали, що введення маннозиду як профілактичний засіб для інфекцій сечовивідних шляхів (UTIs) перешкоджає приєднанню та інвазії UPEC, зменшуючи утворення ІВС та послаблюючи UPEC під час стадій гострої інфекції. Більше того, маннозиди посилювали антимікробну дію триметоприм-сульфаметоксазолу (TMP-SMZ), запобігаючи інфікуванню ізолятом PBC-1 уропатогенних кишкових паличок, стійким до лікування TMP-SMZ у клінічних умовах.

Маннозиди також були ефективними як терапевтична стратегія для хронічних UTIs, значно зменшуючи бактеріальне навантаження на сечовий міхур мишей, оброблених перорально, протягом 6 годин. Таким чином, маннозиди мають великий потенціал для усунення ускладнених UTIs, пов'язаних із стійкими до антибіотиків штамми UPEC.

Паралельно було докладено зусиль, щоб інгібувати збирання пілей типу 1 та інших пілів шляху шаперон/провідник (chaperone/usher pathway - CUP), використовуючи піліциди, які є сполуками, раціонально розробленими, щоб перешкоджати експорту відповідних субодиниць піліну. Було показано, що піліциди інгібують утворення UPEC біоплівки *in vitro* на 50 % при концентраціях до 3 мМ. Показано, що подібні сполуки ефективні проти завитків («курліциди»), інгібуючи біогенез завиток *in vitro*, формування біоплівки та посилюючи кліренс UPEC з сечовивідних шляхів.

Полісахариди

Екзополісахариди опосередковують взаємодії клітини-поверхні та клітини-клітини, які є критично важливими для формування та стабілізації біоплівки. Мутанти, не здатні синтезувати або експортувати такі полісахариди, як правило, мають недостатню адгезію та формування біоплівки, а отже, дуже чутливі до знищення антибіотиками та імунного захисту господаря. Однак останні дані свідчать, що деякі бактеріальні екзополісахариди пригнічують або дестабілізують утворення біоплівки іншими видами. Наприклад, у випадку з *P. aeruginosa*, Qin та його колеги показали, що Pel та Psl-вмісні супернатанти культури порушували попередньо сформовані біоплівки *S. epidermidis* та *S. aureus*, не пригнічуючи ріст бактерій. Більше того, наявність *P. aeruginosa* пригнічувала формування біоплівки *S. epidermidis* у двовидових експериментах на біоплівках *in vitro*. Полісахариди, що мають небіоцидні антибіоплівкові властивості, також були виділені для декількох видів з екстрактів біоплівки, позбавленої клітин. Вважається, що їх антибіоплівкові властивості залежать від їх здатності 1) змінювати фізичні характеристики бактеріальних клітин або абіотичних поверхонь; 2) діяти як сигнальні молекули, які впливають на схеми експресії генів сприйнятливих бактерій; або 3) конкурентно інгібувати багатовалентні взаємодії вуглеводів і білків, тим самим перешкоджаючи адгезії. Більшість антибіоплівкових полісахаридів демонструють широкий спектр інгібування біоплівки, тоді як деякі здатні розпорошити попередньо сформовані

біоплівки. Враховуючи їх небіоцидний спосіб дії, а також їх біосумісність та біорозкладність, антибіоплівкові полісахариди можуть бути перспективною стратегією, придатною для лікування та профілактики інфекцій, пов'язаних з біоплівкою. Крім того, кілька досліджень свідчать про те, що антибіоплівкові полісахариди можуть бути цінними як ад'ювант, оскільки вони підсилюють функції антибіотика при спільному введенні. Іншим потенційним застосуванням може бути покриття поверхонь постійних медичних девайсів (виробів) або навіть використання бактерій, що продукують антибіоплівкові полісахариди, у пробіотиках для попередження/знищення патогенів.

Перешкоди передачі сигналу

Багато досліджень зосереджувались на пригніченні ініціювання біоплівки шляхом втручання у бактеріальні сигнальні каскади, враховуючи, що двокомпонентні системи є центральним засобом перехоплення та змін навколишнього середовища. Інгібування систем передачі сигналів є привабливим засобом антивірулентної терапії, оскільки втручання в передачу сигналів не вбиває бактерії, а депрограмує оптимальну експресію гена та зменшує вірулентність, не застосовуючи тиску для відбору стійкості. Серед систем, які видаються привабливими кандидатами на лікарські мішені, є двокомпонентна система QseBC, яка є загальною серед біоплівкоутворюючих грамнегативних патогенів.

Попередні дослідження вивчали потенціал інгібування активності кінази QseC та показали ефективність щодо зменшення ентерогеморагічної вірулентності кишкової палички *Escherichia coli* (EHEC). Дослідження в UPEC та EHEC показали, що видалення QseC призводить до надмірної активації регулятора відповіді QseB через специфічну активність фосфатази QseC, необхідної для дезактивації QseB. Таким чином, націлювання на активність фосфатази QseC було б оптимізованою стратегією роз'єднання нормальної експресії генів у патогенів, що несуть QseC. У *E. faecalis* дослідження націлені на FsrC/FsrATCS. FsrC/FsrA контролює експресію fsrBDC та gelE-sprE, що призводить до збільшення продукування желатинази

та серинової протеази, які необхідні для належного виробництва eDNA. За допомогою FsrC/FsrA як інгібітор сигналізації GBAP визначено пептидний антибіотик сіаміцин I.

«Антиматриксіві» агенти

Окрім зменшення адгезії, агрегація бактерій може бути спрямована на порушення компонентів позаклітинного матриксу. Кілька досліджень використовували потенціал інгібування ферментів, що беруть участь у синтезі або модифікації компонентів EPS, що асоціюються або секретуються з клітинною стінкою, та інших складових матриксу. У цих дослідженнях безпосередньо використано природні або сконструйовані ферменти, бактеріофаги (фаготерапія) як засіб доставки та експресії ферментів або використано хелатори металів як засіб для порушення цілісності матриксу.

Ферменти

Серед ферментів, націлених на порушення матриксу, на увагу заслуговує N-ацетил-D-глюкозамін-1-фосфат ацетилтрансфераза (GlmU), яка бере участь у біосинтезі активованого UDP-GlcNAc, необхідного попередника пептидоглікану та ліпополісахариду (LPS) у грампозитивних та грамнегативних патогенів, відповідно. Бертон та співавт. тестували ефекти інгібіторів GlmU, включаючи N-етилмалеїмід (NEM) та NEM-аналоги N-феніл малеїмиду, N,N0-(1,2-фенілен)дималеїмід (oPDM) і N-(1-феніл)малеїмід (PyrM), на катетер-асоційованих біоплівках уропатогенів. Всі аналоги NEM демонстрували антибіоплівкову активність щодо клінічних ізолятів *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis* та *E. faecalis*. Це ж дослідження показало, що покриття силіконових катетерів сумішшю oPDM та катіонного поліпептиду протаміну сульфату (PS) посилювало антибіоплівкову активність PS проти *P. aeruginosa* та *S. epidermidis*, демонструючи, що це подвійне введення можна використовувати як широкоспектрове антиінфекційне покриття для медичних виробів.

Нещодавно ферменти DNase I та дисперсин-В також привернули увагу як потенційні антибіоплівкові агенти, особливо проти грампозитивних

збудників. Вплив DNase I полягає в її здатності перетравлювати eDNA, знайдену в структурі біоплівки. Застосування DNase запобігало утворенню біоплівки стафілококів та ентерококів та розпорошувало попередньо сформовані біоплівки *in vitro*. Рекombінантна форма DNase I, пульмозим, використовується в певних випадках для лікування пацієнтів з МВ.

Дисперсин-В - це глікозидна гідролаза, що продукується *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, яка розщеплює 1-6 N-ацетилглюкозамінові полімери (PNAG) у шарі бактеріального пептидоглікану. Доведено, що застосування дисперсину-В є ефективним проти біоплівки *S. aureus* та *S. epidermidis* та інших бактерій, що містять PNAG.

Введення дисперсину-В у фаг, який реплікується в клітинах у стаціонарній фазі, призвело до повного руйнування попередньо сформованих біоплівок кишкової палички *in vitro*, що було більш драматичним ефектом, ніж введення або нативного фага (без дисперсину-В), або лише дисперсину-В, ймовірно через опосередковану дисперсином-В деградацію ЕПС, що дозволило фагу отримати доступ до глибших шарів структури біоплівки.

Хелатуючі агенти

Катіони металів, такі як кальцій, магній та залізо, брали участь у підтримці цілісності матриксу. Відповідно до цього спостереження, було показано, що хелатуючі агенти дестабілізують архітектуру біоплівки, крім того, що перешкоджають стабільності бактеріальних мембран. Наприклад, цитрат натрію пригнічував утворення біоплівки кількома видами стафілококів *in vitro*. Крім того, тетранатрій-ЕДТА знищував біоплівки в моделі біоплівки *in vitro* та на експлантованих катетерах для гемодіалізу, тоді як динатрій-ЕДТА, у поєднанні з тигецикліном або гентаміцином, зменшував утворення біоплівки видів *Staphylococcus* та *P. aeruginosa* на сегментах Нікмана катетера *in vitro*. Раад та ін. показали ефективність комбінації міноцикліну та динатрію-ЕДТА проти біоплівки *in vitro* або на експлантованих кінчиках катетерів, а також при лікуванні інфекцій крові, пов'язаних з катетером, у трьох різних дослідженнях пацієнтів.

Розчин міноцикліну-ЕДТА також був успішно використаний для запобігання постійним імплантованим портовим інфекціям у дітей, хворих на рак; не спостерігалось портових інфекцій та інших побічних ефектів у пацієнтів, порти яких промивались розчином моноцикліну-ЕДТА, тоді як у 21 % пацієнтів у групі, що не отримувала такої обробки, розвинулась інфекція. Більше того, у гемодіалізних пацієнтів після обробки катетерів міноцикліном-ЕДТА спостерігалось зменшення кількості катетерних інфекцій крові.

Маніпулювання дисперсійними сигналами для руйнування біоплівки

Враховуючи, що планктонні клітини більш сприйнятливі до впливу, нова стратегія лікування, при якій сигнал для диспергування біоплівки поєднується з введенням антимікробного агента для знищення розпорошених організмів, може бути успішною. Як вже обговорювалося раніше, одним із сигналів, найбільш пов'язаних з розсіюванням/розпорошенням бактерій, є c-di-GMP. В недавньому дослідженні Ma et al. використано потенціал інженерного білка, який змушує біоплівки диспергуватися.

D-амінокислоти та норспермідин

Ідея маніпулювання факторами природної дисперсії для боротьби з біоплівками також була використана для грампозитивних організмів. Лосік та його колеги показали, що екзогенне додавання D-амінокислот, що продукуються при диспергуванні *B. subtilis*, порушує попередньо сформовані біоплівки, а також ефективно запобігає утворенню біоплівки *S. aureus* та *P. aeruginosa*. Цілком ймовірно, що D-амінокислоти сприяють розбиранню біоплівки, порушуючи взаємодію клейких волокон. Дійсно, дослідження Hochbaum et al. показали, що D-амінокислоти пригнічують утворення біоплівки *S. aureus*, запобігаючи локалізації білка на клітинній поверхні. Враховуючи, що D-амінокислоти виробляються багатьма бактеріальними видами, вони можуть забезпечити загальну стратегію розбирання біоплівки і, отже, можуть бути корисними в медичних та промислових антибіоплівкових застосуваннях. Друга молекула розбирання біоплівки була нещодавно

виявлена у *B. subtilis*; це норспермідин, який діє у доповнення D-амінокислот, вражаючи як мішень екзополісахарид. Як і у випадку з D-амінокислотами, властивості норспермідину інгібувати біоплівки не обмежувались *B. subtilis*. Інгібування біоплівки спостерігалось також у випадку біоплівки *S. aureus* та *E. coli*. Таким чином, норспермідин та інші поліаміни, синтезовані для зв'язування з конкретними екзополісахаридами, можуть бути використані спільно з D-амінокислотами як новий антибіоплівковий підхід.

Стратегії боротьби з біоплівкою для безпечності харчових продуктів зображено на рис. 33.

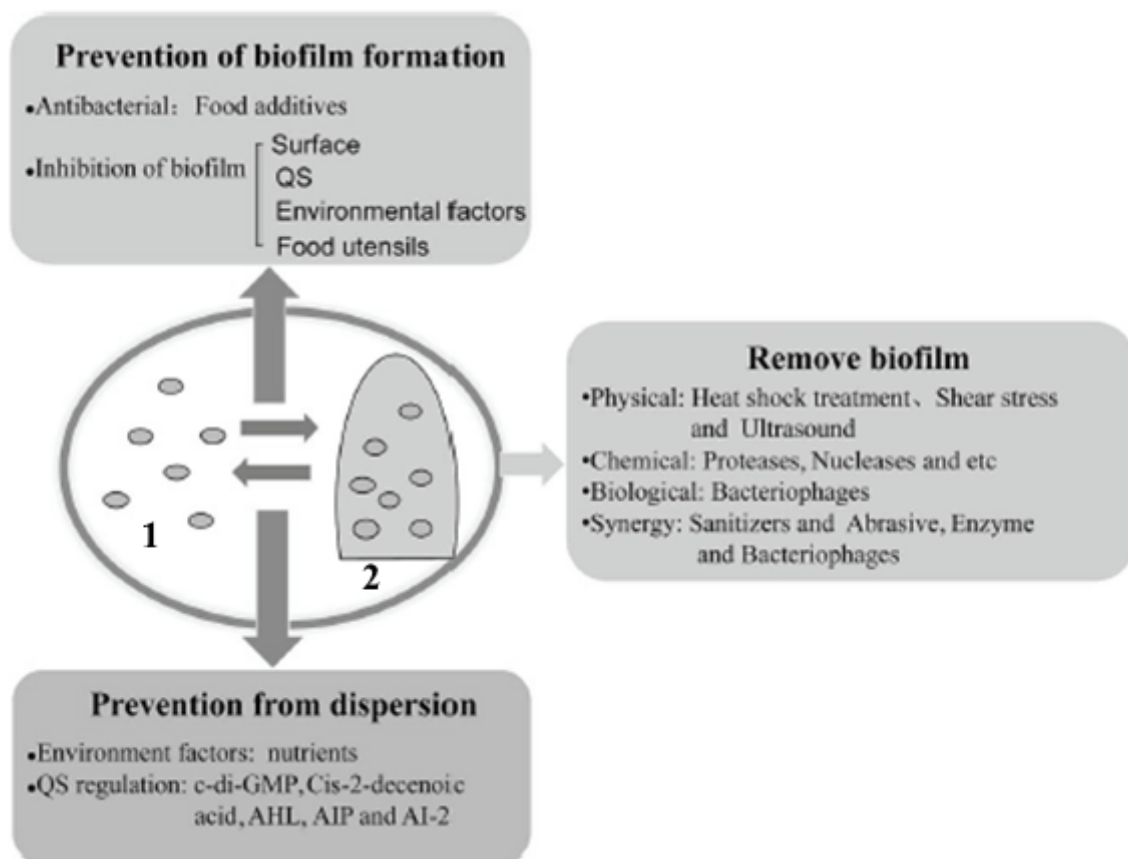


Рис. 33. Стратегії боротьби з біоплівкою для безпечності харчових продуктів. Моделі в колі - це формування та дисперсія біоплівки (1 - бактерії (зображено у вигляді кіл); 2 - зріла біоплівка (зображено із 3D-структурою біоплівки). Зріла біоплівка являє собою структуру 3D-плівки 3D-полімерної мережі, яка взаємопов'язує та відносно знерухомлює клітини біоплівки (Zhao et al., 2017)

Отже, формування біоплівки дозволяє бактеріальним збудникам колонізувати широкий спектр ніш хазяїна та зберігати свою діяльність у суворих умовах, що ускладнює їх знищення. Характеристики біоплівки визначають, наскільки, і які протимікробні засоби можуть бути ефективними. Вік і склад біоплівки є основними факторами, що впливають на сприйнятливість мікроорганізмів-резидентів. У міру дозрівання біоплівки посилене накопичення EPS в поєднанні з градієнтами поживних речовин та кисню, які впливають на клітинний метаболізм та швидкість росту, призводять до зменшення надходження та активності антимікробних засобів, завдяки чому патогени, що утворюють біоплівку, стають все більш стійкими до антибіотиків. Таким чином, нові стратегії, розроблені для блокування конкретного етапу біоплівки без знищення бактерій, такі як використання антиадгезійних засобів або використання природних, продукованих бактеріями сигналів для сприяння розповсюдженню бактерій, є шляхами для дослідження та, зрештою, розвитку швидкодіючої, потужної та біодоступної стратегії впливу/лікування.

Список рекомендованої літератури

1. Методи дослідження бактеріальних біоплівок: методичні вказівки до лабораторних робіт для студентів спеціальності 091. Біологія / Укладач Ткачук Н.В. Чернігів: НУЧК імені Т.Г. Шевченка, 2021. 39 с. URL: <https://epub.chnpu.edu.ua/jspui/handle/123456789/7717>
2. Biofilms: The Hypertextbook. Version 4.2. January 4, 2010. https://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public_version/
3. Dufour D., Leung V., Lévesque C.M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*. 2012. N 22. P. 2–16.
4. Fish K.E., Collins R., Green N.H., Sharpe R.L., Douterelo I., Osborn A.M., Boxall J.B. Characterisation of the physical composition and microbial community structure of biofilms within a model full-scale drinking water distribution system. *PLoS ONE*. 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0115824.
5. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews*. 2004. Vol.2. P. 95-108.
6. Høiby N. A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathogens and Disease*. 2014. Vol. 70. P. 205–211.
7. Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., Hultgren S.J. Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2013. 3:a010306. P. 1-23. URL: www.perspectivesinmedicine.org.
8. Lourenco A., Ferreira A., Veiga N., Machado I., Pereira M.O., Azevedo N.F. BioOmics: a web platform for the systematic and standardized collection of high-throughput biofilm data. *PLoS ONE*. 2012. Vol. 7(6): e39960. doi: 10.1371/journal.pone.0039960.
9. Microbial biofilms / Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. [eds]. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015.

10. Neu T.R., Lawrence J.R. Innovative techniques, sensors, and approaches for imaging biofilms at different scales. *Trends Microbiol.* 2015. Vol. 23. P. 233–242.
11. Oliveira R., Azeredo J., Teixeira P., Fonseca A. P. The role of hydrophobicity in bacterial adhesion. *BioLine*, 2001. P.11-22.
12. Pérez-Rodríguez G., Glez-Pena D., Azevedo N.F., Pereira M.O., Fdez-Riverola F., Lourenco A. *Enabling* systematic, harmonised and large scale biofilms data computation: the biofilms experiment workbench. *Comp. Meth. Progr. Biomed.* 2015. Vol. 118. P. 309–321.
13. Stewart Ph.S. Antimicrobial Tolerance in Biofilms. In: *Microbial biofilms*. Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. [eds]. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 269-285.
14. Tkachuk N., Zelena L., Lukash O., Mazur P. Microbiological and genetic characteristics of *Bacillus velezensis* bacillibactin-producing strains and their effect on the sulfate-reducing bacteria biofilms on the poly(ethylene terephthalate) surface. *Ecological Questions*. 2021. 32(2). P.119-129. doi: 10.12775/EQ.2021.019
15. Tkachuk N., Zelena L., Mazur P. Properties of anaerobic bacteria from ferrosphere crucial for biofilm development. *Ecological Questions*. 2021. Vol. 32, No 4. P. 107-112. doi: 10.12775/EQ.2021.036
16. Tkachuk N., Zelena L. Biofilms of some anaerobic bacteria on the polyethylene terephthalate surface. International Conference on Biological Research and Applied Science (IBRAS 2021). *Advances in Microbiology* (January 20-21, 2021, Karachi, Pakistan). P. 88-90. doi: 10.37962/IBRAS/2021/88-90
17. Tkachuk N., Zelena L. The intensity of biofilm formation by heterotrophic bacteria isolated from soil ferrosphere. *Ecological Questions*. 2023. Vol. 34, No 2.

18. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. In: Microbial biofilms / Ghannoum M., Parsek M., Whiteley M., Mukherjee P.K. [eds]. 2nd edition. Washington DS: Asm Press, 2015. P. 51-66.
19. Yadav M.K. Role of Biofilms in Environment Pollution and Control. Microbial Biotechnology. Vol.1. Applications in Agroculture and Environment. Patra J.K., Vishnuprasad Ch.N., Das G. [eds]. Singapore: Springer Nature, 2017. P. 377-398.
20. Zhang B., Powers R. Analysis of bacterial biofilms using NMR_based metabolomics. *Future Med. Chem.* 2012. Vol. 4. P. 1273–1306.

Для нотаток

Навчальне видання

Ткачук Наталія Василівна

**Біоплівки та біообростання:
збірник лекцій для студентів та аспірантів
природничих спеціальностей закладів вищої освіти**

Чернігів, Десна Поліграф, мова українська

Літературний редактор **Наталія Ткачук**

Технічний редактор **Олег Єрмоленко**

Підписано до друку 25.01.2023 р.

Формат 60x84/16. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman Суг.

Ум. друк. арк. 10,46. Ум. фарб.-відб. 10,46. Обл.-вид. арк. 11,25.

Зам. 0006. Наклад 100 прим.

ТОВ «Видавництво «Десна Поліграф»

Свідоцтво про внесення суб'єкта видавничої справи до Державного реєстру
видавців, виготівників і розповсюджувачів видавничої продукції.

Серія ДК № 4079 від 1 червня 2011 року

Тел. +38-097-385-28-13

Віддруковано ТОВ «Видавництво «Десна Поліграф»

14035, м. Чернігів, вул. Станіславського, 40