

Молекулярно-генетические методы изучения биопленок микроорганизмов

Е.В.Детушева, П.В.Слукин, Н.К.Фурсова

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация

Обзорная статья содержит сведения о клинической значимости биопленок микроорганизмов и основных современных молекулярно-генетических методах, применяемых для изучения микробных биопленок: сравнительное изучение геномов, транскриптомов и протеомов планктонных клеток и клеток в составе биопленок; генетический контроль продукции внеклеточного матрикса биопленок; анализ вклада отдельных генов и кластеров генов в формирование фенотипа биопленкообразования; идентификация видов микроорганизмов в полимикробных биопленках.

Ключевые слова: биопленки микроорганизмов, молекулярно-генетические методы, геном, транскриптом, протеом, видовая идентификация микроорганизмов

Для цитирования: Детушева Е.В., Слукин П.В., Фурсова Н.К. Молекулярно-генетические методы изучения биопленок микроорганизмов. Бактериология. 2020; 5(2): 49–55. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-49-55

Molecular-genetic methods for studying microbial biofilms

E.V.Detusheva, P.V.Slugin, N.K.Fursova

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор, Obolensk, Russian Federation

The review article contains information on the clinical significance of microbial biofilms and the main modern molecular genetic methods used to study microbial biofilms: comparative study of genome, transcriptome and proteome of planktonic cells and biofilms; genetic control of biofilm extracellular matrix production; analysis of the contribution of individual genes and gene clusters to the formation of the biofilm phenotype; identification of microorganism species in polymicrobial biofilms.

Key words: microbial biofilms, molecular genetic methods, genome, transcriptome, proteome, microbial species identification

For citation: Detusheva E.V., Slugin P.V., Fursova N.K. Molecular-genetic methods for studying microbial biofilms. Bacteriology. 2020; 5(2): 49–55. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-2-49-55

Биопленки представляют собой сообщества агрегированных клеток микроорганизмов, окруженных внеклеточным полимерным матриксом и прикрепленных к абиотической или биотической поверхности. Биопленки считаются одним из наиболее широко распространенных и успешных способов организации микробной жизни на Земле в большинстве природных экологических ниш [1]. По данным Национального института здоровья (НИИ) США, около 80% бактериальных инфекций человека ассоциированы с микробными биопленками и с трудом поддаются лечению [2]. Кроме того, многие бактерии-комменсалы человека, входящие в состав кишечной микрофлоры, носоглотки и других сайтов тела, существуют в виде биопленок [3]. Способность к биопленкообразованию относят к числу факторов вирулентности микроорганизмов, позволяющих им успешно

колонизировать организм хозяина. Это свойство характерно, в том числе, для группы патогенов, представляющих в настоящее время главную угрозу здоровью людей из-за распространения среди них мультирезистентных штаммов: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp. и *Salmonella* spp. [4].

По морфологии и биологическим характеристикам микроорганизмы в биопленке существенно отличаются от планктонных клеток. Трехмерная структура биопленки представляет собой естественный барьер, защищающий микроорганизмы, поэтому неподвижные клетки, окруженные внеклеточным матриксом, более устойчивы к экстремальным условиям окружающей среды по сравнению с планктонными клетками [5]. Важное различие между двумя образами

Для корреспонденции:

Детушева Елена Владимировна, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 2.

Телефон: (4967) 36-0079

E-mail: DetushevaEV@obolensk.org

Статья поступила 30.07.2020 г., принята к печати 15.09.2020 г.

For correspondence:

Elena V. Detusheva, researcher of laboratory antimicrobial agents of department molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор.

Address: 2 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0079

E-mail: DetushevaEV@obolensk.org

The article was received 30.07.2020, accepted for publication 15.09.2020

жизни заключается в том, что планктонные клетки и клетки биопленки не имеют одинаковых транскриптомов или протеомов. Возможно, наиболее заметным фенотипическим различием между биопленками и планктонными клетками является тот факт, что клетки биопленок гораздо менее восприимчивы к внешним воздействиям, чем их генетически идентичные планктонные аналоги. В частности, биопленки обладают высокой толерантностью и устойчивостью к антимикробным препаратам, что осложняет выбор адекватной антибиотикотерапии инфекций, ассоциированных с биопленками. Толерантность к антибиотикам, как правило, является временным и ненаследуемым фенотипом микробных клеток, а устойчивость – это приобретенное и наследуемое свойство микроорганизмов [6]. Толерантность и резистентность к антибактериальным препаратам обеспечиваются у биопленок несколькими молекулярными механизмами: наличием физического барьера в виде межклеточного матрикса, затрудняющего проникновение антибиотиков [7]; наличием субпопуляций микробных клеток с пониженной метаболической активностью [8]; увеличением среднего числа на микробную клетку копий плазмид, несущих гены антибиотикорезистентности, и увеличением транскрипции этих генов [9]; повышенным уровнем горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности и частоты мутаций этих генов [10, 11], активацией эффлюксных насосов клеток [12].

Исследование структуры и функций биопленок требует использования микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических и других методов (таблица).

Выявление генетических структур, участвующих в биопленкообразовании

Для идентификации генетических структур, контролирующей свойство биопленкообразования, были широко использованы молекулярно-генетические методы детекции генов и корреляция их наличия с фенотипом формирования биопленки. Например, скрининг генов *ALS2*, *LIP1*, *LIP4* и *APT1-4* *Candida tropicalis* показал их роль в формировании биопленки, поскольку они кодируют свойства адгезии и секрецию аспартил-протеиназ и фосфолипаз, участвующих в прикреплении к поверхностям. Выявленные в генах однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), а также инсерции и делеции коррелировали с разными фенотипами биопленкообразования. Некоторые делеции приводили к полной утрате способности к адгезии и образованию биопленок [13]. Методом делеционных мутантов установлена роль оперона *dltABCD*, кодирующего белки внешних мембран, для формирования биопленок и толерантности к антибиотикам у *Streptococcus mutans*, *S. aureus* и *Enterococcus faecalis* [14].

Визуализация расположения бактериальных клеток в биопленках была продемонстрирована с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Наличие редкого возбудителя *Aerococcus urinae* было обнаружено этим методом в сердечных клапанах при эндокардите, при этом микробиологически возбудитель не был детектирован [15].

Подтверждение взаимосвязи геномов с фенотипическими признаками было продемонстрировано на примере трудно культивируемых бактерий *Fusobacterium nucleatum*, которые являются ключевым членом биопленки ротовой полости человека. Выявлены штаммы *F. nucleatum* с дефек-

тами образования биопленки, которые имели мутации в генах белков *FtsX* и *EnvC*, контролирующих клеточное деление, и белка *RnfA*, участвующего в транспорте электронов. Методом транспозонного мутагенеза и делеционных мутантов показана роль генов *ftsX* или *envC* в формировании биопленки нормального вида или в виде нитчатых структур [16].

При изучении биопленок *Salmonella* сероваров Typhimurium, Virchow, Enteritidis и Montevideo продемонстрировано влияние генов *dam* и *seqA*, контролирующих метилирование и репликацию ДНК, на образование биопленки. У делеционных мутантов по этим генам в экспериментах по одноэтапной Lambda red-рекомбинации была восстановлена способность к формированию биопленок и пелликул [17].

Интересные результаты получены в работе Hazan et al. (2016), которые с помощью делеционных мутантов по генам системы кворума продемонстрировали взаимосвязь механизма кворума клеток (QS) в биопленке *P. aeruginosa* с механизмом переноса электронов в дыхательной цепи и автолизом клеток. По мнению авторов, это демонстрирует сходство с начальным митохондриально-опосредованным этапом апоптоза у эукариот [18].

Метагеномные и полногеномные методы исследования

Изучение полных геномов возбудителей инфекционных заболеваний позволило расширить понимание молекулярно-генетических механизмов формирования фенотипов антибиотикорезистентности и биопленкообразования. При использовании метагеномного анализа удалось выявить многокомпонентность биопленок ротовой полости человека [19]. При изучении полного генома возбудителя язвенной инфекции стопы *P. aeruginosa*, который характеризовался сильно выраженной способностью к биопленкообразованию, были идентифицированы гены антибиотикорезистентности (*aph*, *blaOXA*, *blaPAO*, *fosA*, *catB*, *tetG*), а также гены, кодирующие эффлюксные насосы MexAB, MexC и MexD [20].

Полногеномное исследование биопленок *Bacillus cereus* с использованием транспозонного мутагенеза показало важность 23 генов для формирования фенотипа биопленок. Основываясь на предсказании функций этих генов, они контролируют биосинтез нуклеотидов, утилизацию железа, продукцию антибиотиков, синтез АТФ-зависимой протеазы и регуляторов транскрипции [21].

Транскриптомы биопленок

В третью группу экспериментальных подходов входят методы оценки транскриптома бактерий, позволяющие выявить активные (экспрессируемые) участки геномов в планктонных клетках и в биопленках. Показано, что субпопуляции бактерий в биопленках физиологически неоднородны, что затрудняет изучение биопленок, поскольку многие экспериментальные процедуры, такие как, например, тестирование на чувствительность и транскриптомное профилирование, оценивают биопленку в целом, а не отдельные группы клеток. Еще одно важное различие планктонных клеток и биопленок состоит в том, что их транскриптомы и протеомы существенно различаются, что отражается в фенотипических различиях между этими двумя формами существования бактерий [22].

Таблица. Молекулярно-генетические методы изучения биопленок		
Наименование метода	Основные результаты	Автор, год, ссылка
<i>Выявление генетических структур, участвующих в биопленкообразовании</i>		
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с последующим секвенированием наработанного фрагмента ДНК	Скрининг гена ALS2 в 68 изолятах <i>C. tropicalis</i> показал, что делеции в областях 1697-1925 и 2073-2272 коррелируют с низкой способностью образовывать биопленку	Zhang L.J., 2019 [13]
Метод делеционных мутантов	Установлена роль оперона <i>dltABCD</i> , кодирующего белки внешних мембран, для формирования биопленок и толерантности к гентамицину, ванкомицину, колистину и полимиксину <i>S. mutans</i> , <i>S. aureus</i> и <i>E. faecalis</i> . Показана зависимость регуляции экспрессии оперона <i>dltABCD</i> в биопленках <i>S. mutans</i> от двухкомпонентной системы CiarH	Nilsson M., 2019 [14]
Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH) для визуализации локализации клеток в биопленке	На эндокардиальном клапане с помощью олигонуклеотидного зонда к неспецифическому участку гена 16S рРНК было визуализировано расположение биопленки, а с помощью специфического зонда определено присутствие в биопленке <i>A. urinae</i>	Yaban B., 2020 [15]
Транспозонный мутагенез <i>F. nucleatum</i> , введение с помощью плазмиды в хромосому бактерий мобильных генетических элементов – транспозонов, культивирование биопленки, отбор клонов с измененным фенотипом биопленки, локализация мутации	Выявлены штаммы <i>F. nucleatum</i> с дефектами образования биопленки, которые имели мутации в генах белков клеточного деления <i>FtsX</i> и <i>EnvC</i> , гене белка транспорта электронов <i>RnfA</i> , а также в генах белков с неидентифицированными функциями. Мутанты <i>F. nucleatum</i> с делециями генов <i>ftsX</i> или <i>envC</i> характеризовались продукцией биопленки в виде нитчатых структур, которые сохраняли способность к адгезии. Выдвинуто предположение, что роль генов <i>ftsX</i> и <i>envC</i> заключается в формировании пространственной структуры биопленки	Wu C.A., 2018 [16]
Получение мутантов <i>Salmonella</i> сероваров методом одноэтапной Lambda red-рекомбинации, комплементация поврежденных генов методом генетической трансформации	Мутанты <i>Salmonella</i> сероваров Typhimurium, Virchow, Enteritidis и Montevideo по генам <i>dam</i> и <i>seqA</i> имели сниженную способность формировать биопленку на полистироле и не способны были образовать пелликулу в жидкой среде. Полноценные гены <i>dam</i> и <i>seqA</i> , клонированные в векторе pBAD24 и введенные в мутантные клетки методом трансформации, восстанавливали способность продукции биопленку и пелликулу	Uğur S., 2018 [17]
Изучение делеционных мутантов <i>P. aeruginosa</i> по гену <i>lasR</i> , регулятору QS и генов оперона <i>pqsABCDL</i> , кодирующего синтез HQNO	Высказана гипотеза о координации механизма кворума клеток (QS) в биопленке <i>P. aeruginosa</i> с механизмом переноса электронов в дыхательной цепи и мембранным потенциалом клеток. Показано, что QS способствует формированию толерантности биопленки к меропенему, вызывая автолиз клеток и выброс внеклеточной ДНК в матрикс биопленки	Hazan R., 2016 [18]
<i>Метагеномные и полногеномные методы исследования</i>		
Метагеномный анализ состава биопленки ротовой полости человека	Метагеномный анализ биопленки из слюны человека продемонстрировал многокомпонентность биопленки с преобладанием <i>Lactobacillus fermentum</i> на ранних стадиях созревания биопленки и <i>Streptococcus</i> – на более поздних.	Edlund A., 2018 [19]
Полногеномное секвенирование по технологии Nano pore, биоинформационный анализ с помощью программы ResFinder (https://cge.cbs.dtu.dk)	Полногеномный анализ возбудителя язвенной инфекции стопы <i>P. aeruginosa</i> , сильного продуцента биопленки, выявил в его геноме детерминанты антибиотикорезистентности (<i>aph</i> , <i>blaOXA</i> , <i>blaPAO</i> , <i>fosA</i> , <i>catB</i> , <i>tetG</i>), гены эффлюксных насосов MexAB, MexC and MexD; генетические детерминанты вторичных метаболитов, гомосерин-лактона, бактериоцинов, феназина, бета-лактона, пиоцианина, пиохелина, пирролизиксенамида и танамицина	Srivastava P., 2020 [20]
Изучение полных геномов вариантов штаммов <i>B. cereus</i> , полученных транспозонным мутагенезом	Транспозонный мутагенез <i>B. cereus</i> показал, что штаммы, дефектные по образованию биопленки, имели мутации в генах <i>clpY</i> , <i>spollAD</i> , <i>comER</i> , <i>purD</i> , <i>soj</i> , <i>glgB</i> , <i>purH</i> , <i>fluB</i> , <i>modA</i> , <i>pepP</i> , <i>brnQ</i> , <i>cwlD</i> , <i>ywbE</i> , а также еще в 10 участках генома, выполняющих различные функции	Yan F., 2017 [21]
<i>Транскриптомные биопленок</i>		
Транскриптомный анализ с помощью РНК-секвенирования (RNA-seq), геномный анализ штаммов <i>B. cereus</i> на возможность биопленкообразования	Идентифицированы 23 гена <i>B. cereus</i> , повреждение которых в результате инсерции транспозона приводило к изменению фенотипа биопленкообразования. Эти гены контролировали биосинтез нуклеотидов, утилизацию железа, продукцию антибиотиков, АТФ-зависимых протеаз и транскрипционных регуляторов. В ходе транскрипционного анализа идентифицировано 500 генов, экспрессия которых отличается в планктонных клетках и в биопленках	Yan F., 2017 [21]
Получение мутантных штаммов <i>S. aureus</i> по гену <i>mgrA</i> , сравнительный анализ изогенных штаммов, выделение тотальной мРНК, синтез кДНК, количественная ПЦР в реальном времени	Изучены регуляторные механизмы, контролирующие экспрессию оперона <i>psm</i> , кодирующего амфипатические пептиды, продуцируемые <i>S. aureus</i> при формировании биопленки. Показано, что белок MgrA специфично связывается с промоторным регионом оперона <i>psm</i> . Показано, что формирование биопленки и ее распространение существенно снижается у мутантов по гену <i>mgrA</i> . Белок MgrA является негативным регулятором оперона <i>psm</i> , который репрессирует его транскрипцию	Jiang Q., 2017 [23]
Выделение ДНК и РНК из биопленок, синтез кДНК, определение копий плазмид, qRT-PCR, индукция планктонных клеток и клеток биопленок, проточная цитометрия, флуоресцентно-активированный клеточный сортинг (FACS), анализ генома единичной клетки	Продemonстрировано повышенное увеличение копий плазмиды pCF10 в биопленке <i>E. faecalis</i> , повышенная транскрипция генов антибиотикорезистентности, локализованная на этих плазидах, что было характерно для субпопуляции клеток биопленки. Данное свойство утрачивалось при переходе клеток в планктонное состояние	Cook L.C., 2013 [24]
Молекулярное клонирование генов <i>acrA</i> и <i>acrB</i> , получение делеционных мутантов, <i>in silico</i> анализ, секвенирование РНК, анализ экспрессии мРНК, получение продуцентов и очистка рекомбинантных продуктов	Показано, что экспрессия генов <i>acrA/B</i> была снижена у делеционного мутанта по гену <i>anoR</i> системы QS. Установлено наличие AcrR-связывающего мотива в промоторной области гена <i>anol</i> , кодирующего N-ацил-гомосерин-лактон-синтазу, и гена регулятора <i>anoR</i> . Продemonстрирована транскрипционная регуляция системы QS продуктом AcrR. Эффлюксный насос AcrAB играет важную роль в формировании биопленок и антибиотикорезистентности	Subhadra B., 2020 [25]

Таблица. Молекулярно-генетические методы изучения биопленок (окончание)		
Метод ДНК-микрочипов, иммунопреципитации и делеционных мутантов	Показано, что BrIR (biofilm resistance locus regulator) является прямым активатором транскрипции эффлюксных насосов семейства RND (resistance-nodulation-division), кодируемых оперонами mexAB-oprM и mexEF-oprN	Liao J., 2013 [26]
Анализ транскриптов делеционных мутантов по гену <i>ndvB</i> и клеток дикого типа <i>P. aeruginosa</i>	Изучен продукт гена <i>ndvB</i> в биопленках <i>P. aeruginosa</i> , обеспечивающий устойчивость к тобрамицину. Транскрипты гена <i>ndvB</i> были представлены в биопленках в 20 раз выше, чем в планктонных клетках. Показано, что циклические глюканы, производные NdvB, могут играть роль в передаче сигналов между клетками в биопленках. Путь окисления этанола представлен как новый механизм резистентности к антибиотикам, специфичный для биопленок, который ранее не был описан	Beaudoin T., 2012 [27]
Метранскриптомный анализ с использованием секвенирования эволюционно консервативных генов	Количество генов, экспрессируемых в биопленке, различалось на разных стадиях роста биопленки. Изучена динамика изменений передачи межклеточных сигналов, поглощения железа, реакции на изменение pH. Описаны ранее неизвестные функции патогена <i>L. fermentum</i> , вызывающего тяжелые формы кариеса, связанные со способностью выживать при низких значениях pH	Edlund A., 2018 [19]
Транскриптомный анализ штамма <i>B. cereus</i> и его мутантов, полученных с помощью транспозонного мутагенеза	Выявлены 500 генов, которые дифференциально экспрессировались в клетках при формировании биопленки, в том числе гены, вовлеченные в биосинтез пурина <i>pur</i> , ген <i>aad</i> , кодирующий бифункциональную алкоголь/альдегид дегидрогеназу. В условиях индукции биопленкообразования с помощью глицерин-MnSO ₄ экспрессия 350 генов увеличивалась, а 140 генов – уменьшалась	Yan F, 2017 [21]
<i>Протеомы биопленок</i>		
Биоинформационный анализ, мутационный анализ, филогенетический анализ штаммов <i>S. aureus</i> и <i>S. epidermidis</i>	Описана классификация белков семейства CWA <i>S. aureus</i> – их структура, биологическая функция, связь с формированием биопленки <i>S. epidermidis</i> и возможная роль в качестве терапевтических мишеней для разработки иммунотерапевтических методов лечения для предотвращения инфекций, вызываемых <i>S. epidermidis</i>	Ortega-Pe a S., 2020 [28]
Атомно-силовая микроскопия, биоинформационный анализ, мутационный анализ, филогенетический анализ, метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса природных штаммов <i>P. fluorescens</i>	Показана роль в образовании и рассеивании биопленок белка LapA массой 520 кДа, экспонированного на поверхности клетки, который представляет собой документально подтвержденный адгезин. LapA кодируется в составе кластера генов системы секреции T1SS и регуляторных белков либо независимо от этого кластера	Collins A.J., 2020 [29]
Биоинформационный анализ, мутационный анализ, филогенетический анализ уropатогенных штаммов <i>E. coli</i>	Описаны белковые субъединицы, из которых состоят функциональные амилоидные волокна, вырабатываемые бактериями и являющиеся важным компонентом внеклеточного матрикса, который защищает клетки от стрессоров окружающей среды. Показано, что функциональные амилоидные волокна (curli), обнаруженные во внеклеточном матриксе <i>E. coli</i> , представляют собой гетерополимеры семейства белков Csg, роль которых в сборке curli заключается в стимулировании или ингибировании агрегации бактериальных клеток	Jain N., 2019 [30]
Биоинформационный анализ, протеомный анализ биопленок <i>P. aeruginosa</i>	Выявлен порин OprF внешней мембраны в матриксе биопленки и в пузырьках внешней мембраны <i>P. aeruginosa</i> . Изучена клеточная структура и роль матричных белков внешней мембраны OprF, LecB и OprA в образовании биопленок и формировании иммунного ответа микроорганизма	Cassin E.K., 2019 [31]
Метод масс-спектрометрии (SWATH-MS), нанопоточная хроматография, жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия, полногеномное секвенирование клинических изолятов <i>P. aeruginosa</i>	Описаны протеомы 27 клинических изолятов бактерий <i>P. aeruginosa</i> . Профили экспрессии белков регистрировали у изолятов, культивируемых в планктонной и биопленочной форме, с использованием последовательной регистрации всех теоретических фрагментных ионных спектров масс-спектрометрии (SWATH-MS)	Erdmann J., 2019 [32]

Так, в исследовании Yan F et al., 2017, были идентифицированы 23 гена *B. cereus* (контролирующие биосинтез нуклеотидов, утилизацию железа, продукцию антибиотиков, АТФ-зависимых протеаз и транскрипционных регуляторов), повреждение которых инсерцией транспозона приводило к изменению фенотипа биопленкообразования (нитчатые структуры). Кроме того, в ходе транскрипционного анализа идентифицированы 500 генов, экспрессия которых отличалась в планктонных клетках и в биопленках [21]. В другом исследовании при изучении биопленок *S. aureus* была установлена роль белка MgrA как негативного регулятора экспрессии оперона *rsm*, кодирующего амфипатические пептиды, важного не только для формирования биопленок, но и для вирулентности этого патогена. У мутантов по гену *mgrA* была снижена способность к образованию биопленки [23].

Показано, что в процессе образования биопленок в бактериях увеличивалось среднее число копий плазмид и возрастала их гетерогенность. На примере *E. faecalis* было выявлено, что среднее число копий плазмиды pCF10, несущей гены устойчивости к антибиотикам, было увеличено в био-

пленках по сравнению с таковым в планктонных клетках; в присутствии ингибирующих концентраций антибиотиков активировалась транскрипция плазмидно-локализованных генов антибиотикорезистентности [24].

Отмечается, что эффлюксные насосы играют важную роль не только в формировании устойчивости бактерий к антимикробным препаратам, но и связаны с индукцией процесса образования биопленок. Например, анализ *in silico* показал, что делеция генов, кодирующих широко распространенные среди различных видов бактерий эффлюксные насосы AcrAB, приводила к снижению устойчивости к антибиотикам, и к уменьшению способности к образованию биопленок у *Acinetobacter nosocomialis*. В данной работе установлена взаимосвязь биопленкообразования и системы кворума: белок AopR, являющийся частью системы QS, был регулятором транскрипции оперона эффлюксного насоса *acrAB* [25].

Было показано, что у *P. aeruginosa* максимальная экспрессия генов эффлюксных насосов MexAB-OprM и MexEF-OprN была связана с высоким уровнем устойчивости к антибиоти-

кам биопленок и регулировалась активатором транскрипции типа MerR BrIR. Инактивация названных эффлюксных насосов приводила к тому, что биопленки становились более чувствительными к бактериостатическим антибиотикам пяти функциональных классов, сохраняя устойчивость к бактерицидным препаратам [26]. В исследовании Beaudoin et al. (2012) было показано, что ген *ndvB*, кодирующий глюкозилтрансферазу, обеспечивающую устойчивость *P. aeruginosa* к тобрамицину, влиял на экспрессию множества генов в биопленках. Транскрипты гена *ndvB* были в 20 раз более представлены в биопленках, чем в планктонных клетках. Продукт этого гена NdvB, участвующий в цикле окисления этанола, играет важную роль в передаче сигналов между клетками в биопленках. Таким образом, путь окисления этанола представлен как новый механизм резистентности к антибиотикам, специфичный для биопленок [27].

С помощью метагеномного анализа на примере бактериального сообщества биопленок ротовой полости было показано, что изменение состава окружающей среды, в том числе pH, в ряде случаев является триггерным механизмом, запускающим изменение процессов транскрипции генов в клетках биопленок [19]. В другом исследовании были выявлены около 500 генов *B. cereus*, которые дифференциально экспрессировались в условиях индукции биопленкообразования присутствием в среде глицерин-MnSO₄, при этом экспрессия 350 генов повышалась, 140 генов – уменьшалась. К первой группе генов относились гены, кодирующие небольшие молекулы (этанол, ацетат, лактат, ацетоин и 2,3-бутандиол), биосинтез пуринов, GTP-гомеостаз, нуклеотидный сигналинг ppGpp, циклический c-pp-GMP; стрессовый сигма-фактор SigB; компоненты холин-антихолиновой системы. Ко второй группе были отнесены гены цикла трикарбоновых кислот, кислородного дыхания, биосинтеза жирных кислот и токсинов (гемолизина, энтеротоксина и перфринголизина O) [21].

Протеомы биопленок

Идентификация молекулярных механизмов биопленкообразования важна с точки зрения выбора конкретных молекул, которые могут быть использованы в качестве мишеней при разработке антибактериальных, антибиопленочных и иммунотерапевтических средств. Методы протеомики направлены на выявление и характеристику таких механизмов и мишеней. Примером такого исследования является работа по изучению белков семейства CWA *S. aureus*, участвующих в начальной адгезии и клеточной агрегации при образовании биопленок, направленного на разработку препаратов против инфекций, вызываемых *S. aureus* и *S. epidermidis* [28]. При изучении формирования биопленок *Pseudomonas fluorescens* была показана важность белка адгезина LapA, локализованного на внешней мембране бактерий, белка LapD, являющегося рецептором сигнальной молекулы c-di-GMP, а также белка LapG, периплазматической протеазы. Белки LapD и LapG совместно контролируют удержание или высвобождение белка LapA с поверхности клетки, что контролируется также сложной сетью ферментов, метаболизирующих c-di-GMP [29].

Важно подчеркнуть, что некоторые белки протеома бактерий функционируют в «изначально неупорядоченном» состоянии (*intrinsically disordered proteins* – IDP), не имеют ста-

бильной структуры, существуют в виде динамического ансамбля конформаций, которые позволяют им функционально взаимодействовать с множеством субстратов. Такое многообразие вносит вклад в различные клеточные биологические процессы, в том числе в биопленкообразование, влияя на переключение метаболизма клеток при переходе от планктонной формы к биопленочной. Конформационная динамика IDP обеспечивает также «расплавление глобул» белков, что приводит к образованию олигомеров и амилоидов. Например, функциональные амилоидные волокна (curli), обнаруженные во внеклеточном матриксе *Escherichia coli*, представляют собой гетерополимеры двух белков, CsgA и CsgB. Создание ингибиторов процесса образования амилоидов рассматривается как одна из наиболее привлекательных стратегий борьбы с биопленками [30].

Белки внеклеточного матрикса *P. aeruginosa* до настоящего времени остаются недостаточно изученными. На сегодняшний день охарактеризованы функции только нескольких белков: CdrA, участвующего в межклеточной адгезии и формировании структуры биопленки, амилоидного белка Fap, обеспечивающего жесткость биопленки, белка LecB, участвующего в построении пространственной структуры биопленки, и матричного белка OprF. В качестве компонента внешней мембраны *P. aeruginosa* белок-порин OprF принимает двойную конформацию и участвует в транспорте веществ, а также в обеспечении целостности клеточной оболочки. Белок OprF, наряду с другими поринами семейства OprA, важен для адгезии бактерий к эукариотическим клеткам-хозяевам, в том числе к альвеолярным эпителиальным клеткам человека, что было подтверждено в экспериментах с изогенными штаммами мутантов по гену *oprF* [31].

При изучении ионных спектров протеомных профилей планктонных клеток и биопленок *P. aeruginosa* методом масс-спектрометрии SWATH-MS были идентифицированы более 1000 белков, которые в разной степени продуцировались неприкрепленными клетками и биопленками. Например, у биопленок существенно выше был уровень продукции белков, участвующих в утилизации железа, передаче сигналов QS, биосинтезе жирных кислот, а также белков внешней мембраны [32].

Заключение

Развитие молекулярно-генетических методов исследования бактериальных биопленок внесло значительный вклад в понимание процессов, лежащих в основе генетического контроля перехода клеток бактерий из планктонного к биопленочному образу жизни. Выявлены различия в степени биопленкообразования у разных видов микроорганизмов, вовлеченности разных молекулярных механизмов в изменение метаболизма клеток при переходе их одного состояния в другое. Идентифицированы гены и генетические кластеры, участвующие в формировании биопленки, в том числе определяющие изменение самих бактерий и обеспечивающие продукцию внеклеточного матрикса.

Можно выделить три основных методологических подхода, использованных исследователями при изучении феномена биопленкообразования у микроорганизмов: геномный и метагеномный анализ, транскриптомный анализ и анализ

протеомов. Эти подходы взаимно дополняют друг друга, обеспечивая возможность проследить реализацию генетического потенциала микроорганизмов в разных экологических нишах, в том числе в макроорганизме.

Биопленкообразование у микроорганизмов тесно связано с биохимическими клеточными процессами, а особенно четко прослеживается взаимодействие с системой кворума, с внутриклеточным уровнем циклического дигуанозинмонофосфата c-di-GMP, универсальной регуляторной молекулы, участвующей в регуляции подвижности, ориентации в пространстве, адгезии и регуляции генов. Внеклеточный матрикс, как неотъемлемая часть биопленок, представляет собой сложное видоспецифичное образование, включающее в себя не только белковые, но и полисахаридные и полинуклеотидные компоненты. Формирование структуры матрикса биопленки, а также различные фенотипические свойства клеток биопленки регулируются сетью молекулярных переключателей различного уровня, от геномного до молекулярного, одну из ведущих ролей среди которых играют двухкомпонентные системы регуляции бактерий.

Понимание процессов формирования биопленок у микроорганизмов, в первую очередь патогенных и условно-патогенных, а также выработка подходов для предотвращения биопленкообразования представляются важными для обоснованной разработки новых методов и эффективных терапевтических препаратов для лечения инфекций, ассоциированных с образованием биопленок.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература/References

1. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160705
2. Mirzaei R, Mohammadzadeh R, Alikhani MY, Shokri Moghadam M, Karampoor S, Kazemi S, et al. The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life.* 2020 Jul;72(7):1271-1285. DOI: 10.1002/iub.2266
3. Окулич ВК, Кабанова АА, Плотников ФВ. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. Витебск: ВГМУ; 2017, 300 с. / Okulich VK, Kabanova AA, Plotnikov FV. Mikrobnye bioplenki v klinicheskoi mikrobiologii i antibakterial'noi terapii. Vitebsk, 2017, 300 p. (In Russian).
4. M Campos JC, Antunes LC, Ferreira RB. Global priority pathogens: virulence, antimicrobial resistance and prospective treatment options. *Future Microbiol.* 2020 May;15:649-677. DOI: 10.2217/fmb-2019-0333
5. Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: The Microbial "Protective Clothing" in Extreme Environments. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3423. DOI: 10.3390/ijms20143423
6. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015;34(5):877-86. DOI: 10.1007/s10096-015-2323-z
7. Ciofu O, Tolker-Nielsen T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. *Front Microbiol.* 2019;10:913. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00913
8. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2017 May 1;41(3):276-301. DOI: 10.1093/femsre/fux010
9. Cook LC, Dunny GM. Effects of biofilm growth on plasmid copy number and expression of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1850-6. DOI: 10.1128/AAC.02010-12
10. Sabaté Brescó M, Harris LG, Thompson K, Stanic B, Morgenstern M, et al. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Device-Related Infection. *Front Microbiol.* 2017;2(8):1401. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01401
11. Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(5):1053-6. DOI: 10.1093/jac/dkn044
12. Subhadra B, Surendran S, Lim BR, Yim JS, Kim DH, Woo K, et al. Regulation of the AcrAB efflux system by the quorum-sensing regulator AnoR in *Acinetobacter nosocomialis*. *J Microbiol.* 2020;58(6):507518. DOI: 10.1007/s12275-020-0185-2
13. Zhang LJ, Yu SB, Li WG, Zhang WZ, Wu Y, Lu JX. Polymorphism analysis of virulence-related genes among *Candida tropicalis* isolates. *Chin Med J (Engl).* 2019;132(4):446-53. DOI: 10.1097/CM9.000000000000069
14. Nilsson M, Givskov M, Twetman S, Tolker-Nielsen T. Inactivation of the pgmA Gene in *Streptococcus mutans* Significantly Decreases Biofilm-Associated Antimicrobial Tolerance. *Microorganisms.* 2019;7(9):310. DOI: 10.3390/microorganisms7090310
15. Yaban B, Kikhney J, Musci M, et al. *Aerococcus urinae* – a potent biofilm builder in endocarditis. *PLoS One.* 2020;15(4):e0231827. DOI: 10.1371/journal.pone.0231827
16. Wu CA, Al Mamun AM, Luong TT, et al. Forward genetic dissection of biofilm development by *Fusobacterium nucleatum*: novel functions of cell division proteins FtsX and EnvC. *mBio.* 2018 Apr 24;9(2):e00360-18. DOI: 10.1128/mBio.00360-18
17. Uğur S, Akçelik N, Yüksel FN, Taşkale Karatug N, Akçelik M. Effects of dam and seqA genes on biofilm and pellicle formation in *Salmonella*. *Pathog Glob Health.* 2018;112(7):368-77. DOI: 10.1080/20477724.2018.1539803
18. Hazan R, Que YA, Maura D, Strobel B, Majcherczyk PA, Hopper LR, et al. Auto Poisoning of the Respiratory Chain by a Quorum-Sensing-Regulated Molecule Favors Biofilm Formation and Antibiotic Tolerance. *Curr Biol.* 2016;26(2):195-206. DOI: 10.1016/j.cub.2015.11.056
19. Edlund A, Yang Y, Yooseph S, He X, Shi W, McLean JS. Uncovering complex microbiome activities via metatranscriptomics during 24 hours of oral biofilm assembly and maturation. *Microbiome.* 2018;6(1):217. DOI: 10.1186/s40168-018-0591-4
20. Srivastava P, Gomathinayagam S, Easwaran N, Sankar G, Padmavathi E, Shankar M, et al. Comparative data analysis of two multi-drug resistant homoserine lactone and rhamnolipid producing *Pseudomonas aeruginosa* from diabetic foot infected patient. *Data Brief.* 2020 Jul 25;32:106071. DOI: 10.1016/j.dib.2020.106071
21. Yan F, Yu Y, Gozzi K, Chen Y, Guo JH, Chai Y. Genome-wide investigation of biofilm formation in *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(13):e00561-00517. DOI: 10.1128/AEM.00561-17
22. Hall CW, Thien-Fah M. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.* 2017;41(3):276-301. DOI: 10.1093/femsre/fux010
23. Jiang Q, Jin Z, Sun B. MgrA Negatively regulates biofilm formation and detachment by repressing the expression of psm Operons in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(16):e01008-e01018. DOI: 10.1128/AEM.01008-18

24. Cook LC, Dunny GM. Effects of biofilm growth on plasmid copy number and expression of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Apr;57(4):1850-6. DOI: 10.1128/AAC.02010-12.
25. Subhadra B, Surendran S, Lim BR, Yim JS, Kim DH, Woo K, et al. Regulation of the AcrAB efflux system by the quorum-sensing regulator AnoR in *Acinetobacter nosocomialis*. *J Microbiol*. 2020 Jun;58(6):507-518. DOI: 10.1007/s12275-020-0185-2
26. Liao J, Schurr M J, Sauer K. The MerR-like regulator BrIR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*. 2013;195(15):3352-63. DOI: 10.1128/JB.00318-13
27. Beaudoin T, Zhang L, Hinz AJ, Parr CJ, Mah TF. The biofilm-specific antibiotic resistance gene *ndvB* is important for expression of ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol*. 2012 Jun;194(12):3128-36. DOI: 10.1128/JB.06178-11
28. Ortega-Peña S, Martínez-García S, Rodríguez-Martínez S, Cancino-Díaz ME, Cancino-Díaz JC. Overview of *Staphylococcus epidermidis* cell wall-anchored proteins: potential targets to inhibit biofilm formation. *Mol Biol Rep*. 2020 Jan;47(1):771-784. DOI: 10.1007/s11033-019-05139-1
29. Collins AJ, Smith TJ, Sondermann H, O'Toole GA. From Input to Output: The Lap/c-di-GMP Biofilm Regulatory Circuit. *Annu Rev Microbiol*. 2020 Sep 8;74:607-631. DOI: 10.1146/annurev-micro-011520-094214
30. Jain N, Chapman MR. Bacterial functional amyloids: Order from disorder. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2019;1867(10):954-60. DOI: 10.1016/j.bbapap.2019.05.010
31. Cassin EK, Tseng BS. Pushing beyond the Envelope: the Potential Roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Pathogenicity. *J Bacteriol*. 2019;201(18):e00050-19. DOI: 10.1128/JB.00050-19
32. Erdmann J, Thöming JG, Pohl S, Pich A, Lenz C, Häussler S. The Core Proteome of Biofilm-Grown Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Cells*. 2019 Sep 23;8(10):1129. DOI: 10.3390/cells8101129

Информация об авторах:

Слукин Павел Владимирович, научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболенск, Территория «Квартал А», 2
Телефон: (4967) 36-0079
E-mail: Slukin@obolensk.org

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии и биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

Information about co-author:

Pavel V. Slukin, researcher of laboratory antimicrobial agents of department molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: 2 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279
Phone: (4967) 36-0079
E-mail: Slukin@obolensk.org

Nadezhda K. Fursova, PhD (Biology), leading researcher of laboratory antimicrobial agents of department molecular microbiology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
Address: 2 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279
Phone: (4967) 36-0079
E-mail: fursova@obolensk.org

НОВОСТИ НАУКИ**Разрабатывается новый метод повышения безопасности пищевых продуктов**

Преподаватели из Колледжа ветеринарной медицины Канзасского университета разработали более быстрый и эффективный метод обнаружения «шига-токсина *E. coli*», или STEC, в говяжьем фарше.

Традиционный золотой стандарт обнаружения STEC требует выделения и исследования бактерий, не поддается настройкам с высокой пропускной способностью и часто длится недели для получения окончательного результата.

Новый запатентованный Канзасским университетом метод с многоканальной цифровой цепной полимеразной цепной реакцией на основе разделения требует только одного дня для получения подтверждающих результатов.

При попадании в организм через такие продукты, как говяжий фарш и овощи, STEC может вызывать заболевания с такими симптомами, как боль в животе и диарея. Некоторые заболевания, вызванные STEC, могут привести к почечной недостаточности и могут быть опасными для жизни.

Поскольку фекалии крупного рогатого скота и говяжий фарш могут содержать безопасную или менее патогенную кишечную палочку наряду со STEC, наиболее часто используемая полимеразная цепная реакция не может идентифицировать патогенные штаммы кишечной палочки в матрице сложного образца.

Новый цифровой тест полимеразной цепной реакции был разработан для исследований и проверок безопасности пищевых продуктов, которые требуют более короткого цикла обработки и высокой производительности без ущерба для точности обнаружения.

