Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий

И.В. Чеботарь[1], А.Н. Маянский[1], Е.Д. Кончакова[1], А.В. Лазарева[2], В.П.Чистякова[2]

[1] *Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия*
[2] *Научный центр здоровья детей РАМН, Москва, Россия*

Проанализированы механизмы формирования антибиотикорезистентности бактерий, находящихся в составе биоплёнок. Резистентность биоплёночных бактерий к антибиотикам связана как с классическими типами устойчивости, характерными для планктонных форм бактерий, так и со специфическими вариантами резистентности, возникающими в биоплёнках. Обоснованы практические подходы к определению чувствительности к антибиотикам у биоплёночных бактерий.

Ключевые слова: бактериальные биоплёнки, антибиотикорезистентность, внеклеточный матрикс.

Antimicrobial Resistance of Bacteria in Biofilms

I.V. Chebotar[1], A.N. Mayansky[1], E.D. Konchakova[1], A.V. Lazareva[2], V.P. Chistyakova[2]

[1] *Nijniy Novgorod State Medical Academy, Nijniy Novgorod, Russia*
[2] *Research Centre for Children Health, Moscow, Russia*

Different mechanisms of antimicrobial resistance development in biofilm bacteria are reviewed in the article. Practical approaches to the susceptibility testing of bacteria in biofilms are analyzed.

Key words: bacterial biofilms, antimicrobial resistance, extracellular matrix.

Трудности лечения многих бактериальных инфекций связаны с формированием в организме больного микробных биоплёнок. Суть этой проблемы сводится к тому, что бактерии, организуя на какой-либо поверхности сложные сообщества – биоплёнки, приобретают качественно новые свойства по сравнению с микробами, находящимися в планктонной (не связанной с образованием биоплёнок) форме. В составе биопленки микробы обладают повышенной устойчивостью к эффекторам иммунной системы, антибиотикам и дезинфектантам [1–3]. Биоплёночные бактерии способны выживать при воздействии антибиотиков в таких высоких концентрациях, которые не могут быть достигнуты в организме человека при стандартных терапевтических дозировках [4]. Более того, например, известен парадоксальный факт усиления биоплёночного роста *Staphylococcus capitis* в присутствии максимальных терапевтических концентраций оксациллина [5]. Еще одна негативная характеристика биоплёнок заключается в том, что они, как правило, проявляют устойчивость одновременно ко многим антибиотикам из разных групп [6]. В клинических условиях столь высокая выжи-

Контактный адрес:
Игорь Викторович Чеботарь
Эл. почта: nizarnn@yandex.ru

ваемость биоплёночных микробов ведёт к хронизации инфекционного процесса. Отсюда возникает потребность в применении новых подходов к лечению биоплёночных инфекций, предшествовать которому должна нестандартная процедура исследования антибиотикорезистентности микробов, находящихся в составе биоплёнок.

Цель настоящего обзора – проанализировать общие механизмы антибиотикорезистентности бактерий в биоплёнках и обосновать практические подходы к определению чувствительности к антибиотикам у биоплёночных бактерий.

Бактериальная биоплёнка – это надклеточная система, состоящая из бактериального сообщества и ассоциированного с бактериями внеклеточного полимерного матрикса [7]. Каждая из этих составных частей вносит свой вклад в формирование антибиотикорезистентности биоплёнок. В любом случае резистентность связана с нарушением взаимодействия антибиотика и его мишени. У планктонных бактерий такое явление наблюдается на уровне бактериальной клетки в условиях ее непосредственного контакта с препаратом. Формирование биоплёночной резистентности происходит сложнее. Включаются механизмы, которые препятствуют проникновению антибиотиков в глубокие слои биоплёнки и нарушают непосредственный контакт с бактериальными клетками.

Классическими считаются пять типов механизмов устойчивости планктонных бактерий к антибиотикам: модификация мишени, инактивация антибиотика, активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс), нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки, формирование метаболического «шунта» [8]. Накопленная информация позволяет предположить существование у биоплёночных клеток разных типов «планктонной» резистентности (таблица).

Пример модификации мишени как причины антибиотикорезистентности биоплёночных бактерий приведен в работе [9]. Авторы работали с мутантным штаммом *Staphylococcus aureus*. Мутация в кластере I гена *rpoB*, кодирующего бета-цепь ДНК-зависимой РНК-полимеразы (основная мишень для рифампицина), обеспечивала в опытах *in vivo* резистентность стафилококковой биоплёнки к рифампицину.

Парадоксально, но даже тщательный анализ мировой научной литературы обнаружил лишь единичные упоминания о роли в биоплёнках классической модели модификации мишени – L-форм бактерий. Была показана возможность участия L-форм *Listeria monocytogenes* в биоплёночном процессе [10]. Странным является тот факт, что цитируемая работа была опубликована более десяти лет назад и за это время безусловно интересные исследования не получили продолжения. Еще более странным является отсутствие каких-либо наблюдений об образовании L-форм в бактериальных биоплёнках при обработке субингибиторными концентрациями β-лактамных антибиотиков. В связи с изложенным можно утверждать, что поиск бактерий с дефектами клеточной стенки в составе биоплёнок является перспективной и не изученной темой для будущих научных работ.

Инактивация антибиотиков продемонстрирована на примере биоплёночных бактерий *Pseudomonas*

Примеры различных типов антибиотикорезистентности у биоплёночных бактерий

Тип возникновения устойчивости к антибиотикам	Биоплёночная бактерия, у которой обнаружен данный тип устойчивости	Биохимический механизм возникновения устойчивости	Ссылка
Модификация мишени действия	*Staphylococcus aureus*	Мутации, которые ведут к структурным изменениям ДНК-зависимой РНК-полимеразы – основной мишени рифампицина	[9]
Инактивация антибиотика	*Pseudomonas aeruginosa*	Инактивация бета-лактамных антибиотиков за счет продукции бета-лактамаз	[11]
Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс)	*Pseudomonas aeruginosa*	Гиперэкспрессия *MexCD-OprJ* эффлюкс-помпы	[12]
Нарушение проницаемости наружных структур микробной клетки	*Vibrio cholerae*	Мутации, ведущие к структурным изменениям порина *OmpU*	[13]
Формирование метаболического «шунта»	Не подтверждено экспериментально		

aeruginosa, немукоидные изоляты которых обладали повышенной способностью продуцировать β-лактамазы [11]. Это явление приводило к нечувствительности изучаемых биоплёнок к антибиотикам β-лактамного ряда.

Активное выведение антибиотика из микробной клетки со скоростью, превышающей скорость поступления внутрь клетки, доказано в опытах с биоплёнками на основе *P. aeruginosa* [12]. Этот процесс, иначе называемый эффлюксом, осуществлялся за счет гиперэкспрессии мембранной помпы *MexCD-OprJ*.

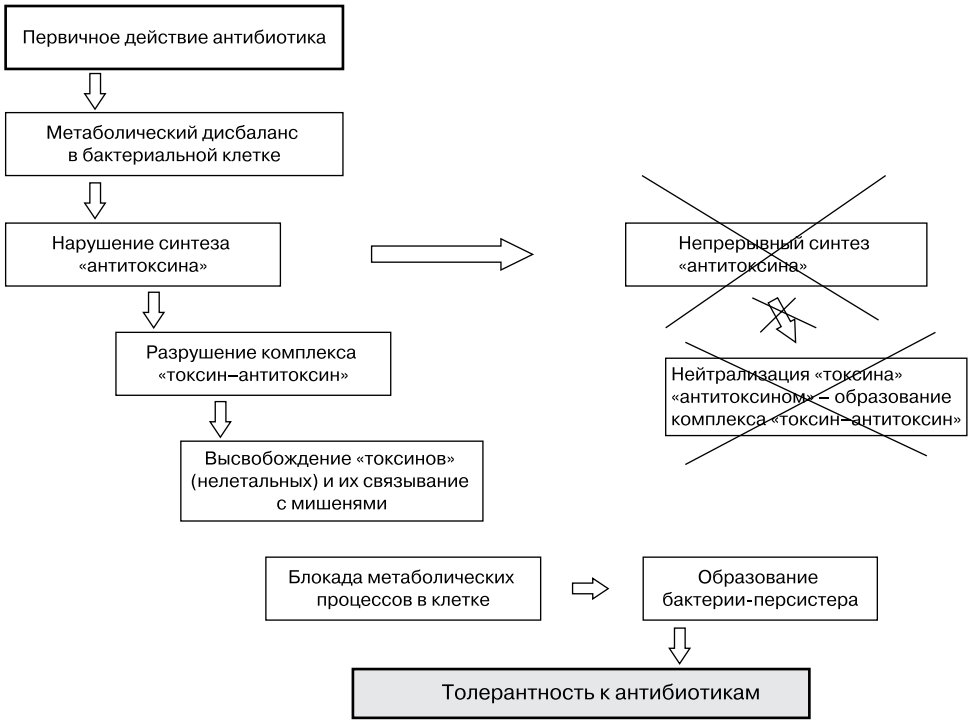
Возможность ослабления проницаемости для антибиотиков бактериальных оболочек продемонстрирована на модели *Vibrio cholerae* [13]. Авторами был получен биоплёнкообразующий мутант *D116A* с измененной структурой порина *OmpU*, который проявлял выраженную резистентность к цефалоспориновым антибиотикам.

Приведенные данные демонстрируют лишь тот факт, что у биоплёночных бактерий возможны те же формы антибиотикорезистентности, что и у планктонных бактерий. Перечисленные примеры прекрасно объясняют механизмы устойчивости биоплёночных бактерий к одному или нескольким однотипным антибиотикам. Вместе с тем, биоплёнки обладают свойством множественной антибиотикорезистентности, т. е. устойчивостью к антибиотикам из разных групп. Ниже будет сделана попытка объяснить феномен множественной резистентности биоплёночных бактерий, которая может быть связана, по крайней мере, с тремя механизмами.

Во-первых, множественная резистентность может быть связана с существованием в биоплёнках особых персистирующих форм бактерий или персистеров [14–16]. Персистер – это фенотипический вариант клеток с обычным для данного штамма генотипом, но с сильно заторможенным метаболизмом. Состояние метаболической инертности клеток с выключением многих биохимических процессов образно называют «бактериальным анабиозом» [17]. Необходимо сразу оговориться, что персистеры существуют не только в биоплёнках. Во всех культурах, где преобладают замедленные типы деления клеток (а биоплёнка относится к таким культурам), относительное количество персистеров больше, чем среди быстро делящихся бактерий. В разных биоплёнках количество персистеров варьирует от 1 до 10% [14]. Главной особенностью персистирующих клеток является их удивительная способность к выживанию при воздействии антибактериальных агентов. Механизм такой устойчивости объясняется с позиций общей метаболической инертности клетки. Известно, что антибиотики эффективнее действуют на быстро растущие и размножающиеся клетки. Механизм действия антибиотиков связан с угнетением жизненно важных для бактерий биохимических процессов. Но антибиотики не могут заблокировать клетки-персистеры, так как в них метаболические пути ингибированы и без участия антибиотиков.

Среди множества предположений о возникновении популяции персистеров наиболее логичной кажется гипотеза Н. Льюиса [14]. Общая схема появления персистеров представлена на рисунке. Трансформация обычной бактерии в персистирующую связана с существованием модулей «токсин-антитоксин», в которых «токсин» является стабильным белком, а «антитоксин» лабилен. В нормально функционирующей клетке «антитоксин» постоянно синтезируется и, связывая «токсин», нейтрализует его. При возникновении стрессовой ситуации (например, при воздействии антибиотика) синтез «антитоксина» может нарушаться, в этом случае «токсин» освобождается и связывается со своей мишенью. Доказано, что среди «токсинов» есть нелетальные «токсины», которые обратимо блокируют клеточные процессы. Например, «токсин» *RelBE* кишечной палочки обратимо связывается с рибосомами, отделяя их от мРНК и нарушая тем самым трансляцию и синтез белка. Это ведет к торможению важнейших метаболических процессов в клетке и превращению бактерии в клетку-персистер, толерантную к антибиотикам различных групп. Однако синтез белка подавляется не полностью, что оставляет возможность для восстановления продукции «антитоксина» и реверсии персистеров в нормальные клетки. Говоря о стратегической роли персистеров, можно считать их бактериями-альтруистами, которые «жертвуют быстрым размножением ради выживания общей популяции клеток» [18].

Во-вторых, множественная резистентность может быть связана с фильтрующей способностью матрикса. Наблюдения *in vitro* показали, что матрикс бактериальных биоплёнок состоит из различных биополимеров – полисахаридов, белков и даже ДНК [19]. Матрикс не только связывает клетки в единую структуру, но и заполняет межклеточные пространства, образуя трехмерную фильтрующую систему. Это позволило назвать биоплёнку «молекулярным фильтром» и считать фильтрацию одной из важнейших функций биоплёнки [20]. Опубликованы работы, в которых наблюдали замедленную диффузию антибиотиков внутрь биоплёнок. Например, было описано затруднение пенетрации ципрофлоксацина внутрь биоплёнки, сформированной *P. aeruginosa*



Принципиальная схема возникновения персистирующих бактерий (персистеров) и формирования у них антибиотикорезистентности [14].

[21]. Трансмиссивная электронная микроскопия показала, что повреждение биоплёночных бактерий при обработке цефуроксимом зависит от того, насколько глубоко от поверхности они расположены. Локализация поврежденных бактерий ограничивалась поверхностными слоями биоплёнки, во внутренних слоях поврежденных клеток было значительно меньше [22].

Элементы матрикса являются не только пассивным фильтром. Глицерол-фосфорилированные бета-глюканы *P. aeruginosa* не просто замедляют диффузию аминогликозидов сквозь биоплёнку, но и активно связывают антибиотики [23]. Слизь, которая продуцируется некоторыми патогенами, заполняя межклеточное пространство в биоплёнках, также может обладать связывающим антибиотик действием. Слизистые полисахариды, выделенные из биоплёнок *Staphylococcus epidermidis*, снижали антибактериальный эффект ванкомицина и тейкопланина [24]. Аналогичное подавление активности гликопептидов (ванкомицина, тейкопланина) и β-лактамов (оксациллина, цефотаксима) было получено в опытах со слизистым матриксом, вырабатываемым штаммами эпидермального и золотистого стафилококков [25, 26]. Альгинатная слизь *P. aeruginosa* значительно ингибировала активность тобрамицина [27].

Структуры матрикса действуют против антибиотиков избирательно. В работе T. Mathur и соавт. показано, что слизь стафилококков не влияет на активность рифампицина и ранбезолида [25]. Другие эксперименты продемонстрировали, что слизистый матрикс (*S. epidermidis*) не препятствует перфузии ванкомицина и рифампицина сквозь биоплёнку [28]. Вероятно, исход взаимодействия матрикса и антибиотика зависит не только от типа антибиотика и видовой принадлежности биоплёнкообразующих бактерий, но и от их штаммовых особенностей, а также от возраста биопленки, т.е. параметров, которые могут определять химический состав и архитектуру матрикса.

Вся перечисленная информация о матрикс-зависимой антибиотикорезистентности получена в экспериментах *in vitro*. К сожалению, методические трудности препятствуют исследованию диффузии антибиотиков через биоплёнки в организме человека. Это связано с тем, что *in vivo* матрикс имеет более сложное строение, так как формирование матрикса в этом случае происходит не только из биополимеров, являющихся продуктами жизнедеятельности бактерий. В состав матрикса включаются субстанции человека. К ним относятся белки плазмы крови (фибрин и др.), клеточные дериваты, субстанции соединительнотканного происхожде-

ния, отложения неорганических солей [19, 29]. Например, анализ клинического случая имплант-ассоциированной стафилококковой биоплёнки при помощи сканирующей электронной микроскопии позволяет рассмотреть на поверхности медицинского устройства, извлеченного из организма, не только бактерии, но и фагоцитирующие клетки (и их дериваты), а также фибриллярные и пленчатые структуры явно немикробного происхождения [30]. Эти особенности должны заинтриговать ученых и стать мотивом для исследования матрикс-зависимой антибиотикорезистентности *in vivo*.

Третий механизм множественной лекарственной устойчивости может быть связан с тем, что внутри биоплёнки могут присутствовать популяции бактерий с разными защитными свойствами, дополняющими друг друга. Например, в уже упоминавшейся работе [11] авторы считают, что немукоидные изоляты *P. aeruginosa* из биоплёнок от больных с муковисцидозом способны к продукции высоких уровней бета-лактамаз, что отличает их от мукоидных изолятов, лишенных такой способности. Немукоидные бактерии экзоцитируют везикулы, содержащие высокие концентрацию β-лактамаз, тем самым обеспечивая защиту своих β-лактамазо-дефицитных «сородичей» от β-лактамных антибиотиков на расстоянии. Мукоид, главным компонентом которого является альгинат, обеспечивает защиту биоплёночных бактерий от других антибиотиков, например от тобрамицина [27]. Подобный механизм защиты описан и для представителей других таксономических групп.

Наиболее сложные сочетания антибиотикорезистентности наблюдаются в полимикробных биоплёнках. Например, из полимикробных биоплёнок человека были выделены изоляты стафилококков (*S. aureus*) и энтерококков (*Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium*) с разнообразными сочетаниями генов резистентности к ванкомицину (*vanA) и* тетрациклинам – *tet*(S) и *tet*(U), а ванкомицинорезистентные стафилококки из той же биоплёнки экспрессировали генный кластер множественной резистентности *ermB–aadE–sat4–aphA-3, msrA* (макролидный эффлюкс) и бифункциональный ген резистентности к аминогликозидам *aac(6′)–aph(2′)-Ia* [6]. Более того, в этой работе была доказана межвидовая передача генов антибиотикорезистентности, которая, по мнению авторов, успешнее реализовалась в условиях тесного контакта бактерий внутри биоплёнки. В частности, внутри популяции биоплёночных бактерий была показана возможность передачи генов устойчивости к ванкомицину (*vanA*) и тетрациклину – *tet*(S), *tet*(U) от *E. faecium* к метициллинорезистентным *S. aureus*. Вероятно, такая генетическая кооперация и «взаимовыручка» внутри биоплёнки позволяет бактериальному сообществу более рационально использовать свои жизнеобеспечивающие ресурсы и гибко реагировать на повреждающие факторы, достигая при этом главной стратегической цели – выживания вида.

Анализируя проблему биоплёночной антибиотикорезистентности, необходимо помнить, что биоплёнка – это живая, динамически развивающаяся система, поэтому и резистентность нужно рассматривать как динамическое понятие. Действительно, опубликованы работы, которые подтверждают, что возникновение и выраженность резистентности биоплёночных бактерий зависят от многих параметров. К факторам, которые могут формировать антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий, можно отнести недостаток кислорода (для *P. aeruginosa*), ограничение питательных веществ (для *Klebsiella pneumoniae*), микроокружение (для *S. aureus*) и, конечно же, сигналы «кворум сенсинг» [31–35]. Наиболее общий механизм возникновения резистентности может быть связан с повышенной мутабельностью бактерий в биоплёнке. На примере *P. aeruginosa* было продемонстрировано, что угнетение антиоксидантных систем в клетках биоплёнок ведёт к кислородозависимому повреждению ДНК, т. е. к накоплению множественных мутаций и появлению антибиотикорезистентности [36]. Вероятно, подобные явления возникают в рамках общего правила, сформулированного для синегнойной палочки, находящейся в условиях адаптации к стрессорам: «Все дороги ведут к резистентности» [37].

Все, что говорилось выше, касалось воздействия на биоплёнки терапевтических и сверхтерапевтических доз антибактериальных препаратов. Известны данные литературы о влиянии на бактериальные биоплёнки субингибиторных концентраций антибиотиков [38]. Интерес к подобным исследованиям связан с тем, что многие антибиотики в субингибиторных дозировках регулировали (угнетали либо стимулировали) формирование биоплёнок, хотя и не убивали биоплёночные бактерии. Ванкомицин в дозах ниже минимальной ингибирующей концентрации стимулировал биоплёнкообразование изолятов *S. epidermidis*, выделенных из биоплёнки с ортопедического протеза [39]. Субингибиторные дозы диклоксациллина, напротив, угнетали формирование биоплёнок *S. epidermidis* и *Staphylococcus haemolyticus* [40], а макролиды тормозили биоплёночный рост *P. aeruginosa* за счет угнетения подвижности, связанной с пилями IV типа [41]. На первый взгляд, парадоксальным кажется стимулирующий эффект низких доз антибиотиков. J. Kaplan объяс-

няет это сложностью сигнальных путей, вовлеченных в глобальную генетическую регуляцию в ответ на стрессорные воздействия [38].

В настоящее время необходимость специальных подходов для определения биоплёночной антибиотикорезистентности остро осознается научно-медицинским сообществом. Предложены оригинальные способы исследования антибиотикорезистентности в биоплёнках и даже новые термины: BIC (от англ. «biofilm inhibitory concentration») [42], BBC (от англ. «biofilm bactericidal concentration») [43], MBEC (от англ. «minimum biofilm eliminating concentrations») [44]. Многие авторы возвращаются к использованию рутинной методики определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) и минимальной бактерицидной концентрации (МБК), изменяя лишь объект исследования. Вместо бульонной или газонной культур они используют биоплёнку с её последующим разрушением (механическим и/или с использованием детергентов) и оценкой жизнеспособности высвободившихся биоплёночных бактерий. Жизнеспособность оценивается по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ), по оптической плотности растущих микробов, т.е. традиционными методами, основным недостатком которых является длительность получения результатов. Реже применялись другие, более сложные, но быстрые и высокочувствительные методы оценки жизнеспособности бактерий. К их числу относится оценка АТФ-биолюминесценции (она отражает количество жизнеспособных бактерий), использование специальных красителей для спектроскопической оценки жизнеспособности биоплёночных бактерий и другие способы [22, 45].

Учитывая актуальность медицинских проблем, связанных с биоплёнками, можно утверждать, что предложенные критерии после доработки и унификации достойны внедрения в практику клинических бактериологических лабораторий. Они станут биоплёночными аналогами тестов на антибиотикорезистентность, которые широко применяются в отношении планктонных и газонных культур. Однако научные исследования могут потребовать более изощренных методик, которые будут направлены на дифференцированную оценку различных механизмов (персистирования, фильтрации, экспрессии генов резистентности и т.д.), вносящих вклад в общую биоплёночную антибиотикорезистентность. Уже предложен способ оценки диффузии антибиотиков через биоплёнку *K. pneumoniae* [46]. Реализация этого способа включала культивирование биоплёнки на микропористых мембранах (диаметр пор – 0,2 мкм не позволял бактериям перемещаться сквозь мембрану), помещенных на питательный агар. Аналогичный фильтр меньшего диаметра прикрывал биоплёнку сверху, на нем располагался стандартный диск с антибиотиком. После инкубации оценивали количество накопленного в нижней мембране антибиотика. Для этого мембрану помещали в среду со стандартным количеством бактерий (референтный штамм *Escherichia coli*) и регистрировали степень подавления их размножения. Принцип метода является интересным и после доработки (упрощения и стандартизации) может быть внедрен в широкую микробиологическую практику.

Работая над обзором, мы сознательно избегали пересказывания огромного объема работ и публикаций о выявлении резистентности к тому или иному антибиотику в той или иной биоплёнке. Вместо этого мы сконцентрировались на обсуждении общих механизмов возникновения резистентности. Мы убеждены, что фактология резистентности в биоплёнках должна стать материалом для создания специальной компьютерной базы данных, отражающей мониторинг глобальной динамики антибиотикорезистентности биоплёночных бактерий. Для создания такой базы необходимы унифицированные методы оценки биоплёночной антибиотикорезистентности, созданные с учетом знания главных принципов возникновения биоплёночной устойчивости, проанализированных в настоящем обзоре.

Литература

1. Бехало В.А., Бондаренко В.М., Сысолятина Е.В., Нагурская Е.В. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток медицинских биоплёнок. Журн Микробол 2010; 4:97-105.
2. Costerton J. W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284:1318-22.
3. Peeters E., Nelis H. J., Coenye T. Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms. J Hosp Infect 2008; 70:361-8.
4. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15:167-93.
5. Qu Y., Daley A.J, Istivan T.S, Garland S.M, Deighton M.A. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from very low birth weight babies: comprehensive comparisons of bacteria at different stages of biofilm formation. Ann Clin Microbiol Antimicrob 2010; 27:9-16.

6. Weigel L.M., Donlan R.M., Shin D.H., et al. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:231-8.
7. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биоплёнки: структура, регуляция, отторжение. Журн микробиол 2011, 1: 101-8.
8. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. Смоленск: НИИАХ СГМА, 2002. – 586 с.
9. Yu J., Wu J., Francis K.P., Purchio T.F., Kadurugamuwa J.L. Monitoring *in vivo* fitness of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* mutants in a mouse biofilm infection model. J Antimicrob Chemother 2005; 55:528-34.
10. Hibma A.M, Jassim S.A, Griffiths M.W. *In vivo* bioluminescence to detect the attachment of L-forms of *Listeria monocytogenes* to food and clinical contact surfaces. Int J Food Microbiol 1996; 33:157-67.
11. Ciofu O. *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. APMIS Suppl 2003; 116:41-7.
12. Mandsberg L.F, Ciofu O., Kirkby N., Christiansen L.E, Poulsen H.E., Høiby N. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53:2483-91.
13. Pagel M., SimonetV., Li J., Lallemand M., Lauman B., Delcou A.H. Phenotypic characterization of pore mutants of the *Vibrio cholerae* porin OmpU. J Bacteriol 2007; 189:8593-600.
14. Льюис К. Персистирующие клетки и загадка выживания биоплёнок. Биохимия 2005, 70(2):327-36.
15. Плакунов В.К., Стрелкова Е.А., Журина М.В. Персистенция и адаптивный мутагенез в биоплёнках. Микробиол 2010; 79(4):447-58.
16. Lewis K. Persister cells. Annu Rev Microbiol 2010; 64:357-72.
17. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции. Журн инфектол 2010; 2(3):4-15.
18. Lewis K. Pathogen resistance as the origin of kin altruism. J Theor Biol 1998; 193:359-63.
19. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальная биоплёнка как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн Микробиол 2011; 3: 99-109.
20. Dunne W.M. Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev 2002; 15:155-66.
21. Suci P.A., Mittelman M.W., Yu F.P., Geesey G.G. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 1994; 38:2125-33.
22. Amorena B., Gracia E., Monzon M., et al. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*. J Antimicrob Chemother 1999; 44:43-55.
23. Sadovskaya I., Vinogradov E., Li J., Hachani A., Kowalska K., Filloux A. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the *ndv*B gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated β-(1→3)-glucans, which bind aminoglycosides. Glycobiology 2010; 20:895-904.
24. Farber B. F., Kaplan M. H., Clogston A.G. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptides antibiotics. J Infect Dis 1990; 161:37-40.
25. Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D., Fatma T., Rattan A. Adverse effect of staphylococci slime on *in vitro* activity of glycopeptides. Jpn J Infect Dis 2005; 58:353-7.
26. Singh R., Ray P., Das A., Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Antimicrob Chemother 2010; 65:1955-8.
27. Nichols W.W., Dorrington S.M., Slack M.P.E., Walmsley H.L. Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:518-23.
28. Dunne W.M. Jr., Mason E.O. Jr., Kaplan S.L. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. Antimicrob. Agents Chemother 1993; 37:2522-6.
29. Durack D.T. Experimental bacterial endocarditis. IV Structure and evolution of very early lesions. J Pathol 1975; 115:81-9.
30. Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002; 8:881-90.
31. Walters M.S., Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Stewart P.S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:317-23.
32. Borriello G., Werner E., Roe F., et al. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48:2659-64.
33. Anderl J.N., Zahller J., Roe F., Stewart P.S. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:1251-6.
34. Harriott M.M., Noverr M.C. Ability of *Candida albicans* mutants to induce *Staphylococcus aureus* vancomycin resistance during polymicrobial biofilm formation. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:3746-55.
35. Brackman G., Cos P., Maes L., Nelis H.J., Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 2655-61.
36. Driffield K., Miller K., Bostock J.M., O'Neill A.J., Chopra I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. J Antimicrob Chemother 2008; 61:1053-6.
37. Breidenstein E.B., de la Fuente-Núñez C., Hancock R.E. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol 2011; 19:419-26.

38. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation. Int J Artif Organs 2011; 34:737-51.
39. Cargill J.S., Upton M. Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. J Clin Pathol 2009; 62:1112-6.
40. Cerca N., Martins S., Sillankorva S., et al. Effects of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. Appl Environ Microbiol 2005; 71: 8677-82.
41. Wozniak D.J., Keyser R. Effects of subinhibitory concentrations of macrolide antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 2004; 125(2 Suppl):62S-69S.
42. Moskowitz S.M., Foster J.M., Emerson J., Burns J.L. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2004; 42:1915-22.
43. Frank K.L., Reichert E.J., Piper K.E., Patel R. *In vitro* effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:888-95.
44. Sepandj F., Ceri H., Gibb A., Read R., Olson M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. Perit Dial Int 2004; 24:65-7.
45. Pettit R.K., Weber C.A., Kean M.J., et al. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:2612-7.
46. Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:1818-24.