

Е.Д. Савилов^{1, 2}, Ю.А. Маркова³, Н.Л. Белькова¹¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Институт эпидемиологии и микробиологии, Иркутск, Российская Федерация²Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, Иркутск, Российская Федерация³Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Российская Федерация

Фенотипические механизмы устойчивости биопленок к антибиотикам

Учитывая, что в настоящее время глобальные проблемы мирового здравоохранения — тенденция нарастания устойчивости микроорганизмов к антибиотикам и вопросы биопленочных инфекций, целью настоящего обзора стал анализ современных данных о популяционном уровне устойчивости биопленок, что объясняет их повышенную резистентность к антибиотикам. Одно из основных вводных постулатов — положение о том, что бактерии в составе биопленки обладают не только генетическими, но и фенотипическими механизмами устойчивости к антибиотикам, что обусловлено популяционным уровнем организации биопленок. В статье раскрываются основные причины фенотипической резистентности биопленок: состав матрикса, гетерогенность микробных популяций, обусловленная архитектурой биопленки, а также механизмы формирования клеток-персистеров. В заключение резюмируется актуальность рассмотрения феномена устойчивости бактериальных клеток к антибактериальным препаратам в биопленочных консорциумах в отношении инфекционных агентов для детального осмысления рассматриваемого вопроса и формирования соответствующих программ в клинических и профилактических направлениях медицинской науки.

Ключевые слова: негенетическая устойчивость, биопленки, антибиотики, матрикс, персистеры

Для цитирования: Савилов Е.Д., Маркова Ю.А., Белькова Н.Л. Фенотипические механизмы устойчивости биопленок к антибиотикам. Вестник РАМН. 2024;79(4):353–359. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn17968>

353

Введение

В настоящее время глобальной проблемой мирового здравоохранения является тенденция нарастания устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, а также пока еще до конца не осознанная проблема биопленочных инфекций. Инфекции, связанные с биопленками, могут иметь серьезные последствия для исходов пациентов, а стандартная противомикробная терапия часто бывает неэффективна против бактерий, формирующих биопленки, что затрудняет их диагностику и лечение.

Биопленки — это форма жизни микробной популяции, представляющая собой сообщество клеток, погруженных в матрикс. Они возникают, как правило, на границе раздела фаз. Их формирование обусловлено возрастом и плотностью микробной популяции, воздействием стрессовых факторов, а также физико-химическим и электростатическим взаимодействием между бактериальной клеткой и субстратом [1].

Несмотря на то что концепция микробных сообществ, получивших название «биопленки» (biofilms), была сформулирована более 30 лет назад, эта терминология до сих пор практически не используется в клинических и эпи-

E.D. Savilov^{1, 2}, Y.A. Markova³, N.L. Belkova¹¹Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Institute of Epidemiology and Microbiology, Irkutsk, Russian Federation²Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education, Irkutsk, Russian Federation³Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation

Phenotypic Mechanisms of Biofilm Resistance to Antibiotics

Considering that the current global problems are a trend towards increasing resistance of microorganisms to antibiotics and issues related to biofilm infections, the purpose of this review was to analyze modern data on the population level of biofilm resistance, which explains their increased resistance to antibiotics. One of the main introductory postulates is that the bacteria in a biofilm have not only genetic, but also phenotypic mechanisms of resistance to antibiotics, which is due to the population level of biofilm organization. This study revealed the main causes of phenotypic resistance of biofilms: quorum sensing, matrix composition, heterogeneity of microbial populations due to the biofilm architecture, and the mechanisms of persister cell formation. In conclusion, the relevance of considering the phenomenon of collective resistance of bacterial cells to antibacterial drugs in biofilm consortia in relation to infectious agents is summarized for a detailed understanding of the issue under consideration and the formation of appropriate programs in the clinical and preventive fields of medical science.

Keywords: non-genetic resistance, biofilms, antibiotics, matrix, persister

For citation: Savilov ED, Markova YA, Belkova NL. Phenotypic Mechanisms of Biofilm Resistance to Antibiotics. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2024;79(4):353–359. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn17968>

демиологических разработках в области инфектологии. Жизнь микроорганизмов в составе сообществ биопленок принципиально отличается от существования свободно живущих так называемых планктонных форм и находится примерно в таких взаимоотношениях, как организм и популяция. Это связано с тем, что как в естественных условиях, так и в организме человека все микроорганизмы в большинстве случаев находятся в составе смешанных биопленок. В таком случае становятся понятными данные Центра по контролю и профилактике заболеваний, согласно которым в западных странах 65% всех инфекционных заболеваний человека вызвано полимикробными биопленками, а Национальный институт здравоохранения США оценивает это значение еще выше — до 80% [2, 3].

Можно полагать, что дальнейшее развитие исследований в области инфектологии приведет к тому, что в лабораторной и клинической диагностике инфекционных заболеваний основной этиологический диагноз будет приводиться в виде полимикробного синдрома разного генеза, с возможным доминированием какого-либо отдельного патогенного штамма. Конечно, подобное развитие исследований в инфектологии уже имеет место, о чем свидетельствует быстрое становление в настоящее время в клинко-эпидемиологической практике проблемы коморбидности, которая включает в себя совместное взаимодействие болезней инфекционной и неинфекционной природы. Но если в период своего становления это направление сводилось преимущественно к анализу различных заболеваний лишь на организменном уровне, то в настоящее время понимание коморбидности стало широко использоваться и в популяционных исследованиях [4].

Важной характеристикой устойчивости биопленок является то, что в отличие от традиционного понимания устойчивости к антибиотикам, связанного с отдельной микробной клеткой, она обусловлена резистентностью на уровне клеточной популяции [5, 6], чему и будет посвящен материал настоящего обзора. Таким образом, **цель обзора** — анализ современных данных о фенотипической устойчивости биопленок, основанной на чувстве кворума, межклеточном матриксе, архитектуре биопленки, гетерогенности условий выживания и наличии клеточных персистеров.

Фенотипическая резистентность биопленок, обусловленная компонентами матрикса

Микроорганизмы в составе биопленки продуцируют компоненты матрикса, различающиеся в зависимости от стадии роста и окружающих условий [7]. Основную часть матрикса составляют полисахариды (целлюлоза, N-ацетилглюкозамина и др.), представленные, как правило, гетерополисахаридами, состоящими из нейтральных и заряженных компонентов. Белки в матриксе являются внеклеточными ферментами и структурными белками. Ферменты расщепляют биополимеры на продукты с низкой молекулярной массой, которые клетка может поглощать и использовать в качестве источников углерода и энергии. Это превращает матрикс во внеклеточную пищеварительную систему. Отдельные ферменты могут участвовать в деградации структурных экзополисахаридов, способствуя дисперсии биопленок, или выступать в качестве факторов вирулентности. К структурным белкам относятся: лектины, участвующие в формиро-

вании и стабилизации сети полисахаридного матрикса или связывающие поверхность клеток с внеклеточными экзополисахаридами; амилоиды, участвующие в адгезии к абиотическим поверхностям и клеткам-хозяевам; пили, фимбрии и жгутики, которые могут действовать как структурные элементы, взаимодействуя с другими компонентами матрикса. В состав матрикса биопленки входит внеклеточная ДНК, которая образует сетевидную структуру, соединяя клетки и компоненты матрикса [8], а также могут содержаться липиды [9].

Компоненты матрикса выступают механическим щитом, защищающим клетки биопленки от действия антибиотиков. Во-первых, это связано с тем, что матрикс влияет на диффузию некоторых антибиотиков в толще биопленки, изменяя степень экспозиции клеток, которые расположены в разных ее нишах [10]. Поэтому бактерии, расположенные в глубине биопленки, могут подвергаться воздействию субингибирующих концентраций антибиотиков, что дает им возможность адаптироваться к их присутствию [11]. В то же время замедленная диффузия может защитить бактерии от продуктов метаболизма антибактериальных препаратов.

Во-вторых, компоненты матрикса могут непосредственно взаимодействовать с антибиотиками, ингибируя или снижая их активность. Например, *Pseudomonas aeruginosa*, не продуцирующие полисахарид Pel, более чувствительны к аминогликозидным антибиотикам тобрамицину и гентамицину по сравнению с диким типом [12]. Отрицательно заряженная внеклеточная ДНК (eDNA) может действовать как хелатор катионных антибактериальных препаратов [13, 14]. Это также актуально для полимикробных биопленок, где чувствительные бактерии защищены ферментами, продуцируемыми устойчивыми бактериями [10].

Регуляторные механизмы в формировании биопленок

Важным моментом в формировании и функционировании биопленок как комплексных клеточных систем является наличие межклеточного обмена сигналами между бактериями, участвующими в этом сообществе. Специфические сигналы передаются между бактериальными клетками через различные аутоиндукторы (АИ) quorum sensing (QS) систем [15]. Регуляция, осуществляемая на уровне популяции, реализуется с помощью АИ, который продуцируется одной клеткой и взаимодействует с рецепторным белком другой клетки, индуцируя в ней скоординированную экспрессию определенных генов. Зависимая от плотности клеток в популяции регуляция экспрессии генов, определяемая как QS-система, состоит, как минимум, из четырех этапов: 1) синтез сигнальных молекул АИ в клетке; 2) выведение этих АИ во внеклеточное пространство (матрикс); 3) активация при определенной пороговой концентрации АИ специфического рецептора на поверхности клеток этого же или другого вида; 4) активация или подавление экспрессии генов [16]. При этом регуляторные механизмы, участвующие в формировании биопленок, могут включать: 1) стимулирование продукции экзополисахаридов и внеклеточной ДНК; 2) усиление межклеточных связей для увеличения прочности биопленки; 3) регулирование скорости биопленкообразования, т.е. контроль как начальной стадии колонизации биопленки, так и образования агрегатов на более поздней ее стадии [17].

С другой стороны, в настоящее время определены возможности ингибирования QS-систем, с помощью которых можно эффективно задерживать образование биопленок у бактерий. Эти механизмы можно разделить на три следующие категории в зависимости от способа действия: 1) инактивация АИ с помощью сигнальных молекул, которые подавляют выработку аутоиндукторов посредством инактивации синтаз, нейтрализации АИ антителами и модификации или деградации сигнальных молекул; 2) целевое регулирование рецептора ингибируется активными аналогами АИ на регулируемых генах; 3) целевая регуляция нисходящего сигнального каскада позволяет предотвратить все последовательные шаги, такие как активация или подавление экспрессии генов при формировании биопленок [18].

Гетерогенность микробных популяций, обусловленная архитектурой биопленки

Биопленки могут быть плоскими или объемными, включать плотные участки, поры и каналы. Например, биопленки *Enterococcus faecalis* ATCC 51 299 плоские и компактные, в то время как *Salmonella enterica* S12 и *Escherichia coli* ESC.1.16 формируют биопленки, состоящие из небольших скоплений клеток [19]. Напротив, биопленки *Neisseria meningitidis* HB-1 состоят из клеточных агрегатов разного размера, образующих определенные каналобразные структуры [20]. Исследования динамики формирования биопленок быстрорастущими штаммами *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Serratia marcescens* на абиотических поверхностях показали, что активный процесс прикрепления клеток к поверхности покровных стекол наблюдался через 4–8 ч культивирования [21]. При этом на начальных стадиях биопленкообразования клетки *P. aeruginosa* формировали длинные неделящиеся цепочки, а *K. pneumoniae* и *S. marcescens* — небольшие скопления. Сформированная многослойная биопленка была зафиксирована у всех изученных изолятов *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* и *S. marcescens* через 20 ч культивирования, а спустя 24 ч от начала эксперимента на стационарной фазе роста культур начинался процесс сукцессии [21].

Формирование различных структурированных биопленок обусловлено составом матрикса, который продуцируют разные микроорганизмы, и физико-химическими условиями окружающей среды, такими как гидродинамические условия, концентрация питательных веществ, характер поверхности и др.

Архитектура биопленки вносит существенный вклад в создание гетерогенных условий, в которых живут отдельные микробные клетки. Градиенты питательных веществ и кислорода направлены от внешней части биопленки к ее внутренней части [22, 23]. Продукты метаболизма, напротив, имеют обратный тренд. В результате в биопленке формируются субпопуляции, демонстрирующие различную метаболическую активность в зависимости от их пространственной локализации [24]. Например, в ядре биопленки дефицит питательных веществ и недостаток кислорода приводят к снижению метаболической активности и скорости роста аэробных бактерий [25].

Многочисленными исследованиями отмечено, что существует связь между активностью метаболизма и устойчивостью к антибиотикам. Например, антибиотики, действие которых направлено на такие процессы роста бактерий, как репликация, транскрипция, трансляция

и синтез клеточной стенки, более активны против клеток экспоненциальной фазы роста. Бактерии с низкой метаболической активностью (в стационарной фазе роста или в глубине биопленки) будут менее чувствительны к этим антибиотикам [26–31]. Другим примером взаимосвязи между метаболизмом и чувствительностью к антибиотикам служат аминогликозиды, которые проникают в клетку с помощью протонной движущей силы, поэтому ее снижение, например, в результате замедления цикла Кребса или дыхания уменьшает внутриклеточное содержание антибиотиков этой группы [32].

В последние годы показано, что бактерии, растущие в присутствии благоприятных источников углерода (глюкозы), более чувствительны к антибиотикам, чем клетки, культивируемые в условиях стресса или на альтернативном пищевом субстрате (жирные кислоты, алканы) [33]. Это позволило предположить первичное и вторичное действие антибиотиков, согласно которому взаимодействие антибиотиков с их мишенями вызывает ряд вторичных изменений, сопровождающихся накоплением активных форм кислорода [34]. В результате гибель клетки происходит не только в результате взаимодействия антибиотика с его мишенью, но и вследствие запуска окислительного взрыва [35].

Таким образом, биопленки содержат бактериальные популяции, которые характеризуются разной метаболической активностью и, следовательно, разной чувствительностью к антибиотикам.

В связи с этим различные концентрации антибиотика взаимодействуют с клетками, которые находятся в разных метаболических состояниях (в реальности все еще сложнее, так как биопленки в естественной среде, как правило, состоят из различных видов бактерий). Здесь можно вспомнить понятие «гормезис», которое описывает двухфазную реакцию (стимуляция низкими дозами или подавление высокими) на соединения, действующие на биологический объект [36]. Тем самым низкие дозы антибиотиков в глубине биопленки могут оказывать не подавляющее, а стимулирующее воздействие на микроорганизмы.

В связи со сказанным выше некоторые ученые утверждают, что тесты на чувствительность к антибиотикам, основанные на их диффузии в агар, отражают более реалистичный взгляд на действие этих антибактериальных средств, чем оценка минимальной ингибирующей концентрации методом разведений [37].

Клетки-персистеры в составе биопленки

Персистеры — это выживающие (но не размножающиеся) в крайне неблагоприятных условиях (летальные дозы антибиотика, высокая/низкая температура, кислотность среды и др.) клетки малочисленной субпопуляции, образующейся в общей микробной популяции в результате фенотипического перехода, индуцированного стрессовыми воздействиями.

Недостаток питательных элементов и кислорода в глубине биопленки создает благоприятные условия для образования персистеров, что определяется их замедленным метаболизмом и повышенной устойчивостью к антибиотикам [38]. Молодые биопленки обычно содержат 0,1% персистеров от общего количества колониеобразующих единиц, детектируемых в биопленке, в то время как в старых биопленках эти клетки составляют до 21% общей популяции [32].

В образовании персистеров ведущую роль играют строгий ответ и SOS-реакция (рис. 1). Строгий ответ индуцируется в случаях ограничения питательных веществ. В этой ситуации запускается синтез алармона (низкомолекулярного соединения, синтезируемого клеткой при нарушении метаболизма и способствующего ее выживанию) гуанозин пентафосфата ((p)ppGpp) [10]. При связывании (p)ppGpp с РНК-полимеразой изменяется транскрипция примерно 15% генома [39]. Наиболее заметным следствием строгого ответа является снижение транскрипции генов рРНК и увеличение транскрипции генов биосинтеза аминокислот [39]. Строгий ответ связан с толерантностью к ингибиторам биосинтеза клеточной стенки, таким как пенициллины [40], цефалоспорины и карбапенемы [41], и клеточного деления, таким как норфлоксацин [42] и офлоксацин [42, 43], а также к колистину [44] и гентамицину [44–46]. Другими свойствами алармона (p)ppGpp являются снижение повреждения клеток вследствие окислительного взрыва, что дает лучшую выживаемость при обработке бактерицидными антибиотиками, и ингибирование суперскручивания ДНК, способствующие устойчивости к фторхинолонам [10].

Еще одна стрессовая реакция микробной клетки — SOS-реакция, запускаемая при повреждении ДНК. Такое повреждение может возникнуть при воздействии ультрафиолетом или обработке токсическими соединениями, включая фторхинолоны. Ключевую роль в регуляции SOS-ответа играют белки LexA и RecA. Во время нормального роста димер LexA действует как репрессор транскрипции генов SOS-регулона путем связывания со специфической операторной последовательностью (SOS-бокс) в их промоторной области [47]. При повреждении ДНК белок RecA активируется (RecA*) путем связывания с одноцепочечной ДНК, образуя нуклеопротеиновую

нить, которая стимулирует саморасщепление LexA, способствуя его деактивации, что в итоге приводит к дерепрессии SOS-генов [47].

SOS-реакция влечет за собой повышенную экспрессию более 50 генов, которые выполняют разнообразные функции в ответ на повреждение ДНК, включая репарацию, рекомбинацию, репликацию ДНК и остановку клеточного деления [47]. Однако не все гены, принадлежащие SOS-регулону, индуцируются одновременно и на одном уровне. Реакция точно рассчитана и синхронизирована в соответствии с размером повреждения и временем, прошедшим с момента его обнаружения [47]. На ранней стадии SOS-ответа процессы репарации ДНК, как правило, безошибочные. Первыми индуцируемыми генами являются гены *uvr*, участвующие в вырезании поврежденных нуклеотидов, *ruvA*, *ruvB*, *recN*, кодирующие белок гомологичной рекомбинации. Далее идут *polB* и *dinB*, кодирующие соответственно ДНК-полимеразу II и IV. Ингибитор деления *sulA* дает бактериям время для завершения восстановления. Если повреждение обширное и не полностью устранено, индуцируется ДНК-полимераза V (*umuC* и *umuD*). Она вызывает повышенный уровень мутаций, но обеспечивает непрерывную репликацию и выживание клеток [47].

Изначально считалось, что SOS-реакция регулирует восстановление повреждений ДНК. Однако на самом деле ее роль значительно шире. Учитывая, что ДНК-полимеразы способствуют повышению частоты мутаций, при SOS-реакции инициируется создание генетического разнообразия и возникновение адаптаций, включающих устойчивость к антибиотикам [48]. Следовательно, SOS-реакция играет важную роль и в толерантности к антибиотикам, вызывающим повреждение ДНК, таким как фторхинолоны и митомицин С [49, 50].

Строгий ответ и SOS-реакция активируют систему «токсин–антитоксин» (ТА), представляющую собой на-



Рис. 1. Схема образования персистеров в результате действия строгого ответа и SOS-реакции

бор из двух или более тесно связанных генов, один из которых кодирует так называемый белок-токсин, а второй — антитоксин. Разные варианты системы «токсин–антитоксин» широко распространены у прокариот [51]. Экспрессия модулей ТА приводит к отключению бактериальных клеточных процессов и остановке роста. В результате формируется популяция метаболически неактивных клеток–персистеров [51].

Заключение

Высокая устойчивость бактерий в составе биопленки к различным антибиотикам может быть обусловлена не только хорошо изученными генетическими механизмами, но и фенотипической устойчивостью, включающей матрикс, архитектуру и гетерогенность условий обитания отдельных клеток в составе биопленки, а также увеличение количества персистеров. Такое понимание фенотипических или популяционных механизмов устойчивости приобретает все большее значение, учитывая, что этот вид резистентности встречается значительно чаще, чем генетическая, и может способствовать ее возникновению [52, 53].

Рассмотренный аспект комплексной проблемы (устойчивость микроорганизмов к антибиотикам в еди-

ной связке с полимикробными биопленками) нуждается в самом широком обсуждении, поскольку этот феномен наиболее активно реализуется среди возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы. При этом следует подчеркнуть, что биопленки имеют значительно больше механизмов устойчивости к антибиотикам, чем микроорганизмы в планктонном состоянии.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке поисковой темы, номер гос. регистрации 123051600027-1.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Участие авторов. Е.Д. Савилов — основная концепция статьи, написание статьи, анализ и систематизация литературы; Ю.А. Маркова — разработка основных блоков статьи, написание и дизайн статьи; Н.Л. Белькова — поиск литературы, написание и редактирование статьи. Все авторы статьи внесли существенный вклад в организацию и проведение исследования, прочли и одобрили окончательную версию рукописи перед публикацией.

357

ЛИТЕРАТУРА

1. Маркова Ю.А., Анганова Е.В., Турская А.Л., и др. Регуляция формирования биопленок *Escherichia coli* (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2018. — Т. 54. — № 1. — С. 3–15. [Markova JA, Anganova EV, Turskaya AL, et al. Regulation of *Escherichia coli* biofilm formation (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2018;54(1):3–15. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.7868/S0555109918010014>
2. Wolcott R, Dowd S. The role of biofilms: are we hitting the right target? *Plast Reconstr Surg*. 2011;127(Suppl 1):28S–35S. doi: <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181fca244>
3. Sen CK, Roy S, Mathew-Steiner SS, et al. Biofilm Management in Wound Care. *Plast Reconstr Surg*. 2021;148(2):275e–288e. doi: <https://doi.org/10.1097/PRS.00000000000008142>
4. Савилов Е.Д., Колесников С.И., Брико Н.И. Коморбидность в эпидемиологии — новый тренд в исследованиях общественного здоровья // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. — 2016. — Т. 93. — № 4. — С. 66–75. [Savilov ED, Kolesnikov SI, Briko NI. The comorbidity in epidemiology — new trend in public health research. *Zh. Microbiol*. 2016;93(4):66–75. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-4-66-75>
5. Pai L, Patil S, Liu S, et al. A growing battlefield in the war against biofilm-induced antimicrobial resistance: insights from reviews on antibiotic resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1327069. doi: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1327069>
6. Penesyan A, Gillings M, Paulsen IT. Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*. 2015;20(4):5286–5298. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules20045286>
7. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):623–633. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
8. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, et al. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol*. 2006;59(4):1114–1128. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.05008.x>
9. Conrad A, Suutari MK, Keinänen MM, et al. Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids*. 2003;38(10):1093–1105. doi: <https://doi.org/10.1007/s11745-006-1165-y>
10. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014;78(3):510–543. doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>
11. Jefferson KK, Goldmann DA, Pier GB. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2467–2473. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2467-2473.2005>
12. Yang L, Hu Y, Liu Y, et al. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environ Microbiol*. 2011;13(7):1705–1717. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02503.x>
13. Mulcahy H, Charron-Mazenod L, Lewenza S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathog*. 2008;4(11):e1000213. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000213>
14. Chiang WC, Nilsson M, Jensen PØ, et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2352–2361. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.00001-13>
15. Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology (Reading)*. 2007;153(Pt 12):3923–3938. doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/012856-0>
16. Vitale M. Antibiotic Resistance: Do We Need Only Cutting-Edge Methods, or Can New Visions Such as One Health Be More Useful for Learning from Nature? *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(12):1694. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121694>
17. Wang X, Liu M, Yu C, et al. Biofilm formation: mechanistic insights and therapeutic targets. *Mol Biomed*. 2023;4(1):49. doi: <https://doi.org/10.1186/s43556-023-00164-w>
18. Zhou L, Zhang Y, Ge Y, et al. Regulatory Mechanisms and Promising Applications of Quorum Sensing-Inhibiting Agents in Control of Bacterial Biofilm Formation. *Front Microbiol*. 2020;11:589640. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640>

19. Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, et al. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J Microbiol Methods*. 2010;82(1):64–70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.04.006>
20. Arenas J, Nijland R, Rodriguez FJ, et al. Involvement of three meningococcal surface-exposed proteins, the heparin-binding protein NhbA, the α -peptide of IgA protease and the autotransporter protease NalP, in initiation of biofilm formation. *Mol Microbiol*. 2013;87(2):254–268. doi: <https://doi.org/10.1111/mmi.12097>
21. Ситникова К.О., Немченко У.М., Воропаева Н.М., и др. Динамика образования биопленок клинически значимыми штаммами условно-патогенных бактерий // *Acta Biomedica Scientifica*. — 2022. — Т. 7. — № 5–1. — С. 119–128. [Sitnikova KO, Nemchenko UM, Voropaeva NM, et al. The effectiveness of biofilm formation of daily cultures of clinically significant strains of opportunistic bacteria. *Acta Biomedica Scientifica*. 2022;7(5–1):119–128. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.29413/ABS.2022-7-5-1.13>
22. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):563–575. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
23. Beebout CJ, Eberly AR, Werby SH, et al. Respiratory Heterogeneity Shapes Biofilm Formation and Host Colonization in Uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio*. 2019;10(2):e02400–18. doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.02400-18>
24. Nadell CD, Drescher K, Foster KR. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):589–600. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.84>
25. Stewart PS, Zhang T, Xu R, et al. Reaction-diffusion theory explains hypoxia and heterogeneous growth within microbial biofilms associated with chronic infections. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016;2:16012. doi: <https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.12>
26. Walters MC 3rd, Roe F, Bugnicourt A, et al. 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(1):317–323. doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.317-323.2003>
27. Levin BR, Rozen DE. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(7):556–562. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1445>
28. Chung HS, Yao Z, Goehring NW, et al. Rapid beta-lactam-induced lysis requires successful assembly of the cell division machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(51):21872–21877. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0911674106>
29. Martínez JL, Rojo F. Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev*. 2011;35(5):768–789. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00282.x>
30. Waters EM, Rowe SE, O’Gara JP, et al. Convergence of *Staphylococcus aureus* Persister and Biofilm Research: Can Biofilms Be Defined as Communities of Adherent Persister Cells? *PLoS Pathog*. 2016;12(12):e1006012. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006012>
31. Wood TK, Song S. Forming and waking dormant cells: The ppGpp ribosome dimerization persister model. *Biofilm*. 2020;2:100018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2019.100018>
32. Barraud N, Buson A, Jarolimek W, et al. Mannitol enhances antibiotic sensitivity of persister bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One*. 2013;8(12):e84220. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084220>
33. Meylan S, Porter CBM, Yang JH, et al. Carbon sources tune antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via tricarboxylic acid cycle control. *Cell Chem Biol*. 2017;24(2):195–206. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.12.015>
34. Серегина Т.А., Лобанов К.В., Шакулов Р.С., и др. Повышение бактерицидного эффекта антибиотиков путем ингибирования ферментов, вовлеченных в генерацию сероводорода у бактерий // *Молекулярная биология*. — 2022. — Т. 56. — № 5. — С. 697–709. [Seregina TA, Lobanov KV, Shakulov RS, et al. Enhancement of the Bactericidal Effect of Antibiotics by Inhibition of Enzymes Involved in Production of Hydrogen Sulfide in Bacteria. *Mol Biol (Mosk)*. 2022;56(5):697–709. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.31857/S0026898422050123>
35. Imlay JA. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(7):443–454. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3032>
36. Southam CM, Ehrlich J. Effects of extracts of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*. 1943;33:517–524.
37. Baquero F, Levin BR. Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19(2):123–132. doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00443-1>
38. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):114–122. doi: <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
39. Pontes MH, Groisman EA. A Physiological Basis for Nonheritable Antibiotic Resistance. *mBio*. 2020;11(3):e00817–20. doi: <https://doi.org/10.1128/mBio.00817-20>
40. Kusser W, Ishiguro EE. Suppression of mutations conferring penicillin tolerance by interference with the stringent control mechanism of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1987;169(9):4396–4398. doi: <https://doi.org/10.1128/jb.169.9.4396-4398.1987>
41. Tuomanen E, Tomasz A. Induction of autolysis in nongrowing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1986;167(3): 1077–1080. doi: <https://doi.org/10.1128/jb.167.3.1077-1080.1986>
42. Wu N, He L, Cui P, et al. Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Front Microbiol*. 2015;6:1003. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01003>
43. Bernier SP, Lebeaux D, DeFrancesco AS, et al. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet*. 2013;9(1):e1003144. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144>
44. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*. 2011;334(6058):982–986. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1211037>
45. Viducic D, Ono T, Murakami K, et al. Functional analysis of *spoT*, *relA* and *dksA* genes on quinolone tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under nongrowing condition. *Microbiol Immunol*. 2006;50(4):349–357. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03793.x>
46. Martins D, McKay G, Sampathkumar G, et al. Superoxide dismutase activity confers (p)ppGpp-mediated antibiotic tolerance to stationary-phase *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(39):9797–9802. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1804525115>
47. Maslowska KH, Makiela-Dzibenska K, Fijalkowska IJ. The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ Mol Mutagen*. 2019;60(4):368–384. doi: <https://doi.org/10.1002/em.22267>
48. Jaszczur M, Bertram JG, Robinson A, et al. Mutations for Worse or Better: Low-Fidelity DNA Synthesis by SOS DNA Polymerase V Is a Tightly Regulated Double-Edged Sword. *Biochemistry*. 2016;55(16):2309–2318. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00117>
49. Uruén C, Chopo-Escuin G, Tommassen J, et al. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics (Basel)*. 2020;10(1):3. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
50. Crane JK, Catanzaro MN. Role of Extracellular DNA in Bacterial Response to SOS-Inducing Drugs. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(4):649. doi: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040649>
51. Jurénas D, Fraikin N, Goormaghtigh F, et al. Biology and evolution of bacterial toxin–antitoxin systems. *Nat Rev Microbiol*. 2022;20(6):335–350. doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00661-1>

52. Schrader SM, Vaubourgeix J, Nathan C. Biology of antimicrobial resistance and approaches to combat it. *Sci Transl Med*. 2020; 12(549):eaaz6992. doi: <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz6992>
53. Yan J, Bassler BL. Surviving as a Community: Antibiotic Tolerance and Persistence in Bacterial Biofilms. *Cell Host Microbe*. 2019;26(1):15–21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.06.002>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Савилов Евгений Дмитриевич, д.м.н., профессор [*Evgeny D. Savilov*, MD, PhD, Professor]; **адрес:** 664003, Иркутск, ул. К. Маркса, д. 3 [**address:** 3 K. Marksa str., 664003, Irkutsk, Russia]; **e-mail:** savilov47@gmail.com, **SPIN-код:** 1057-7837, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9217-6876>

Маркова Юлия Александровна, д.б.н. [*Yuliya A. Markova*, PhD in Biology]; **e-mail:** juliam06@mail.ru, **SPIN-код:** 9983-0764, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7767-4204>

Белькова Наталья Леонидовна, к.б.н., доцент [*Natalia L. Bel'kova*, PhD in Biology, Assistant Professor]; **e-mail:** nlbelkova@gmail.com, **SPIN-код:** 6533-3698, **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-9720-068X>