

ФГБУ "НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО
АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ" МИНЗДРАВА РОССИИ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Домнин Павел Александрович

**Моделирование и изучение свойств не прикрепленных к
поверхности бактериальных агрегатов**

1.5.11. Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

Доктор биологических наук

Ермолаева Светлана Александровна,

Доктор биологических наук, доцент

Лобакова Елена Сергеевна

Москва – 2023

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Флокуляция, автоагрегация, роль в экологии и медицине	13
1.2. Роль автоагрегации в жизненном цикле бактерий	15
1.2.1. Стресс	15
1.2.2. Автоагрегация как защита от хищников.....	17
1.2.3. Коагрегация бактерий.....	17
1.3. Автоагрегация в природных экосистемах.....	19
1.4. Автоагрегация патогенных бактерий при инфекции	22
1.4.1. Муковисцидоз	22
1.4.3. Другие среды организма.....	25
1.5. Молекулярные механизмы автоагрегации патогенных бактерий, модели автоагрегации	27
1.5.1. Эффекторы автоагрегации.....	28
1.5.2. Регуляция автоагрегации	30
1.6. Измерение автоагрегации <i>in vitro</i>	33
1.7. Экспериментальные модели, основанные на феномене магнитной левитации.....	35
1.8. Модели микрогравитации, основанные на сверхпроводящих магнитах и их ограничения.....	40
1.9. Модели магнитной левитации, основанные на постоянных магнитах ..	42
1.10. Использование магнитной силы для разделения клеточной суспензии	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	47
2.1. Бактериальные штаммы и условия роста	47
2.2. Используемые плазмиды и праймеры.....	48
2.3. Характеристика бактериальных автоагрегатов	49

2.4. Визуализация бактериальных автоагрегатов	50
2.5. Определение чувствительности к антибиотикам	51
2.6. Оценка формирования биопленок	52
2.7. Оценка продукции белков курлей.....	52
2.8. Протеомный анализ	53
2.10. Электропорация	55
2.11. Полимеразная цепная реакция	55
2.12. Электрофорез в агарозном геле.....	56
2.13. Лигирование	56
2.14. Рестрикция.....	56
2.15. Выделение плазмидной ДНК.....	57
2.16. Выделение ДНК из агарозного геля	57
2.17. Статистические методы	58
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	59
3.1. Описание системы и принцип работы	59
3.2. Поведение грамотрицательных и грамположительных бактерий, помещенных в магнитный биопринтер	63
3.3. Анализ морфологии автоагрегатов <i>E. coli</i> с помощью КЛСМ и СЭМ ..	67
3.4. Сравнительная характеристика автоагрегации и формирования биопленок патогенными и непатогенными штаммами <i>E. coli</i>	69
3.5. Исследование устойчивости бактерий в биопринтере к антибиотикам	73
3.6. Влияние генетических факторов на способность бактерий к автоагрегации	76
3.7. Картирование мутации штамма <i>Srm</i>	78
3.8. Получение рекомбинантного штамма	81

3.9. Исследование фенотипа полученных рекомбинантных штаммов	83
3.10. Сравнение спектра секретируемых белков штамма M17 в условиях магнитной левитации и стационарной культуры	84
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	90
4.1. Описание модели и её особенности	90
4.2. Влияние продукции курлей и механизмов генетической регуляции на автоагрегацию <i>E. coli</i> серотипа O157:H7	94
4.3. Изменения в протеоме агрегированных бактерий в магнитном биопринтере и в невесомости	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ВЫВОДЫ	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	106
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

В медицинской микробиологии принято считать, что патогенные бактерии в организме больного существуют в двух состояниях: одиночные плавающие планктонные клетки и ассоциированные с поверхностью клеточные агрегаты, известные как биопленки. Бактериальные биопленки - прикрепленные к поверхности трехмерные многослойные структуры, образованные бактериями и продуцируемым ими внеклеточным матриксом, состоящим из экзополисахаридов, экзоферментов, внеклеточной ДНК и липидов. Механизмы защиты, обеспечиваемые биопленками, такие как: поддержание гомеостаза среды в биопленке, ограничение диффузии антибиотиков, реорганизация макромолекул (экзоферментами), гетерогенность бактериальных клеток в популяции, в том числе клеток-персистеров, обеспечивают в сотни раз более высокую устойчивость к биотическим и абиотическим факторам среды по сравнению с одиночными планктонными клетками [1–3]. На сегодняшний день биопленки остаются серьезной проблемой при лечении хронических инфекций [4; 5].

Развитие методов микроскопии позволило проводить анализ биопленок *ex vivo* и *in vivo* в образцах, полученных из слизистых оболочек и эпителиальных тканей, суставов и хронических ран. Было выявлено, что во многих случаях биопленки при хронических заболеваниях не были напрямую связаны с поверхностями тканей человека, а скорее «плавали» в объеме физиологических жидкостей. Такие неприкрепленные агрегаты, образованные бактериями, внедренными в полимерный матрикс, описаны для широкого круга патогенных бактерий, включая токсигенные *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter spp.*, и ряда других патогенных бактерий [4; 5]. Характерным свойством этих неприкрепленных агрегатов является то, что, в связи со спецификой поведения патогенных бактерий в

организме больного, они состоят преимущественно из клеток штамма возбудителя. Такие агрегаты называются автоагрегатами, в противовес коагрегатам, сформированным сообществом из разных штаммов и видов микроорганизмов. Взвешенные бактериальные коагрегаты хорошо известны специалистам в области экологии микроорганизмов, изучающим микробные экосистемы природных водоемов и донных отложений [6–9].

Для изучения свойств неприкрепленных бактериальных агрегатов в последние годы появляется все больше моделей *in vitro*. Мониторинг агрегации бактерий в культурах без встряхивания в высоковязких средах, в блоках агара или в присутствии физиологических жидкостей показал, что неприкрепленные агрегаты имеют ряд общих характеристик с прикрепленными к поверхности биопленками, включая наличие внеклеточного матрикса, потребность в размножении бактерий и повышенную устойчивость к противомикробным препаратам [10]. С другой стороны, такие особенности, как состав матрикса и механизмы молекулярно-генетической регуляции, могут различаться между неприкрепленными агрегатами и классическими биопленками. Основным техническим ограничением для моделей неприкрепленных агрегатов *in vitro* является седиментация агрегатов под действием гравитационной силы даже в высоковязких средах, что ограничивает время наблюдения. Поэтому необходима разработка моделей для изучения бактериальной агрегации, в особенности автоагрегации возбудителей инфекционных заболеваний.

Цель и задачи работы

Целью работы было апробировать модель автоагрегации бактерий, основанную на феномене магнитной левитации, на примере ряда патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, разработать методы исследования бактериальных автоагрегатов с использованием новой модели и определить

различия в механизмах формирования биопленок и автоагрегатов, а также особенности фенотипа бактерий в автоагрегатах.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Подобрать оптимальные условия для культивирования бактериальных автоагрегатов в новой экспериментальной системе, основанной на феномене магнитной левитации (магнитном биопринтере) в сравнении со стандартными моделями автоагрегации;
2. Используя разработанную экспериментальную систему, охарактеризовать особенности формирования автоагрегатов у ряда вирулентных и сапрофитических штаммов *Escherichia coli* в сравнении с особенностями формирования биопленок этими штаммами;
3. Изучить механизмы генетического контроля автоагрегации вирулентного штамма *E. coli* серотипа O157:H7;
4. Провести сравнительный анализ протеома бактерий, выращенных в условиях магнитной левитации и в условиях невесомости в космосе;

Объекты и методология исследования

В работе исследован феномен бактериальной автоагрегации с использованием магнитного биопринтера для создания условий магнитной левитации. Полученные бактериальные автоагрегаты были охарактеризованы с точки зрения морфологии, механизмов формирования и протеомных характеристик бактериальных клеток в составе автоагрегатов. Объектами исследования выступили грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* и *Listeria monocytogenes*, и грамотрицательные *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*.

Характеристику бактериальных автоагрегатов и используемых в экспериментах бактерий проводили с помощью микробиологических, микроскопических и молекулярно-генетических методов, а также с помощью

омиксных технологий. Из микробиологических методов применялись прямые высевы из бактериальных автоагрегатов с последующим подсчетом КОЕ, оценка формирования биопленок в лунках 96-луночных полистироловых планшетов с последующей окраской кристалвиолетом, оценка формирования белков-курлей на агара с окрашиванием конго красным, оценка автоагрегации бактерий с помощью седиментационного теста, оценка подвижности бактерий в толще полужидкого агара, оценка устойчивости к антибиотикам диско-диффузионным методом и методом серийных разведений. Также был применен оригинальный метод оценки автоагрегации в магнитном биопринтере с помощью связывания автоагрегатами конго красного.

Помимо микробиологических методов морфология бактериальных автоагрегатов изучалась с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Помимо микроскопии проводился замер геометрических параметров автоагрегатов.

Среди молекулярно-генетических методов применялись полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование ДНК с анализом последовательностей ДНК с помощью программы BioEdit, ДНК-электрофорез в агарозном геле, ДНК-лигирование, электропорация, рестрикция.

Для оценки изменений физиологии бактерий в автоагрегатах использовался протеомный анализ, проведенный на базе ИБХФ РАН с использованием базы данных KEGG.

Научная новизна и практическая значимость

1. Впервые апробирована новая модель не прикрепленных к поверхности бактериальных агрегатов, основанная на феномене магнитной левитации, позволяющая изучать различия в эффективности

- автоагрегации бактерий (например, влияние точечных мутаций в генах, регулирующих автоагрегацию), которые не дифференцируются стандартными моделями;
2. Обнаружены различия в механизмах контроля формирования биопленок и автоагрегатов у патогенных и сапрофитических штаммов *E. coli*;
 3. Продемонстрирован вклад регулятора транскрипции гетеродимера RcsB/RcsA в автоагрегацию патогенных *E. coli* серотипа O157:H7;
 4. Обнаружено сходство в протеоме *E. coli* M17, выращенных в новой модели бактериальной автоагрегации (магнитной левитации) и в условиях микрогравитации в космосе;

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана новая модель бактериальной агрегации, позволяющая изучать различия в эффективности автоагрегации бактерий (например, влияние точечных мутаций в генах, регулирующих автоагрегацию), которые не дифференцируются стандартными моделями;
2. Продемонстрирована независимость механизмов, контролирующих формирование биопленок и автоагрегатов у *E. coli*: показано, что штаммы, хорошо формирующие биопленки, могут плохо автоагрегировать и хорошо автоагрегирующие штаммы могут не формировать биопленки;
3. Установлено, что регулятор транскрипции гетеродимер RcsA/RcsB контролирует процесс автоагрегации патогенной *E. coli* O157:H7, не влияя на способность этих бактерий формировать биопленки;

4. Продемонстрировано сходство в протеоме *E. coli*, выращенных в условиях магнитной левитации и микрогравитации, в особенности поверхностных белков и белков, регулирующих обмен углеводов

Степень достоверности

Достоверность результатов, представленных в работе, определяется репрезентативным объемом проведенных экспериментальных исследований, комплексным применением современных методов исследования и подтверждается статистической обработкой полученных данных.

Апробация результатов

Материалы и результаты диссертации были представлены на 3 российских и 1 международной конференциях: XXVII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2020», 3-й Российский Микробиологический Конгресс, X Российский форум биотехнологий “Площадка открытых коммуникаций OpenBio” и FEMS-2023. Основные результаты были опубликованы в 4 статьях, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, в том числе 2 из них в изданиях Q1. Всего за время выполнения квалификационной работы автором опубликовано 8 индексируемых статей, из которых 4 в журналах Q1.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора в получении результатов состояло в анализе опубликованных в научной данных, постановке экспериментов, обработке и интерпретации результатов, представлении и апробации результатов на конференциях, подготовке научных публикаций по выполненной работе, написании текста диссертации. Основные результаты работы получены

автором самостоятельно. Разработка дизайна и сборка магнитных биопринтеров выполнена 3D Bioprinting Solutions, Ltd. Микроскопические исследования (КЛСМ и СЭМ) проводились совместно с к.б.н., в.н.с. кафедры высшей нервной деятельности Мойсенович А.М. и к.б.н., в.н.с. лаборатории конфокальной микроскопии Архиповой А.Ю. Протеомный анализ выполнен совместно с к.ф.-м.н., с.н.с. лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук Кононихиным А. С. Секвенирование образцов ДНК произвели в ЦКП “ГЕНОМ”.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 статьи, среди них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 140 страницах, содержит 6 таблиц и 26 рисунков и состоит из следующих разделов: 1) введение, 2) обзор литературы, 3) материалы и методы, 4) результаты, 5) обсуждение, 6) заключение, 7) выводы, 9) список цитируемой литературы (258 источников).

Благодарности

Выражаю глубокую благодарность за помощь и поддержку в проведении данной работы, важные рекомендации научным руководителям д.б.н.

Ермолаевой Светлане Александровне и д.б.н., доц. Лобаковой Елене Сергеевне.

Выражаю глубокую благодарность сотрудникам лаборатории экологии возбудителей инфекции отдела природно-очаговых инфекций ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи с.н.с., к.м.н. Чаленко Ярославе Михайловне, в.н.с., к.б.н. Сысолятиной Елене Владимировне, н.с. Калинин Егору Валерьевичу, Абдулкадиевой Марьям Махдиевне и л.-и. Захарченко Анастасии Евгеньевне за помощь в проведении микробиологических и молекулярно-генетических исследований, поддержку и ценные советы, а также в.н.с., д.б.н. Пушкаревой Валентине Ивановне за предоставленный штамм *E. coli* ATCC 43890.

Выражаю глубокую благодарность компании «3D Bioprinting solutions» за предоставленные магнитные биопринтеры.

Выражаю глубокую благодарность сотрудникам Биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова в.н.с. кафедры высшей нервной деятельности, к.б.н. Мойсенович Анастасии Михайловне, в.н.с. лаборатории конфокальной микроскопии, к.б.н. Архиповой Анастасии Юрьевне и м.н.с. лаборатории конфокальной микроскопии Рамоновой Алле Аликовне за помощь в проведении КЛСМ и СЭМ.

Выражаю благодарность к.ф.-м.н., с.н.с. Центра по научным и инженерным вычислительным технологиям для задач с большими массивами данных Сколковского института науки и технологий Кононихину Алексею Сергеевичу за помощь в проведении протеомного анализа.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Флокуляция, автоагрегация, роль в экологии и медицине

Биопленки – прикрепленные к поверхности сообщества бактериальных клеток, встроенные в образованный ими внеклеточный полимерный матрикс, состоящий из экзополисахаридов, экзоферментов и других внеклеточных белков, а также внеклеточной ДНК [5; 11]. Биопленки могут образовываться как на биотических, так и на абиотических поверхностях, а также возможно формирование биопленок на границе раздела жидкость-воздух [12]. Формирование биопленки происходит при переходе бактерий из планктонного состояния в состояние прикрепления к поверхности и включает несколько стадий, начиная с первоначального прикрепления, за которым следует образование микро- и макроколоний. На заключительных стадиях после формирования зрелой биопленки бактерии отделяются и снова начинают свободно плавать для распространения. В окружающей среде биопленки являются основной формой роста бактерий [13]. Биопленки также играют важную роль во многих заболеваниях [14]. Среда биопленок обеспечивает защиту от ряда стрессов, а бактерии внутри биопленок могут быть до 1000 раз более устойчивы к антибиотикам [15].

Помимо прикрепления к клеткам и внеклеточному матриксу тканей хозяина или неорганическим поверхностям, многие бактерии также обладают способностью прикрепляться друг к другу. Данный феномен называется автоагрегация или аутоагглютинация и наряду с адгезией к различным поверхностям является одним из первых этапов формирования биопленок [16; 17]. Автоагрегация макроскопически наблюдается как образование бактериальных скоплений, постепенно оседающих на дне культуральных пробирок. Характерным свойством автоагрегации является то, что такие скопления образуются только бактериями одного штамма, в отличие от коагрегации, при которой объединяются бактерии разных штаммов или даже

разных видов [18–20]. Таким образом, автоагрегацию можно рассматривать как своего рода процесс самоидентификации бактерий. Взвешенные бактериальные агрегаты уже хорошо известны специалистам в области экологии микроорганизмов. Например, различными группами были проведены обширные исследования частиц морского геля (MGP) и связанных с ними бактериальных сообществ в поверхностных водах моря, а также образование и жизненный цикл этих агрегатов во время их осаждения на глубины океана (рис. 1) [7; 8; 21–27].

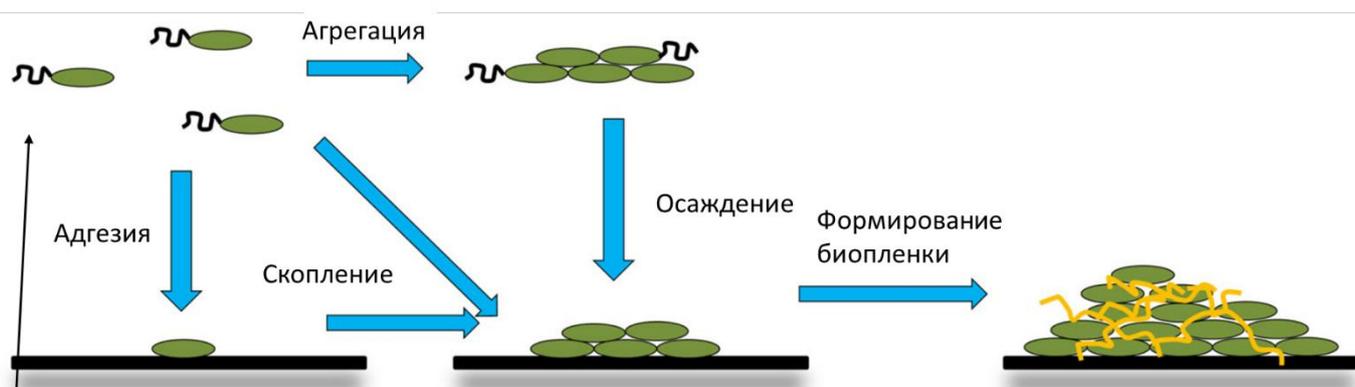


Рис. 1. Схема формирования прикрепленных к поверхности бактериальных биопленок и агрегатов. Изображение взято из [28].

Несмотря на распространенность феномена, роль автоагрегации во многих случаях плохо изучена. Способность к автоагрегации может быть как конститутивной, так и индуцироваться при определенных условиях, таких как стресс, доступность кислорода или изменения температуры, в зависимости от рассматриваемых бактерий [29–32]. Поскольку бактерии в автоагрегатах защищены от внешних факторов за счет внеклеточного матрикса, данное состояние может быть выгодно как для непатогенных, так и патогенных бактерий, особенно в таких условиях, как дефицит питательных веществ или окислительный стресс [33–35]. Автоагрегация и образование микроколоний также играет важную роль в защите от иммунной системы хозяина [36; 37].

Для обозначения процесса связывания бактерий одного штамма друг с другом используются несколько терминов, имеющих некоторые смысловые различия. Термины «Автоагрегация» и «аутоагглютинация» по сути синонимы. В обоих случаях приставка «авто-» означает, что данный процесс происходит между бактериями одного и того же штамма. «Агрегация» означает сборку частиц в единую структуру. Термин «агглютинация» заимствован из иммунологии, где им обозначают образование видимых агрегатов в изначально гомогенной суспензии после добавлении агглютинина, классически это антитела. Другими словами, агглютинация предполагает наличие некоего дополнительного агента, способствующего связыванию взвешенных частиц. Таким образом, в случае бактериальной аутоагглютинации аутоагглютинин будет относиться к поверхностной молекуле, опосредующей агрегацию. Однако агглютинины не обязательно должны быть бактериальными молекулами, как показывает пример антителоопосредованной агглютинации. Примером небактериальных агглютининов могут быть ионы кальция и магния, которые вызывают агрегацию клеток *Escherichia coli*, не имеющих поверхностных белков в большом количестве. Также для обозначения процесса агрегации микроорганизмов в природных экосистемах часто встречается термин «флокуляция» [38].

1.2. Роль автоагрегации в жизненном цикле бактерий

1.2.1. Стресс

Представители рода *Pseudomonas*, принадлежащие к классу γ -протеобактерий, способны выживать в широком диапазоне сред, отчасти благодаря высокой способности переносить как эндогенные, так и экзогенные стрессорные факторы, в том числе за счет автоагрегации [39]. Например, *P. putida* штамм CP1, способный разлагать хлорароматические соединения, такие как моноклорфенолы. Высокие концентрации моноклорфенолов приводят к автоагрегации клеток в культуральной среде,

тогда как при использовании более низких концентраций во время роста культуры автоагрегации не наблюдалось. Таким образом, агрегация бактерий была одним из ответов на токсическое воздействие моноклорфенолов в высоких концентрациях. Этот вывод подтверждается тем фактом, что *P. putida* CP1, выращенная при высоких концентрациях фенола, более слабого стрессорного фактора, не автоагрегирует, а также усилением автоагрегации, наблюдаемым по мере увеличения токсичности различных изомеров моноклорфенолов [29].

Еще одним примером автоагрегации как ответной реакции на присутствие токсичных веществ у бактерий рода *Pseudomonas* является автоагрегация *P. aeruginosa* при воздействии определенных детергентов, таких как додецилсульфат натрия (SDS) [40; 41]. Гены *siaA* и *siaD* необходимы для индукции автоагрегации как специфического ответа на SDS [42]. Предположительно ген *siaA* кодирует предполагаемый мембранный белок, содержащий домен НАМР (гистидинкиназы, аденилатциклазы, метилакцепторные белки хемотаксиса и фосфатазы) и PP2C (протеинфосфатаза 2C-подобный фосфатазный домен). Оба домена необходимы для двухкомпонентной сигнальной системы [43; 44]. SiaA предположительно является сенсором стресса и важен для передачи сигнала в ответ на внешние раздражители, SiaD в свою очередь предположительно кодирует цитоплазматическую дигуанилатциклазу, участвующую в биосинтезе циклического дигуанозинмонофосфата (с-di-GMP), что позволяет предположить, что SDS-индуцированная агрегация регулируется посредством цикло-ди-ГМФ-зависимого сигнального пути [42]. Таким образом, автоагрегация *P. aeruginosa* повышает приспособленность к нестабильным и потенциально вредным для взвешенных клеток условиям окружающей среды.

1.2.2. Автоагрегация как защита от хищников

Помимо защиты от токсичных веществ бактерии в автоагрегатах также получают защиту от хищников. Hahn и соавт. в своем исследовании культивировали *Pseudomonas* sp. штамм MWH1 в присутствии бактериоядных жгутиковых *Ochromonas*, что приводило к образованию хлопьевидных взвешенных микроколоний численностью до 1000 клеток, обеспечивавших защиту от поедания жгутиковыми, тогда как бактерии, культивированные в отсутствие хищников, росли как планктонные клетки [45]. Также *Sphingobium* sp. штамм Z007 образовывал агрегаты в совместных культурах с бактериоядными простейшими *Poteroochromonas*, а супернатанты такой культуры могли индуцировать агрегацию *Sphingobium* в монокультуре, что указывает на наличие растворимых сигнальных молекул, высвобождаемых в супернатант в ответ на присутствие хищников [46]. Точно так же *P. aeruginosa* образовывала микроколонии, которые обеспечивали защиту от хищных простейших. Формирование микроколоний зависело от продукции пилей IV типа, жгутиков и альгината IV типа [47]. Возможно, виды *Pseudomonas* используют сходные механизмы выживания, когда речь идет о предотвращении фагоцитоза клетками иммунной системы хозяина.

1.2.3. Коагрегация бактерий

Термин “коагрегация” обозначает формирование агрегатов разными штаммами и видами бактерий. Аналогично автоагрегации, коагрегация бактерий способствует адаптации бактерий к высоким концентрациям антибиотиков. Например, в упрощенной модельной системе естественного водного бактериального сообщества были протестированы эффекты сублетальных концентраций антибиотиков. Модельная система содержала четыре вида бактерий: *Aeromonas Hydrophila*, *Brevundimonas intermedia*, *Micrococcus luteus* и *Rhodococcus* sp. При воздействии антибиотиков наблюдалось уменьшение количества бактериальных клеток на ~75% [18].

Бактерии быстро перешли от планктонного образа жизни к образованию микроколоний, а также более крупных коагрегатов в присутствии антибиотиков, при этом бактерии смогли выжить в агрегированном состоянии. Бактерии, сформировавшие агрегаты, были окружены внеклеточным полимерным матриксом. Созданная внеклеточным матриксом микросреда, а также межвидовые взаимодействия бактерий в агрегатах обеспечили устойчивость к антибиотикам. Хотя в этом исследовании не затрагивался вопрос патогенности этих видов бактерий, оно показывает еще один пример обусловленной агрегацией устойчивости к противомикробным препаратам, которая также может быть механизмом защиты от иммунной системы хозяина во время бактериальной инфекции. Например, совместная агрегация бактерий полости рта повышала устойчивость к фагоцитозу и способствовала образованию абсцесса на модели подкожной инфекции у мышей [19]. Коагрегация также может играть роль в формировании зубных биопленок на поздней стадии. *Veillonella atypica* коагрегирует со значительным количеством потенциальных патогенов полости рта посредством своего белка-аутопереносчика Hag1 [48]. Таким образом, *Veillonella* может действовать как «связующий вид», привлекая потенциально патогенные бактерии на поздних стадиях формирования биопленки, такие как *Porphyromonas gingivalis*.

Различные виды бактерий также могут коагрегировать в присутствии хищников. При совместном культивировании бактерии *Arthrobacter agilis* и *Brevundimonas sp.* штамма GC044 конкурировали друг с другом, при этом *A. agilis* достигала лишь 2% от общей плотности клеток. Однако, когда эти бактерии совместно культивировались в присутствии хищных простейших *Poteroiochromonas*, доля *A. agilis* возросла до 6–10% от общей популяции бактерий [49]. При совместном культивировании без хищничества бактерии росли преимущественно в виде планктонных клеток, но в условиях присутствия хищников они образовывали повышенное количество либо

моновидовых микроколоний из небольшого числа клеток, либо более крупных агрегатов, содержащих оба вида, а общее количество клеток было выше, чем в монокультурах в присутствии *Poteroiochromonas*. Однако число хищников также выросло до значительно более высоких значений в совместных бактериальных культурах по сравнению с монокультурами, и большая часть простейших была обнаружена прикрепленной к агрегатам в совместных культурах. Это говорит о том, что коагрегация — это не просто механизм защиты от поедания хищниками. Наблюдения о том, что общая биомасса в мультивидовых культурах в присутствии простейших была существенно выше, чем в соответствующих монокультурах, и что у простейших было значительно выше пищи, позволяют предположить, что коагрегация и возникающие в таких сложных микробных сообществах взаимодействия повышают эффективность переноса энергии экосистемы [49].

1.3. Автоагрегация в природных экосистемах

Бактерии, живущие в нестабильной водной среде, такой как океан, не обязательно живут в виде планктонных клеток. Фактически, микроорганизмы в океанах легко заселяют частицы морского геля, который обеспечивает поверхность для адгезии, убежище, а также источник питательных веществ. Эти частицы образуют агрегаты на всех глубинах от поверхности океана до батипелагической зоны [7; 8; 22]. Двумя наиболее распространенными типами частиц морского геля, обнаруженных в океане, являются содержащие полисахариды прозрачные экзополимерные частицы (TEP) и белковые частицы, связывающие кумасси (CSP). TEP представляют собой гелеобразные липкие частицы, состоящие преимущественно из кислых полисахаридов, которые образуются абиотически путем коагуляции растворенных или коллоидных экзополимеров, выделяемых фитопланктоном [7; 22; 23]. CSP также гелеобразны, но менее липки, чем TEP частицы и

содержат преимущественно белки, высвобождаемые во время гибели клеток [50; 51]. Липкая природа, а также обилие компонентов углерода, азота и фосфора делают обе разновидности частиц идеальной нишей для микробных клеток, которые могут использовать их либо как место адгезии, либо в качестве источников питательных веществ [8]. Вещества-предшественники, такие как полисахариды, продуцируемые фитопланктоном, обитающим в мезопелагическом слое океана, служат основным субстратом агрегации TEP и CSP. Заселенные бактериями TEP могут либо всплывать к поверхностному микрослою океана из-за своей плавучести, либо опускаться в более глубокие зоны, когда размер и плотность частиц увеличиваются за счет большего количества прикрепленных микроорганизмов или других частиц, образуя «морской снег», который переносит питательные вещества. Хотя TEP широко изучаются из-за их повсеместного распространения и важности в морском углеродном цикле, исследования CSP все еще находятся на зачаточной стадии [7; 27].

Бактерии могут колонизировать органические вещества в озерах, образуя агрегаты, подобные агрегатам «морского снега», но называемые «озерным снегом» [52]. Несмотря на достаточно малые размеры, агрегаты «озёрного снега» могут быть густо заселены бактериями, численность которых в 100 раз выше, чем в толще воды [53; 54]. Бактериальные скопления встречаются и в прудах. Имеются исследования сезонных изменений бактериальных сообществ в пруду: бактерии, связанные с частицами, были относительно более многочисленны с июля по октябрь, чем в холодные зимние месяцы, при этом менее 10% общей популяции прикреплялись к частицам в любое время [55; 56]. Также были зарегистрированы речные микробные агрегаты, называемые «речным снегом» [57; 58]. Имеются данные о том, что состав бактериальных сообществ «речного снега» в реке Эльба (Германия) менялся в разные сезоны, демонстрируя большое разнообразие весной и летом, но снижение общего числа клеток было зарегистрировано

осенью и зимой. В устьях рек, где пресная вода встречается с соленой, также наблюдается большое количество прикрепленных к частицам бактерий, иногда составляющих более 50% от общей численности микроорганизмов в данной нише [57].

Как и в упомянутых выше водных системах, бактерии могут образовывать многоклеточные агрегаты в очистных сооружениях с активным илом [59–65]. Активный ил является наиболее широко применяемым методом биологической очистки сточных вод, при котором взвешенные бактериальные агрегаты используются для удаления загрязняющих веществ на основании их способности расщеплять органические вещества и потреблять азот и фосфор [9].

Флокулы ила в основном состоят из микроорганизмов, слипшихся с экзополисахаридами, органическими и/или неорганическими коллоидными частицами [66–68]. Значительное внимание уделялось структуре и физико-химическим свойствам флокул, а также выделению и характеристике бактерий, образующих флокулы, т.к. это важно для управления процессом очистки сточных вод [63; 69–74]. Бактерии составляют 5–20% флокул, среди которых значительную роль играют нитчатые бактерии. В флокулах происходит как автоагрегация, так и коагрегация [28]. Было документально подтверждено, что тип *Proteobacteria* является доминирующим, при этом β -*Proteobacteria* является наиболее многочисленным классом из-за его важной роли как в производстве экзополисахарида флокул (таких как зооглея), так и в деградации органических веществ [75–77]. Также были обнаружены, но в меньшем количестве представители α -, γ -, δ -*Proteobacteria*. *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chloroflexi* также были обнаружены, но в меньшем количестве [63; 64; 78]. В частности, некоторые основные роды, включая *Zoogloea*, *Dechromonas*, *Prostheco bacter*, *Caldilinea*, *Tricoccus*, *Acidobacteria* субгрупп Gr4 и Gr6 и *Verrucomicrobia*, были идентифицированы из всех 14 разновидностей активного ила в разных местах (материковый Китай, Гонконг,

Сингапур, Канада и США), что указывает на их важность для поддержания нормального функционирования очистных сооружений [79].

1.4. Автоагрегация патогенных бактерий при инфекции

1.4.1. Муковисцидоз

Муковисцидоз — аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное мутациями гена CFTR, приводящими к нарушению работы хлоридных каналов в клетках, вырабатывающих слизь и пот. В первую очередь поражаются дыхательная система и ЖКТ, но в конечном итоге поражаются многие органы, что приводит к опасным для жизни осложнениям. Лечение требует медикаментозной терапии, обширной физиотерапии и специфической диеты [80].

P. aeruginosa, являющаяся основным фактором заболеваемости и смертности пациентов с хронической инфекцией дыхательных путей, ассоциированной с муковисцидозом, широко изучалась на предмет ее физиологии *in vivo*. Хотя хорошо известно, что *P. aeruginosa* обладает выраженной способностью к формированию биопленок *in vitro*, остается спорным вопрос о том, прикрепляются ли они к эпителиальным клеткам у пациентов с муковисцидозом. Некоторые более ранние исследования с использованием культур эпителиальных клеток поддерживают теорию об адгезии [81]. Тетрасахарид α GM является рецептором *P. aeruginosa*, и его повышенное содержание в апикальной мембране эпителия бронхов больных муковисцидозом скорее всего способствует колонизации *P. aeruginosa*. За связывание с α GM ответственны пили IV типа *P. aeruginosa* [82]. *P. aeruginosa*, как было показано, не связывается активно с нормальными, неповрежденными поверхностями эпителиальных клеток, но связывание с воспаленными или поврежденными эпителиальными клетками (у пациентов с муковисцидозом или пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких) у них значительно выше [83]. Однако в последние годы в результате

исследований муковисцидоза *ex vivo* появилась еще одна теория, которая становится все более популярной – бактерии не обязательно прикрепляются к поверхностям для образования биопленок, которые способствуют хроническим инфекциям [4; 84; 85]. Например, *P. aeruginosa* может проникать в эпителиальные клетки дыхательных путей, а проникшие в клетки бактерии образуют кластеры внутри клеток дыхательных путей, способствуя их персистенции, что приводит к трудностям в лечении инфекции дыхательных путей [86]. В ряде исследований утверждалось, что *P. aeruginosa* никогда не обнаруживалась на поверхности эпителиальных клеток дыхательных путей при муковисцидозе в образцах мокроты, эксплантированных клеток и тонких срезов дыхательных путей пациентов с муковисцидозом. Вместо этого были обнаружены бактериальные агрегаты, связанные со слизью и окруженные полиморфно-ядерными нейтрофилами [87–89]. Было обнаружено, что *P. aeruginosa* в искусственной мокроте образует плотные микроколонии или агрегаты, прикрепленные к компонентам мокроты, образование которых может быть усилено за счет добавления в среду сигнальных молекул quorum sensing [90; 91]. При использовании слизи, содержащей мокроту пациентов, было выявлено, что именно нейтрофильная эластаза в мокроте больных муковисцидозом способствует образованию бактериальных агрегатов [92]. Это было дополнительно подтверждено включением продуктов, полученных из нейтрофилов человека, что усилило образование неприкрепленных агрегатов *P. aeruginosa* [93]. Автоагрегирующие, не прикрепившиеся к мокроте *P. aeruginosa*, выращенные в искусственной мокроте, напоминают те, которые наблюдаются в мокроте легких больных муковисцидозом фенотипически, что позволяет предположить, что формирование агрегатов в толще слизи, вероятно, является преобладающим способом роста бактерий в очагах хронической инфекции [94]. Стоит отметить, что несмотря на схожесть неприкрепленных агрегатов *P. aeruginosa* и биопленок по скорости роста, внутренней структуре матрикса, толерантности к антибиотикам и

устойчивости к фагоцитам, мутанты, неспособные образовывать биопленки на поверхностях, все еще способны автоагрегировать в слизи [4; 92; 93; 95]. Кроме того, изоляты, полученные от больных хроническими инфекциями, ассоциированными с муковоисцидозом, часто неспособны к образованию биопленок в стандартных анализах *in vitro*, что позволяет предположить, что штаммы, способные образовывать агрегаты *in vivo*, могут плохо прикрепляться к поверхностям [96; 97]. Механизмы образования несвязанных агрегатов, встроенных в бронхиальную слизь, могут сильно отличаться от прикрепленных к поверхности биопленок [95]. Тем не менее, такие наблюдения создали основу для фундаментальных исследований формирования и распространения взвешенных бактериальных агрегатов в средах, богатых полимерами, напоминающих очаги хронической инфекции *in vivo*, которые более клинически значимы, чем микротитровальные планшеты или культуры эпителиальных клеток, для разработки более эффективных стратегий лечения.

1.4.2. Хроническая раневая инфекция

Все больше исследований указывает на то, что бактериальные агрегаты, обнаруженные в хронических раневых инфекциях, имеют тенденцию задерживаться в ложе раны или поврежденных мягких тканях с детритом [98; 99]. Кроме того, было обнаружено, что различные бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* и *Propionibacterium Acnes* образуют агрегаты в мягких тканях, проявляя устойчивость к антибиотикам после терапии [100]. Это означает, что высокогидратированная среда *in vivo*, наполненная внеклеточным матриксом, таким как коллаген и эластин, может способствовать агрегации бактерий. При изучении биоптатов язв ног, инфицированных *S. aureus*, от разных пациентов агрегаты чаще обнаруживаются на раневых поверхностях или вблизи них, тогда как *P. aeruginosa* в основном локализованы глубоко внутри раневого ложа,

окруженные полиморфно-ядерными нейтрофилами [101; 102]. Более того, было обнаружено, что агрегаты *P. aeruginosa* более распространены в диабетических ранах по сравнению с недиабетическими ранами. Они обнаруживались исключительно внутри раневого ложа и по краям раны, что приводило к повышению устойчивости к антибиотикам и нарушению заживления [103]. Было показано, что изоляты, выделенные из инфицированных ран, не образуют биопленки *in vitro*. Было также продемонстрировано, что рекомбинантные штаммы *P. aeruginosa*, дефектные в образовании биопленок, все еще могут образовывать агрегаты в ранах в мышинной модели. Это может указывать на то, что именно бактериальные агрегаты в выделениях, а не прикрепленные к твердой поверхности биопленки, могут быть основным способом существования бактерий в очаге инфекции, богатым полимерами. *In vivo* могут потребоваться специфические механизмы, необходимые для формирования агрегации, которые не пересекаются с механизмами формирования биопленок [104].

1.4.3. Другие среды организма

Бактериальные агрегаты также содержатся в кишечнике. Было показано, что *Salmonella typhimurium* агрегирует и связывается со слизью толстой кишки, что опосредуется белком теплового шока массой 66 кД, продуцируемым самими бактериями [105]. В то же время хозяин может обильно продуцировать лектиноподобный белок ZG16 (белок зимогенных гранул 16) в слизи дистальных отделов толстой кишки, который связывается с пептидогликаном бактериальной клеточной стенки и индуцирует агрегацию грамположительных бактерий [106]. Таким образом, и бактерия, и хозяин запускают механизмы бактериальной агрегации, предположительно, чтобы удерживать бактерии на безопасном расстоянии от эпителия толстой кишки и предотвращать воспаление.

Существуют данные о том, что слюна способствует агрегации бактерий таких видов, как *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides gingivalis*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus gordonii* [107–112]. Было высказано предположение, что взаимодействие IgA слюны с поверхностными структурами бактерий вызывает агрегацию бактерий, которая помимо этого зависит от ряда факторов. В результате слюна блокирует прилипание бактерий к поверхностям и способствует их выведению из полости рта [109; 110]. Более поздние исследования также показали, что бактериальные клетки агрегируют под действием слюны до идеального размера для распознавания полиморфно-ядерными нейтрофильными гранулоцитами, которые затем разрушают их с помощью сериновых протеаз для более эффективного фагоцитоза и уничтожения [112]. Используя этот сложный путь модуляции агрегации бактерий, слюна играет важную роль в первой линии защиты организма, предотвращая развитие инфекции и повреждения кровотока и тканей.

Бактериальные агрегаты уропатогенной кишечной палочки, также известные как внутриклеточные бактериальные сообщества, были обнаружены в планктонной форме в моче как здоровых добровольцев, так и пациентов с инфекциями мочевыводящих путей [113–116]. Было высказано предположение, что *E. coli* проникает в поверхностные клетки мочевого пузыря, которые затем отслаиваются и удаляются с током мочи в ответ на инвазию [117]. Однако бактерии находят способ размножаться внутриклеточно и в конечном итоге образовывать агрегаты, подобные биопленкам. Подобно стадиям роста биопленок, эти агрегаты проходят четыре стадии с разными скоростями роста, длиной бактерий, организацией колоний, подвижностью и распространением. По ходу жизненного цикла агрегатов на разных стадиях из них могли появиться некоторые

физиологически адаптированные нитчатые внутриклеточные бактерии [117; 118]. По существу, эти агрегаты создают спящий резервуар внутри клеток мочевого пузыря, что позволяет им выйти из-под контроля иммунной системы хозяина и быть устойчивыми к антибиотикам [15]. После диспергирования планктонные клетки могут вызвать рецидив инфекции мочевыводящих путей, а также могут быть причиной хронического цистита [15; 115]. Именно агрегированные бактерии, а не биопленки, прикрепленные к твердым поверхностям, вызывают эти неразрешимые медицинские проблемы.

1.5. Молекулярные механизмы автоагрегации патогенных бактерий, модели автоагрегации

Молекулярные механизмы, лежащие в основе бактериальной автоагрегации, различаются по своей природе. Это могут быть простые поверхностные электростатические эффекты, например агрегация клеток из-за гидрофобных свойств поверхности в водном растворе [29; 119–121]. Также бактерии с заряженной поверхностью могут агрегировать в присутствии противоположно заряженного агглютинина, например, положительно заряженные менингококки агрегируют в присутствии внеклеточной ДНК, которая представляет собой полианион [122]. Кроме того, неадсорбирующие полимеры могут вызывать автоагрегацию бактерий под действием силы истощения (depletion force) [123]. Однако в большинстве случаев автоагрегация бактерий опосредуется гомотипическими взаимодействиями между поверхностными белками.

1.5.1. Эффекторы автоагрегации

Пили

Фимбрии или пили представляют собой поверхностные органеллы, играющие важную роль в адгезии. Пучокообразующие пили энтеропатогенных *E. coli* являются эффекторами автоагрегации, которые опосредуют локальное прилипание к эпителиальным клеткам, что приводит к образованию микроколоний, которые стягиваются за счет ретракции ворсинок и стабилизируются другими адгезинами [124; 125]. Другие пили IV типа, опосредующие автоагрегацию, включают многие типы энтероагрегационных фимбрий агрегации и адгезии *E. coli* [126–129] и пили IV типа *Neisseria meningitidis* [130; 131]. Эти выдвижные пили обычно опосредуют адгезию клеток за счет связывания белков кончика пилуса со специфическими рецепторами и аутоагрегацию посредством латеральных связывающих взаимодействий между основными структурными субъединицами разных ворсинок [131]. Эти адгезины с двойной функцией важны для инициации, роста, поддержания и дисперсии автоагрегатов (микроколоний) в инфекционных нишах. Другими примерами поверхностных органелл, участвующих в автоагрегации, являются F-пили *Vibrio cholerae* [132], курли [133], филаменты EseB *Edwardsiella piscida* [134] и Tad-пили *Vibro vulnificus* [135].

Адгезины нефимбральной природы

Среди адгезинов *Enterobacteriales* стоит выделить белки системы секреции V типа, иначе называемые аутоотранспортерами. К ним относятся, помимо прочего, мономерные аутоотранспортеры *Veillonella* A-C [136]; сериновые протеазы энтеробактерий (SPATE), такие как тандемный аутоотранспортер B и C (TagB и TagC), гемагглютининовый аутоотранспортер sha [137]; Ag 43 *E. coli* (Ag43 или Flu) [138] и тримерные аутоотранспортеры, такие как EibC, EibD, адгезин A *Yersinia* (YadA) энтеропатогенных *Yersinia enterocolitica* (YeYadA) и *Y. pseudotuberculosis* (YpYadA) [139] и *Veillonella*

тримерные автотранспортеры *Veillonella* A-I [136]. Интегральные β-цилиндрические белки также могут обеспечивать автоагрегацию [140]. Адгезины могут связываться с гетерологичными рецепторами, но автоагрегация как правило достигается за счет самоассоциации. Структурная субъединица пилей *N. meningitidis* PilE опосредует автоагрегацию электростатическими силами, для чего требуется С-концевого остаток лизина [131]. Термоустойчивый агглютинин 1 (Hra1) и его аллельный вариант Нек [141] зависят от специфических участков взаимодействия, но их структурная основа для самоассоциации в настоящее время неизвестна [142]. Известны кристаллические структуры для нескольких самоассоциирующихся аутоагглютинаторов (SAAT), обеспечивающие лучшее понимание механизмов самоассоциации [143].

Антиген 43 самоассоциируется с помощью механизма типа «застежки» [138; 144]. Взаимодействующие поверхности находятся в L-образном пассажирском домене этого SAAT, включающем субдомены SL, EJ и дна BL. Каждый из этих трех субдоменов имеет два подтипа: SL1 и SL2; EJ1 и EJ2; и BL1 и BL2, и шаффлинг этих субдоменов приводит к четырем различным подклассам Ag43. Все подтипы преимущественно ассоциируются друг с другом, а гетеротипические ассоциации возникают в основном между подклассами, имеющими один и тот же подтип SL [144]. Самоассоциирующийся домен белка Нар *Haemophilus influenzae*, другого SAAT, складывается в трехгранную призму с гидрофильными остатками снаружи и гидрофобным ядром. Одна из граней каждой призмы, грань F2, взаимодействует с ребром F1–F2 другой, образуя мультимерную решетку [145]. Другие SAAT не имеют общих черт ни с Ag43, ни с Нар; весьма вероятно, что существуют другие самоассоциирующиеся механизмы и что эти функции развивались конвергентно.

Секретируемые макромолекулы

Автоагрегация может быть непрямым следствием секретируемого фактора, опосредующего агрегацию косвенно путем соединения других поверхностных факторов [146]. Лечение протеиназой К чаще изменяет или полностью уничтожает аутоагрегацию по сравнению с лечением периодатом натрия (удаление полисахарида) и ДНКазой 1 (удаление внеклеточной ДНК) [147–149]. Однако полисахариды, а также внеклеточная ДНК, высвобождаемые при аутолизе, могут опосредовать автоагрегацию. Миртенол, биоактивное растительное производное, ингибирующее аутолиз, вызывает значительное снижение способности к автоагрегации метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* [150].

1.5.2. Регуляция автоагрегации

Кальций индуцирует автоагрегацию в культуре *Aeromonas Hydrophila*, когда он является доминирующим обменным ионом в среде [133; 148]. Такой эффект могут оказывать галловая кислота в культуре *Actinomyces naeslundii* и хлорид натрия в культурах *Pediococcus pentosaceus* R1 и *Lactobacillus Fermentum* R6 [146; 151; 152]. Эти примеры иллюстрируют, что автоагрегация является регулируемым фенотипом, изменяющимся под действием факторов окружающей среды.

Регуляция может быть транскрипционной, посттранскрипционной или даже возникать в результате взаимодействия различных внешних факторов [153]. Адгезины, особенно короткие, такие как интегральные белки внешней мембраны и аутопереносчики, могут быть замаскированы или экранированы экзополисахаридами, пилиями и даже секретируемыми белками [31; 140; 153–156]. У *Lactobacillus rhamnosus* продукция экзополисахарида маскировала прилипание пилей spaCBA, а инкапсулированные клетки *Pasteurella multocida* автоагрегировали меньше, чем неинкапсулированные *P. multocida* [155; 157]. Такое свойство капсулы может быть связано с ее электростатическим отрицательным зарядом или стерической обструкцией

факторов автоагрегации [158]. Таким образом, автоагрегация является продуктом сложного взаимодействия поверхностных факторов, который обеспечивают маскировку или демаскировку, когда это необходимо; и он тщательно регулируется транскрипционно и посттранскрипционно.

Транскрипционная регуляция

Внутриклеточные уровни бактериального циклического дигуанозинмонофосфата, участвующего в адгезии/дисперсии бактерий и выработке экзополисахарида, регулируются деградацией фосфодиэстеразы. У *Erwinia amylovora* удаление *pdeABC* приводило к образованию четко определенных агрегатов с повышенным производством амиловорана, экзополисахарида и целлюлозы [159]. У грамотрицательных бактерий в ответ на стресс оболочки, вызванный изменениями окружающей среды, реагирует двухкомпонентная сигнально-регуляторная система трансдукции CpxA/CpxR. Сигналы окружающей среды заставляют CpxA аутофосфорилировать, а затем фосфорилировать регулятор цитоплазматического ответа CpxR. CpxR увеличивает автоагрегацию, но снижает вирулентность. Удаление CpxR приводит к снижению автоагрегации и образованию биопленок у *Proteus mirabilis* и *Salmonella enteritidis*, но к увеличению экспрессии основных генов вирулентности *Salmonella* [160; 161].

Эпигенетическая регуляция

Многие факторы аутоагрегации регулируются эпигенетически, и Ag43 является классическим примером. *E. coli*, имеющая индуцированный ген *agn43* в, образует шероховатые колонии и очень заметную автоагрегацию в жидких культурах [162]. Дезоксиаденозинметилаза (Dam) метилирует сайты GATC выше гена антигена 43 (*agn43*, *flu*); в неметилированном состоянии эти сайты связываются белком окислительного стресса OxyR, который подавляет транскрипцию. У штаммов *E. coli* с мутантным геном *dam* ген *agn43* находится в репрессированном состоянии, а у штаммов с мутантным геном

oxyR этот ген индуцирован. Эти и другие данные подтверждают концепцию, согласно которой метилирование ДНК выше промотора *agn43* предотвращает связывание репрессора *OxyR*. При репликации, если *OxyR* связывается с промотором до того, как *Dam* метилирует сайты GATC, потомство клеток, экспрессирующих *Ag43*, не экспрессирует белок и, следовательно, производит гладкие, неагрегирующие штаммы, в которых *Ag43* не обнаруживается [163].

Фазовые вариации позволяют штаммам с самоассоциирующими белками время от времени отключать их в субпопуляции или в нишах, где автоагрегация может быть вредной. Возникающая в результате популяционная гетерогенность является эволюционно выгодной. Как было продемонстрировано на примере *Ag43*, автоагрегация часто является преимуществом на начальных этапах колонизации, но может мешать поддержанию колонизации или инвазии [164]. Таким образом, поэтапная автоагрегация эволюционно выгодна для длительной персистенции. *Hag/MID* — гемагглютинин/связывающий IgD белок — представляет собой белок-аутопереносчик, обнаруживаемый в изолятах *Moraxella catarrhalis* от недавно инфицированных пациентов, но не экспрессируемый изолятами *M. catarrhalis* от больных хронической обструктивной болезнью легких, у которых также снижена автоагрегация. Переключение в этом случае происходит путем ошибок репликации при редактировании [165].

Посттрансляционная регуляция

Эпигенетический контроль приводит к индукции или репрессии в отдельных клетках до тех пор, пока деление клеток не позволит изменить фазу. Таким образом, бактериальные клетки, образовавшие автоагрегаты, не могут выйти, если они не вытеснены под действием внешней силы или в результате протеолиза. Белок *Hap* *H. influenzae* имеет протеолитический домен, отдельный от его самоассоциирующегося домена, который эффективно отщепляет молекулу от поверхности клетки, обеспечивая

«встроенный» механизм выхода из автоагрегата [166]. Механизмы выхода недостаточно изучены и, вероятно, являются распространенным явлением, поскольку они позволяют бактериям покинуть автоагрегат, когда агрегированное состояние невыгодно. Например, после того как *N. meningitidis* после автоагрегации и адгезии, бактерии добавляет фосфоглицериновый фрагмент к своим пилим IV типа. При этой модификации пили продолжают прилипать, но больше не самоассоциируются, тем самым высвобождая бактерии, не контактирующие с клетками-хозяевами, для распространения инфекции [167]. Автоагрегация также может быть остановлена с помощью антиагрегационных белков. Удаление гена, кодирующего антиагрегационный белок (Aap) энтероагрегативной *E. coli*, также известный как дисперсин, приводит к образованию увеличенных скоплений этих бактерий [168]. Первоначально считалось, что Aap электростатически оптимизирует расположение фимбрий вокруг бактериальных клеток и действительно может отчасти функционировать таким образом [169]. Однако секретируемый Aap на поверхности клетки эффективно маскирует интегральный аутоагглютинин внешней мембраны Hra1 [170]. Двойные мутанты Aap и hra1 не являются автоагрегирующими [153].

1.6. Измерение автоагрегации *in vitro*

Седиментация в жидкой среде

Бактериальные агрегаты быстрее и компактнее оседают в жидкой культуре, и это является основой наиболее распространенного непрямого метода, используемого для обнаружения и количественной оценки автоагрегации [171]. Автоагрегацию можно наблюдать макроскопически в виде хлопьев/отложений на дне пробирки. Структуру автоагрегата можно оценить, просмотрев образец осадка с помощью светлоразличной, фазово-контрастной или флуоресцентной микроскопии, в зависимости от того, как

клетки были помечены или окрашены. Изменение поверхностной оптической плотности с течением времени можно использовать для расчета скорости автоагрегации [149].

Проточная цитометрия

Проточные цитометры используют лазерный луч для сортировки клеток по размеру, сложности или содержанию. Сигнал прямого канала рассеяния (FSC) пропорционален размеру ячейки или агрегата. Сигнал канала бокового рассеяния (SSC) соответствует структурной сложности и детализации. Таким образом, многопараметрический анализ обоих сигналов с соответствующим стробированием позволяет сортировать и подсчитывать отдельные и агрегированные ячейки в образце. Агрегаты будут иметь более высокий FSC и SSC, в то время как отдельные клетки будут иметь более низкие FSC и SSC [135; 138; 172].

Седиментация в полужидкой среде

Вязкость полужидкой агаризованной среды ограничивает смещение образующих цепочки *Streptococcus salivarius* и может использоваться для измерения латеральной автоагрегации. Захваченные цепи во внеклеточном агаровом матриксе образуют круглые суспендированные колонии, в то время как дифференциально смещенные бактерии, не образующие цепей, избегают иммобилизации агарового матрикса, что приводит к образованию колоний с более быстро оседающими «корнями» [149].

Атомно-силовая микроскопия

Атомно-силовые микроскопы (АСМ) можно использовать для определения силы между кончиком зонда и поверхностью исследуемого образца. Сила притяжения заставляет кантилевер, прикрепленный к наконечнику, отклоняться, и это отклонение чаще всего обнаруживается с помощью лазерного луча. Рассчитанная сила притяжения может быть использована для определения физико-химических и молекулярных свойств

образца. АСМ использовали для исследования поверхности агрегатов клеток с целью определения их морфологии и адгезионной прочности [138; 156].

1.7. Экспериментальные модели, основанные на феномене магнитной левитации

Микробиологические исследования занимают важное место в освоении космоса в связи с большой ролью микроорганизмов в жизни человека. Значительные усилия были предприняты в микробиологических исследованиях, связанных с медициной [173–175]. Другое важное направление микробиологических космических исследований связано с многочисленными практическими приложениями от утилизации отходов до создания микробных клеточных фабрик в космосе [176–178]. Значительные усилия, предпринятые в этих областях, выявили заметные изменения в метаболизме и физиологии бактерий в условиях космического полета. Космический полет обеспечивает уникальные условия микрогравитации, недоступные на Земле. Показано, что бактерии реагируют на микрогравитацию изменениями в скорости роста, размерах клеток, подвижности, формировании биопленок, устойчивости к антибиотикам и вирулентности [179–182; 182–185]. В последние годы все большее число микробиологических исследований используют “омиксные” технологии для анализа изменений в экспрессии генов и продукции белков. Условия микрогравитации изменяют экспрессию стрессорных систем, индуцируют изменения в генах, связанных с образованием биопленок, влияют на поверхностные структуры, включая белки-транспортеры и пили, и заметно влияют на спектр вторичных метаболитов [186–192]. Также в условиях невесомости в космосе бактерии в культуре не подвержены действию силы гравитации, силы сдвига и силы Архимеда в толще жидкости, за счет этого процесс автоагрегации бактерий в космосе происходит активнее, чем в естественных и лабораторных условиях на Земле. Помимо очевидной

важности фундаментальных знаний об изменениях в физиологии и метаболизме бактерий, микробиологические исследования в условиях микрогравитации могут оказаться полезными в будущих проектах, выполняемых в космосе и на Земле, а применение эффектов микрогравитации может дать преимущество в биотехнологических платформах.

Пилотируемые космические корабли и особенно орбитальные станции «Мир» и Международная космическая станция (МКС) более 50 лет обеспечивали условия микрогравитации для проведения многочисленных микробиологических экспериментов [173; 193]. Однако финансовые ограничения, ограничения безопасности и времени на космические исследования потребовали разработки наземных моделей для изучения специфических особенностей микрогравитации. Для бактерий, растущих в объеме жидкости, условия космического полета обеспечивают невесомость, отсутствие седиментации и условия сниженной подвижности из-за отсутствия конвекционных течений внутри жидкости [173; 194]. Был разработан ряд земных моделей, имитирующих эти признаки микрогравитации. Устройства, основанные на вращении вокруг одной или двух осей, например клиноостаты, широко используются как модель микрогравитации [195–197]. Клетки, помещенные во вращающиеся устройства, подвержены действию комбинированной силы, обеспечиваемой суммой векторов силы тяжести и центробежной силы.

Другая модель, используемая на Земле для воспроизведения условий микрогравитации основана на эффекте магнитной левитации, который обеспечивается за счет уравнивания вектора гравитации магнитной силой [198–200]. Магнитная левитация (MagLev) широко используется в прикладных исследованиях для создания условий, в которых объект подвешивается без какой-либо поддержки, кроме магнитного поля, для компенсации гравитации. В микробиологических исследованиях MagLev

позволяет решать различные задачи, включая разделение бактериальных клеток, дифференцировку или наоборот концентрация бактерий в зависимости от конфигурации системы [200–202]. Использование систем MagLev в космических исследованиях находится на начальной стадии, но применение магнитной силы в условиях космического полета открывает новые возможности для модификации условий роста бактерий в соответствии с исследовательской и биотехнологической необходимостью.

Магнитная сила возникает в результате воздействия неоднородного магнитного поля на электроны в молекулах и атомах. Если магнитная сила, воздействующая на диамагнетик, направлена вверх и уравновешивает силу гравитации, то таким образом может быть достигнута невесомость. Это явление известно как магнитная левитация. Вода и все живые существа - диамагнетики, поэтому они могут левитировать в магнитном поле [201–205].

При приложении внешнего магнитного поля намагниченность определенного материала зависит от его атомных свойств, например наличия неспаренных электронов. Магнитные моменты электронов реагируют на притяжение или отталкивание внешнего магнитного поля. Величина намагниченности количественно выражается через магнитную проницаемость μ . Магнитная восприимчивость μ диамагнетиков отрицательна ($\mu < 0$) и имеет низкие значения порядка -10^{-5} . Помещенный в градиент магнитного поля, диамагнитный объект отталкивается в область наименьшего магнитного поля. В парамагнетиках магнитная восприимчивость положительна ($\mu > 0$) и обычно составляет от 10^{-5} до 10^{-3} . При приложении внешнего магнитного поля парамагнитные объекты притягиваются в область более сильного магнитного поля подобно ферромагнитным, но с несравненно меньшей силой. Таким образом, магнитные эффекты в диамагнетиках отличаются от эффектов в парамагнетиках [203; 204].

Магнитная сила сообщает любому объекту ускорение, равное $a_m = (\mu / (\rho \mu_0)) \text{BdV} / \text{dr}$, где μ — магнитная проницаемость, ρ — плотность объектов, μ_0 — проницаемость вакуума, B — плотность магнитного потока, величина, характеризующая магнитное поле в данной точке рабочего объема, а $(\text{BdV}) / \text{dr}$ — его градиент в этой же точке. Для диамагнитных объектов магнитная сила и ускорение a_m направлены в точку наименьшего магнитного поля.

Магнитная сила действует во всем объеме объекта, поэтому сила, поддерживающая объект в пределах градиента магнитного поля, действует на внутренние структуры в соответствии с их магнитными проницаемостями. Магнитная восприимчивость клетки близка к восприимчивости воды, которая является важной частью живой клетки. Магнитная проницаемость одноклеточных эукариот *Paramecium*, взвешенных в водной среде, составляет $-0,911 \times 10^{-5}$ при магнитной проницаемости среды равной $-0,904 \times 10^{-5}$ соответственно [206]. Магнитная восприимчивость цитозольной и липидной фракций клетки протистов отличается от магнитной восприимчивости воды на 2% и 10% соответственно. Тем не менее, в некоторых случаях сложный состав живой клетки может влиять на распределение магнитных сил из-за различий в магнитных свойствах клеточных структур, таких как ферримагнитные кристаллы магнитотактических бактерий, которые имеют магнитную восприимчивость $\mu \approx 10^6$ [207; 208]. Помимо таких особых структур, основные физические принципы предполагают, что магнитные поля слабо взаимодействуют с органическими молекулами [209; 210]. Тонкие эффекты, связанные с присутствием магнитных ионов, таких как Fe^{3+} , изотопа магния $^{25}\text{Mg}^{2+}$ или изотопа цинка $^{67}\text{Zn}^{2+}$, могут изменять скорость ферментативных реакций, в которых участвуют ферменты с этими металлами в активном центре, и влиять на клеточный метаболизм, но не обладают достаточной силой, способных перемещать клетки целиком [211; 212].

Если рассматривать бактерии, взвешенные в жидкости и помещенные в магнитное поле, то на бактериальную клетку действуют три силы: гравитационная, архимедова и магнитная. Для обеспечения эффекта магнитной левитации векторная сумма силы Архимеда и магнитной силы должна уравновешивать гравитационную силу. Среди этих трех сил гравитационная и магнитная силы действуют во всем объеме, а сила Архимеда действует на поверхности бактерии. Таким образом, магнитная левитация отличается от нейтральной плавучести, имеющей место у микроорганизмов, плавающих в океане, когда сила Архимеда уравновешивает гравитационную силу и приближается к невесомости [213]. Для бактериальной суспензии в парамагнитных жидкостях разница между архимедовыми и магнитными силами может быть иной, чем для водной суспензии. Поэтому магнитная левитация применительно к бактериальной суспензии обеспечивает частичную невесомость и может быть использована для изучения реакции бактерий на эти условия. Это вместе с многочисленными практическими приложениями делает привлекательными модели, основанные на магнитной левитации (рис. 2) [214].

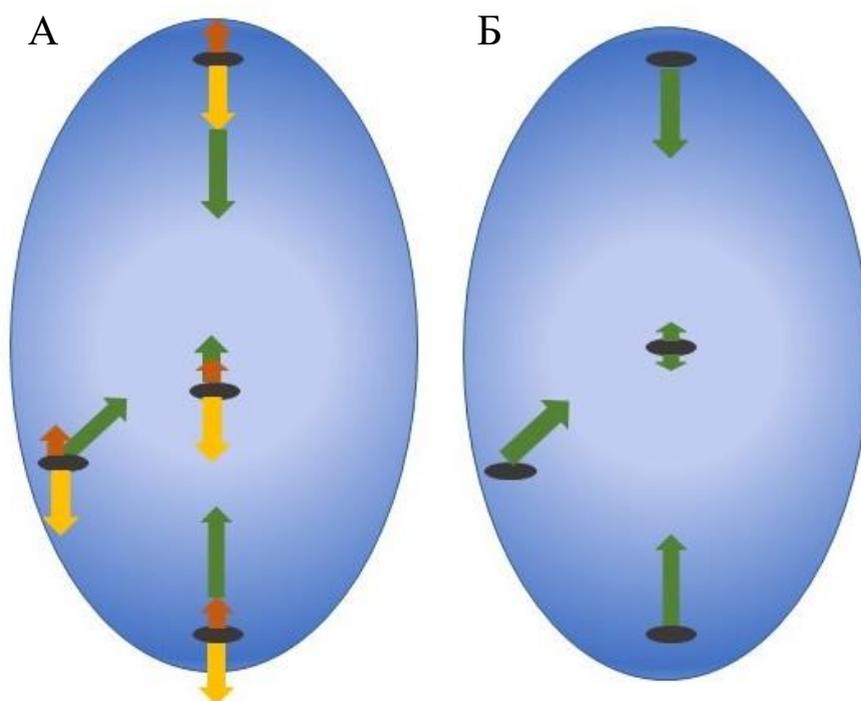


Рис. 2 Силы, действующие на бактериальную клетку, помещенную в магнитное поле. А – условия магнитной левитации на Земле (зеленой стрелкой обозначены векторы магнитной силы, желтой – гравитации, коричневой – силы Архимеда), Б – условия магнитной левитации в космосе. Изображение взято из [215].

1.8. Модели микрогравитации, основанные на сверхпроводящих магнитах и их ограничения

Сверхпроводящие магниты, используемые для магнитной левитации живых объектов, представляют собой вертикально ориентированные соленоиды с диаметром отверстия от 32 мм до 195 мм, обеспечивающие сильное неоднородное магнитное поле, достигающее 33 Т и более [196; 201]. Внутри магнитное поле наиболее сильно в центре соленоида и ослабевает вверх и вниз от центра. В точке наибольшего магнитного поля градиент равен нулю, следовательно, магнитная сила также равна нулю. сила, которая всегда направлена в область нижнего магнитного поля, направлена вверх в верхней части соленоида и вниз в нижней части. Левитация диамагнетика наблюдается над центром соленоида, где магнитная сила уравнивает

гравитацию. Значения плотности магнитного потока, при которых наблюдается левитация, колеблются от 8 до 16 Т в зависимости от конкретной конфигурации соленоида [198; 199; 213; 216]. Напротив, произведение магнитного поля и его градиента VdB/dr теоретически рассчитывается для капли воды из уравнения $a_m = g = (\mu / (\rho \mu_0)) VdB/dr$, где ускорение свободного падения $g = 9,8 \text{ м} \cdot \text{с}^{-2}$, плотность воды $\rho = 1000 \text{ кг} \cdot \text{м}^{-3}$, а магнитная проницаемость воды $\mu = -0,9 \cdot 10^{-5}$ [201]. Это значение составляет около $1370 \text{ Т}^2 \cdot \text{м}^{-1}$ в точке левитации. Сверхпроводящие соленоидные системы успешно использовались для левитации лягушек и их яиц, растений, простейших и бактерий, а также для изучения их физиологии и метаболизма на клеточном уровне [199; 206; 213; 214]. Тем не менее, такие системы не являются портативными, особенно если говорить о космических исследованиях, и имеют ограниченные параметры области левитации (конфигурация направления магнитной силы, площади и объема) [217].

В ряде работ исследовались ограничения и артефакты, возникающие при применении сверхпроводящих магнитов в исследованиях магнитной левитации, которые искажают эффекты симулированной микрогравитации. Наиболее важным воздействием, которое может нивелировать эффекты невесомости, является само сильное магнитное поле. Хотя было показано, что сверхсильные магнитные поля ($>10 \text{ Т}$) не нарушают экспоненциальный рост бактерий, такие поля обеспечивают тонкие эффекты на экспрессию генов, которые влияют на рост бактерий в стационарной фазе, морфологию клеток и продукцию вторичных метаболитов [218–220]. Градиент магнитного поля может оказывать дополнительное влияние на физиологию и метаболизм бактерий, хотя такие эффекты в основном описаны для клеток млекопитающих и наблюдаются при значениях градиента от 10^3 до $10^9 \text{ Т} \cdot \text{м}^{-1}$ [221]. Помимо прямых эффектов, связанных с реакцией клеток на магнитное поле и его градиент, были описаны косвенные эффекты, изменяющие рост бактерий. Градиент магнитного поля, формирующийся в сверхпроводящих

магнитах, приводит в действие потоки кислорода, что помимо эффектов самой невесомости, улучшает рост бактерий [213]. Системы охлаждения супермагнитов влияют на температурный градиент, который, в свою очередь, вызывает конвекционные потоки, которые также могут влиять на рост бактерий и которые отсутствуют в условиях микрогравитации в космосе, где конвекционные потоки отсутствуют [201]. Тем не менее, дальнейшие исследования показали, что эффекты сильных магнитных полей и искусственной микрогравитации можно разделить, тем самым подтверждая пригодность магнитной левитации в качестве модели микрогравитации [216; 220; 222; 223]. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что правильный контроль играет наиболее важную роль в экспериментах по магнитной левитации как модели для изучения влияния микрогравитации на живые объекты.

1.9. Модели магнитной левитации, основанные на постоянных магнитах

Сильные постоянные магниты, изготовленные из сплавов, содержащих редкоземельные элементы, лишены некоторых недостатков сверхпроводящих магнитов. Из преимуществ постоянных магнитов стоит отметить их относительно низкую стоимость, небольшие размеры, независимость от внешней инфраструктуры и портативность. Кроме того, постоянные магниты работают при меньших магнитных полях и не нарушают равномерного распределения температуры внутри рабочего объема, что препятствует возникновению конвекционных течений из-за градиента температуры. Наконец, различное взаимное расположение постоянных магнитов может обеспечить четкое пространственное распределение градиентов магнитного потока, что делает его пригодным для самых разных задач.

Среди постоянных магнитных магнитов наиболее сильными являются неодимсодержащие магниты. Значение плотности магнитного потока

неодимовых магнитов достигает 2 Тл, т.е. их магнитной силы не хватает для магнитной левитации [224]. Проблема слабых магнитных полей была успешно решена для диамагнитных объектов, таких как бактерии, использованием парамагнитных или супермагнитных жидкостей [206; 222; 225–228]. Магнитная сила, действующая на диамагнитный объект, плавающий в парамагнитной среде, возрастает пропорционально разности значений магнитной проницаемости клетки и среды [206; 228]. Экспериментально было показано, что разница между магнитной проницаемостью одноклеточных эукариот *Paramecium* и стандартной среды культивирования составляет всего $0,007 \times 10^{-5}$, а добавление в среду 4 мМ раствора соли гадолиния Gd-DTPA (Гадолиний-диэтиленetriаминпентаацетат) увеличивает разницу в 100 раз до $0,764 \times 10^{-5}$, что снижает требуемое значение параметра BdB/dr с $1370 \text{ T}^2 \cdot \text{m}^{-1}$ до $510 \text{ T}^2 \cdot \text{m}^{-1}$ [206]. Гадолиний — редкоземельный элемент, широко применяемый в медицине, входящий в состав сложных химических веществ. Экспериментально было продемонстрировано, что добавление в среду на водной основе другого вещества на основе гадолиния, гадобутрола (Gd-DO3A-бутрол), взятого в концентрации 10 мМ, обеспечивает левитацию клеток человека в статическом магнитном поле, создаваемом неодимовыми магнитами с остаточной намагниченностью 1,21 Т [222; 228]. Подобные условия способствовали магнитной левитации бактериальных клеток [222]. 20 мМ гадобутрол обеспечивает левитацию макроскопических неприкрепленных агрегатов, образованных бактериями и продуцируемым бактериями внеклеточным матриксом, в магнитном поле, создаваемом неодимовыми магнитами. Магнитная левитация в 50 мМ гадобутроле позволил разделить жизнеспособные и убитые антибиотиками *E. coli* по их плавучести [227].

Таким образом, добавление в среду производных гадолиния обеспечивает магнитные силы, достаточные для левитации бактерий и клеток

млекопитающих с помощью магнитных полей, создаваемых постоянными магнитами. Однако при использовании этих систем следует учитывать потенциальное токсическое действие солей гадолиния, а также влияние сильного магнитного поля и его градиента, как описано выше. Производные гадолиния широко используются в качестве контрастных веществ в магнитно-резонансной томографии (МРТ), поэтому их токсичность широко изучена [229–231]. Способность Gd^{3+} конкурировать с Ca^{2+} в активных центрах Ca^{2+} -связывающих ферментов лежит в основе токсичности гадолиния, поскольку замена Ca^{2+} на Gd^{3+} может прервать критически важный Ca^{2+} -зависимый транспорт [229]. Для снижения токсичности в МРТ используют вещества на основе гадолиния, т.к. комплекс Gd^{3+} , который, как предполагается, остается хелатным в организме человека и выводится из организма в неизменном виде. Быстрая и почти неизменная экскреция была продемонстрирована для одобренных FDA контрастных веществ, таких как гадобутрол [230; 231]. У бактерий, хотя ионы Ca^{2+} не играют такой критической роли, как у млекопитающих, Ca^{2+} -зависимые белки участвуют в таких клеточных функциях, как подвижность и хемотаксис, вирулентность и поддержание целостности мембраны [232–234]. Потенциальные токсические эффекты веществ на основе гадолиния следует учитывать в исследованиях магнитной левитации на физиологию бактерий.

Еще одним ограничением описанного подхода является изменение характера действия магнитной силы. Введение парамагнитной жидкости имеет эффект, аналогичный действию архимедовой силы, когда появление силы связано со смещением объема жидкости. В результате сила действует на поверхности, а не во всем объеме. Таким образом, хоть мы и получаем нейтральную плавучесть, моделируемая микрогравитация ограничена. Этот эффект ограничивает использование моделей магнитной левитации на основе постоянных магнитов в исследованиях физиологических изменений в

условиях микрогравитации. С другой стороны, описанные системы могут быть эффективно использованы в других приложениях.

1.10. Использование магнитной силы для разделения клеточной суспензии

Важным преимуществом постоянных магнитов является способность формировать различные трехмерные градиенты магнитного поля путем взаимного расположения магнитов в соответствии с конкретной целью исследования. В зависимости от конфигурации магнитов различные модели магнитной левитации позволяют решать различные задачи, включая разделение клеток, размещение их в конкретной точке пространства или агрегацию [200]. В базовой схеме используются два магнита, ориентированных друг к другу одинаковыми полюсами [227; 235]. Эта система была усовершенствована за счет использования параллельных кольцеобразных магнитов или расширена для использования с 96-луночными планшетами [152; 236; 237]. Описанные выше системы успешно используются для исследований разделения клеток. Различную плотность клеток обеспечивает различие в силе Архимеда, что, в свою очередь, влияет на требования к магнитной силе, уравнивающей клетки для размещения на разной высоте. С другой стороны, левитация на разных высотах может быть вызвана разной магнитной проницаемостью. Например, изменения в проницаемость бактериальной мембраны после экспозиции антибиотиками, приводят к изменению высоты левитации, что, по-видимому, связано с проникновением парамагнитной среды в цитоплазму, что, в свою очередь, изменяет как плотность клеток, так и магнитную проницаемость [227]. Таким образом, использование магнитной силы и модели магнитной левитации в сочетании с введением специфических магнитных маркеров открывает новые перспективы в микробиологии.

Насколько известно, модели магнитной левитации, подобные описанным выше, еще не использовались в космических экспериментах. В условиях космического полета магнитная сила — единственная сила, толкающая бактерии, которая уменьшила бы различия в распределении клеток по оси своего действия. Тем не менее, такие системы могли бы эффективно применяться в имитационном гравитационном моделировании при освоении космоса наряду с центрифугами, которые используются сейчас.

В то время как описанные выше системы используются для разделения и дифференцировки клеток, альтернативное взаимное расположение магнитов обеспечивает интеграцию клеток. В лаборатории 3d bioprinting solutions, Ltd разработали магнитный биопринтер, включающий в себя два магнита круглой формы, расположенных непосредственно рядом друг с другом [228]. Такое взаимное расположение магнитов приводит к созданию резкого градиента магнитного поля, уменьшающегося к центру рабочего объема, где магнитное поле наименьшее. Бактериальные и клеточные взвеси в среде с добавлением гадобутрола при помещении в биопринтер собираются вблизи центра рабочего объема [222]. Такой подход применительно к клеткам человека обеспечивает биосборку трехмерных тканей без каркасов, меток и сопел [228; 238]. При воздействии на бактериальные клетки биобиопринтер стимулирует процесс автоагрегации, в результате чего образуются неприкрепленные бактериальные агрегаты [222].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Бактериальные штаммы и условия роста

В работе использовались грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* штамм ATCC 25923 и *Listeria monocytogenes* штамм EGDe, а также грамотрицательные *Escherichia coli* штаммы ATCC43890, M17, JM109 и *P.aeruginosa* 2943. Штаммы перечислены в таблице 1.

Таблица 1. Используемые в исследовании бактериальные штаммы

Вид	Штамм	Генотип
<i>S. aureus</i>	ATCC25923	Дикий тип
<i>L. monocytogenes</i>	EGDe	Дикий тип
<i>E. coli</i>	ATCC43890	Дикий тип
<i>E. coli</i>	M17	Дикий тип
<i>E. coli</i>	JM109	endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 [rk- mk+] relA1 supE44 Δ[lac-proAB] [F'traD36 proAB lacIqZΔM15]
<i>P. aeruginosa</i>	2943	Дикий тип

В ходе работы на основе штамма *E. coli* ATCC43890 был получен мутантный штамм *E. coli* Cpm, продуцирующий амилоидоподобные белки курли за счет точечной мутации в гене *rscB*. В дальнейшем на основе мутантного штамма были получены рекомбинантные штаммы Cpm(pAL2-T), содержащий плазмидный вектор pAL2-T, и Cpm(pAL2-T::*rscA*), гиперпродуцирующий белок RcsA. Полученные рекомбинантные штаммы представлены в таблице 2.

Таблица 2. Полученные в ходе работы рекомбинантные штаммы

1	Cpm(pAL2-T:: <i>rcsA</i>)	RcsA
2	Cpm(pAL2-T)	Контрольный штамм

2.2. Используемые плазмиды и праймеры

В процедурах клонирования и экспрессии были использован плазмидный вектор pAL2-T (ЗАО «Евроген», Россия)

Используемые праймеры представлены в таблице 3.

Таблица 3. Последовательность праймеров, использованных для исследования

Наименование	Нуклеотидная последовательность
MlrA-A	5'-AAGTGGCGTTGCTTTGTGAT-3'
MlrA-B	5'-AACAGATGTGTGGTGAGTGTCTG-3'
MlrA-C	5'-GATGCACAATAGGCACTACGC-3'
MlrA-F	5'-CACCGGAAGGACAATTCATC-3'
RcsB-F	5'-ACGCTGGAACATCTGATTCGTG-3'
RcsB-R	5'-TGCCGAGAGGGTCAGGAAATC-3'
RcsA1	5'-CGTTACGCATTGAGTGAGG-3'
RcsA2	5'-CAGGAGGAAAACGATGAAGG-3'
RcsA3	5'-CGTTATCATTGAGCCGAACC-3'
RcsA4	5'-TCTTTCCTGCGTTATCCC-3'

Все культуры хранили замороженными при -70°C в 10 % глицерине. Перед началом эксперимента из замороженного образца брали аликвоту стерильной петлей, которую высевали на агар Лурия-Бертани (LB)(Amresco, США), после чего культивировали в жидкой питательной среде LB. Культивирование штаммов *E. coli* Cpm(pAL2-T::*rcsA*) и Cpm(pAL2-T), проводили на жидкой и твердой питательных средах LB с добавлением

антибиотика ампициллина концентрации 150 мкг/мл. Для отбора клонов с конструкцией pAL2-T::*rcaA* после электропорации культуру *E.coli* растили на среде LB с добавкой ампициллина 150 мкг/мл, IPTG-0,1М, X-Gal-50 мкг/мл. Культивирование в бульоне проводили с шутелированием при 200 об/мин. Для создания парамагнитной питательной среды в бульон LB стерильно добавляли 0,2 М (или 0,1 М в некоторых экспериментах) Гадовиста (Bayer). Активным веществом Гадовиста является 1 М гадобутрол (Gd-DO3A-бутрол). Гадобутрол представляет собой парамагнитное вещество, используемое в диагностических целях при исследованиях с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ). Для постановки эксперимента в биопринере ночную культуру исследуемого штамма, выращенную при 37°C при встряхивании, разводили 1:100 стерильной парамагнитной питательной средой. В стерильный 5-мл шприц набирали 2 мл бактериальной взвеси и удаляли лишний воздух. Наконечник наполненного шприца нагревали и сплавляли. Шприц помещали в рабочую зону магнитного биопринтера. Сам биопринтер помещали в инкубатор при 37°C.

2.3. Характеристика бактериальных автоагрегатов

Для количественной характеристики неприкрепленных агрегатов, образованных бактериями, выращенными на магнитном биопринтере в парамагнитной питательной среде, использовались три метода. Сначала были определены макроскопические геометрические параметры левитирующих агрегатов по фотографиям, полученным через окно в магнитном биопринтере. Во-вторых, среду удаляли с помощью шприца, а агрегат суспендировали в PBS и энергично встряхивали в течение 30 с для разделения бактериальных клеток. Затем десятичные разведения суспензии высевали на LB-агар. Выросшие колонии подсчитывали через 24 ч. Разделение бактериальных клеток контролировали окрашиванием по Граму. Третий метод был основан на окрашивании амилоидных белков и целлюлозы

конго красным и позволял количественно определять матрикс, продуцируемый бактериями. К свежеприготовленному бульону LB добавляли сухой порошок конго красного (CR) до 100 мкг мл⁻¹. Затем раствор стерилизовали при 121°C в течение 20 мин, охлаждали до 45°C и хранили при этой температуре. Непосредственно перед использованием в бульон LB/CR добавляли 0,2 М гадобутрол для получения парамагнитной среды LB/CR. Ночную культуру *E. coli* разводили 1:100 парамагнитной красной средой LB/CR, помещали в магнитный биопринтер и инкубировали при 37°C. Агрегат и окружающую среду помещали в центрифужную пробирку объемом 15 мл и концентрировали бактериальные клетки центрифугированием при 4200 об/мин в течение 10 мин. Затем бактерии промывали 1,5 мл PBS и концентрировали центрифугированием, как описано выше. К осадку добавляли 1,5 мл 50% этанола и бактериальную суспензию тщательно перемешивали встряхиванием в течение 15 с. Затем бактерии удаляли центрифугированием. 300 мкл супернатанта переносили в лунки 96-луночного микропланшета, а концентрацию красителя определяли по оптической плотности раствора, измеренной при длине волны 450 нм с помощью планшетного ридера iMax (Bio-Rad).

2.4. Визуализация бактериальных автоагрегатов

Для фиксации бактерий, выращенных в магнитном биопринтере, непосредственно в образец добавляли глутаровый альдегид до концентрации 2,5%. После 2 ч инкубации при комнатной температуре образец переносили в центрифужную пробирку, агрегаты осаждали центрифугированием при 42 000 об/мин и трижды промывали PBS в течение 10 мин. Структуру агрегатов анализировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и сканирующей электронной микроскопии (КЛСМ и СЭМ соответственно). Клеточные нуклеоиды визуализировали с помощью SYBR green I. Компоненты матрикса биопленки визуализировали с помощью

красителя для матрицы биопленки FilmTracer SYPRO Ruby. Для получения изображений использовали конфокальный микроскоп Zeiss LSM 510Meta (Carl Zeiss, Германия) и объектив Plan-Apochromat 63/1.4 Oil DIC. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Zeiss LSM 510Meta версии 3.2. Для анализа агрегатов SEM образцы были подготовлены в соответствии со стандартной процедурой, используемой для биопленок, и покрыты напылением платиной толщиной 20 нм. Для получения изображений использовали Camscan S2 (Cambridge Instruments, Великобритания) с использованием сигналов вторичных электронов (SEI) с оптическим разрешением 10 нм и рабочим напряжением 20 кВ. Изображения получали с помощью программного обеспечения MicroCapture (SMA, Россия).

2.5. Определение чувствительности к антибиотикам

Чувствительность штамма *E. coli* ATCC 43890 определяли с помощью диско-диффузионного метода и метода определения минимальных ингибирующих концентраций.

Диско-диффузионный метод. Культуру бактерий, выращенную в течение 16-18 часов в жидком питательном бульоне, развели в PBS (фосфатно-солевой буфер) до оптической плотности 1.0 (OD₆₀₀), что соответствует примерно $1-2 \times 10^9$ КОЕ/мл. Затем суспензию развели в 100 раз (до $\approx 10^7$ КОЕ/мл), откуда 100 мкл ($\approx 10^6$ КОЕ/мл) нанесли равномерно на чашку Петри диаметром 9 см, с питательным агаром. После нанесения бактериальной культуры на чашку положили диски с тестируемыми веществами. Засеянные чашки инкубировали 24 часа. За это время бактерии выросли, формируя газон. Из-за диффузии вещества с диска вокруг диска сформировалась зона ингибирования роста, выглядящая как прозрачное пятно.

Метод определения минимальных ингибирующих концентраций. Культуру бактерий, выращенную в течение 16-18 часов в жидком питательном бульоне, разводят 1:100 в стерильном бульоне, в который был добавлен гентамицин в разных разведениях. Через 24 часа измеряют оптическую плотность выросшей культуры при длине волны 595 нм.

Исследование чувствительности в магнитном биопринтере. Для определения изменений антибиотикорезистентности, связанных с образованием неприкрепленных агрегатов добавляли концентрации гентамицина, которые в 12,8 раза превышали МИК. Через 24 часа жизнеспособные клетки подсчитывали путем посева на агар LB, как описано выше.

2.6. Оценка формирования биопленок

Для проверки способности бактерий образовывать связанные с поверхностью биопленки использовали стандартный анализ на 96-луночных планшетах. Ночную культуру *E. coli* разводили 1:100 в свежем бульоне LB и инкубировали в 96-луночной планшете в течение 48 часов. Затем лунки промывали PBS и окрашивали 0,1% раствором кристаллического фиолетового в течение 10 мин. Для оценки биомассы биопленки краситель смыли добавлением 95% этанола в каждую окрашенную лунку. Затем раствор переносили в плоскодонный 96-луночный планшет для измерения оптической плотности при длине волны 595 нм с помощью спектрофотометра iMark (Bio-Rad).

2.7. Оценка продукции белков курлей

Связывание конго красного (CR) использовали для выявления амилоидных белков, связанных с биопленками. CR добавляли в агар LB до

конечной концентрации 25 мкг/мл. Бактерии высевали с помощью бактериологической петли и инкубировали в течение 24 ч при 37°C.

2.8. Протеомный анализ

Реактивы Sigma-Aldridge (Сент-Луис, Миссури, США) использовали для подготовки проб. Фиксированные образцы центрифугировали при 20 000 g при 4°C в течение 20 мин. Супернатанты сбрасывали, осадки растворяли в 200 мкл лизирующего буфера с мочевиной (8 М мочевины/1% NP40) и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 30 мин, центрифугировали при 20000 g при 4°C в течение 20 мин. Собирали супернатанты мочевины. Осадок повторно экстрагировали с использованием лизирующего SDS-буфера (4% SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM DTT) и инкубировали в течение 20 мин при 100°C, 2 ч при 60°C, обрабатывали ультразвуком в течение 40 мин и снова центрифугировали при 20000 g при 4°C. Супернатанты мочевины и SDS объединяли, содержание белка определяли анализом BCA (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA). Белки разбавляли 8 М мочевиной/100 mM Трис-НСl, pH 8,0/100 mM ДТТ и упаривали в течение часа при 37°C. Пробоподготовку с помощью фильтров (FASP) проводили в соответствии с протоколом (Wishnevsky, 2016) с использованием фильтров Microcon 10 кДа (Millipore, Burlington, MA, USA). Йодоацетамид использовали для алкилирования. Трипсинолиз проводили с использованием Trypsin Gold (Promega Corporation Madison, WI, USA), который добавляли к белку в соотношении 1/50.

Полученную смесь пептидов анализировали методом жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрии на основе системы нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, США) и TimsTOF Pro (Bruker Daltonics, Billerica, MA, США) масс-спектрометр. Насадочную эмиттерную колонку (C18, 25 см 75 м 1,6 м) (Ion Optics, Parkville, Australia)

использовали для разделения пептидов при скорости потока 400 нл/мин с градиентом элюирования от 4% до 90% фазы В. в течение 120 мин. В результате подвижная фаза А состояла из 0,1% муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза Б состояла из 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием метода параллельного накопления-последовательной фрагментации (PASEF). Источник ионизации электрораспылением (ESI) работал при капиллярном напряжении 1500 В, смещении концевой пластины 500 В и 3,0 л/мин сухого газа при температуре 180°C. Измерения проводились в диапазоне m/z от 100 до 1700 Th. Диапазон подвижностей ионов включал значения от 0,60 до 1,60 В с/см² (1/k0). Общее время цикла было установлено на 1,16 с, количество сканирований PASEF MS/MS было установлено на 10. Для небольших количеств образцов общее время цикла было установлено на 1,88 с. Полученные данные ЖХ-МС/МС были проанализированы с использованием программ PEAKS Studio 8.5 и MaxQuant (версия 1.6.7.0) в соответствии со следующими параметрами: допустимая погрешность исходной массы 30 ppm; допустимая погрешность по массе фрагмента 0,01 Да; фермент-трипсин; пропущенные расщепления-2; фиксированные модификации - карбамидометил (C); переменные модификации-Окисление (M), Ацетилирование (N-термин). Поиск осуществлялся с использованием базы данных SwissProt. Порог частоты ложных обнаружений был установлен на 0,01.

2.9. Приготовление компетентных клеток

Компетентные клетки *E. coli* готовили следующим образом: ночную культуру разводили свежей средой 1:100 и культивировали до оптической плотности 0,6-1,0 при 37°C с шутелированием 200 об/мин. Далее культуру центрифугировали 15 мин при 4200 об/мин, супернатант сливали, отмывали дважды таким же объемом стерильной холодной бидистиллированной воды,

и снова центрифугировали. Полученный осадок клеток ресуспендировали в 10% глицерине, разливали по 50 мкл в стерильные микропробирки. Хранили в замороженном виде при -70°C .

2.10. Электропорация

Трансформацию компетентных клеток проводили методом электропорации на электропораторе «GenePulser Xcell Total System» фирмы «Bio-Rad» с электропорационной ячейкой «Shockpod» при следующих условиях: расстояние между электродами 2 мм, емкость 25 μF , напряжение 2,5 kV, сопротивление 200 Ω . Количество ДНК, используемое для трансформации 5-7 нг.

2.11. Полимеразная цепная реакция

Для постановки ПЦР приготавливали лизаты *E. coli* штамма ATCC 43890. Для этого к 45 мкл дистиллированной воды добавляли 5 мкл буфера для ПЦР (ООО «Бионем», Россия), в эту смесь вносили небольшое количество бактерий из одной колонии. Смесь кипятили 10 минут.

Реакционная смесь в объеме 25 мкл содержала: 16,7 мкл NFW (Nuclease-free Water), 2,5 мкл 10-буфера для амплификации, 1,5 мкл 0,025 MgCl_2 , 0,8 мкл 10 мМ dNTP, 0,5 мкл 2,5 Ед Dream-Taq polymerase, 1 мкл 15 пМ праймера BF1 (Forward), 1 мкл 15 пМ праймера BF2 (Reverse), 1 мкл ДНК. На смесь добавляли минеральное масло в объеме 40 мкл. ПЦР проводили в термоциклере Терцик (ДНК-технология, Россия) по программе, представленной в таблице 4.

Таблица 4. Условия проведения полимеразной цепной реакции.

Шаг	Функция	Температура	Длительность	Число циклов
Начальная денатурация	Денатурация	94 °С	4 мин	1
Аmplификация	Денатурация	94 °С	30 сек	30
	Отжиг	55 °С	30 сек	30
	Синтез	94 °С	2 мин	30
Завершающий синтез		72 °С	10 ин	1

2.12. Электрофорез в агарозном геле

Продукты амплификации выявляли методом гель-электрофореза, в 1 % агарозном геле, приготовленном на основе трис-ацетатного буфера, с добавлением бромистого этидия до 0,5 мкг/мл. Электрофорез проводили при напряжении 12В/см в течение 30 мин. Объем пробы составлял 5 мкл.

2.13. Лигирование

Для клонирования ПЦР-продукта в вектор рAL2-T инкубировали реакционную смесь 18 час при +4⁰С. Лигирование Т4ДНК лигазой (Fermentas, Литва). Состав реакции на 10мкл: ДНК-вектор 100нг, ДНК-вставка 20нг, 10-кратный буфер для Т4ДНК лигазы 1мкл, фермент 1-2ед. Инактивацию ферментов проводили прогреванием при 75°С 10 минут.

2.14. Рестрикция

Рестрикцию ДНК осуществляли эндонуклеазами EcoR1 и Pae1 (Fermentas, Литва). Для проведения реакции в объеме 40 мкл брали: 2 мкг

ДНК, 32 мкл деминерализованной воды свободной от нуклеаз (Sigma, США), 4 мкл 10-кратного буфера для обоих рестриктаз, ферменты 20ед. Инкубировали в течение ночи, при температуре +37°C. Инактивацию фермента проводили путем прогревания реакционной смеси при 75°C в течение 20 минут.

2.15. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК использовался набор diaGene, содержащий буферы R, L, N, W, E, микроколонки и 2 мл пробирки. Все манипуляции по выделению ДНК из культуры бактериальных клеток осуществлялись согласно инструкции производителя.

2.16. Выделение ДНК из агарозного геля

ДНК разделяли в 1,5% легкоплавком агарозном геле (Bio-Rad, USA). Электрофорез проводили при напряжении 10В/см в течение 45 минут. Фрагменты ДНК вырезали из геля и очищали с помощью набора Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Все манипуляции по выделению ДНК из геля осуществлялись согласно инструкции производителя. Подготовку проб к секвенированию проводили по рекомендации Центра коллективного пользования «ГЕНОМ» (<http://www.genome-centre.narod.ru/>). Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer. Поиск нуклеотидных последовательностей, гомологичных выявленным фрагментам ДНК, проводили с помощью BioEdit Sequence Alignment Editor.

2.17. Статистические методы

Результаты обработаны с использованием программного пакета Microsoft Excel 2007. Эксперименты выполнены не менее, чем в 3 повторах. рассчитывали среднее арифметическое, доверительные интервалы, стандартное отклонение. Статистическую значимость различий определяли по общепринятой методике с использованием t - критерия Стьюдента. Достоверность различий соответствовала $p < 0,05$.

Глава 3. Результаты исследований¹

3.1. Описание системы и принцип работы

В основе созданных нами экспериментальных условий лежит принцип магнитной левитации. Магнитная левитация – состояние, при котором сила гравитации, действующая на объект, уравновешивается магнитной силой, направленной в противоположном направлении, т.е. вверх. В состоянии магнитной левитации могут находиться только диамагнитные объекты. Для того, чтобы объект обладал диамагнитными свойствами, необходимо, чтобы значение его магнитной проницаемости было отрицательным. Магнитная проницаемость – величина, показывающая во сколько раз индукция магнитного поля в данном объекте отличается от индукции магнитного поля в вакууме, вычисляется по формуле $\mu = B/B_0$, где μ – магнитная проницаемость, B – индукция магнитного поля в объекте, B_0 – индукция магнитного поля в вакууме. Если магнитная проницаемость объекта незначительно больше нуля, то такой объект называется парамагнетиком. Если объект обладает магнитной проницаемостью значительно больше нуля, то такой объект называется ферромагнетиком. В случае с диамагнетиками момент силы направлен в направлении ослабления магнитного поля.

Вода и все биологические объекты являются диамагнетиками. В последнее годы системы, имеющие в своей основе принцип магнитной

¹ Результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора

1. **Domnin P.**, Arkhipova A., Petrov S., Sysolyatina E., Parfenov V., Karalkin P., Mukhachev A., Gusarov A., Moisenovich M., Khesuani Y., Ermolaeva S. An in vitro model of nonattached biofilm-like bacterial aggregates based on magnetic levitation //Applied and Environmental Microbiology. – 2020. – Vol. 86. – № 18. – e01074-20. DOI: doi.org/10.1128/AEM.01074-20 (WoS IF 4.792 Q 1; SJR IF 1.032 Q1)
2. **Domnin P.A.**, Parfenov V.A., Kononikhin A.S., Petrov S.V., Shevlyagina N.V., Arkhipova A.Y., Koudan E.V., Nezhurina E.K., Brzhozovskiy A.G., Bugrova A.E., Moysenovich A.M., Levin A.A., Karalkin P.A., Pereira F.D.A.S., Zhukhovitsky V.G., Lobakova E.S., Mironov V.A., Nikolaev E.N., Khesuani Y.D., Ermolaeva S.A. Combined impact of magnetic force and spaceflight conditions on Escherichia coli physiology //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – №. 3. – 1837. DOI: doi.org/10.3390/ijms23031837 (WoS IF 5.923 Q 1; SJR IF 1.15 Q1)
3. Ermolaeva S.A., Parfenov V.A., Karalkin P.A., Khesuani Y.D., **Domnin P.A.** Experimentally created magnetic force in microbiological space and on-Earth studies: perspectives and restrictions //Cells. – 2023. – Vol. 12. – №. 2. – 338. DOI: doi.org/10.3390/cells12020338 (WoS IF 6.6 Q 1; SJR IF 1.54 Q1)
4. **Домнин П.А.**, Захарченко А.Е., Реджепов Д.Т., Ермолаева С.А. Система для изучения механизмов флокуляции и автоагрегации бактерий, основанная на магнитной левитации //Тихоокеанский медицинский журнал. – 2023. – №. 1. – С. 38-43. (РИНЦ IF 0,563)

левитации, находят свое применение в экспериментальной биологии. В данной была использована система под названием магнитный биопринтер, разработанная 3d bioprinting solutions, Ltd. Магнитный биопринтер представляет собой пару постоянных неодимовых магнитов, приложенных вплотную друг к другу южными полюсами и зафиксированных с помощью металлического каркаса. В центре каждого из магнитов есть канал для размещения емкости со средой. За счет конфигурации магнитов внутри объема среды, помещенной в устройство, формируется воронкообразный градиент магнитного поля. В точке минимального градиента магнитного поля – магнитной ловушке – происходит скопление диамагнитных объектов. Т.к. в биопринтере используются постоянные магниты, то, как уже было упомянуто в обзоре литературы, их магнитной индукции недостаточно, чтобы удерживать клетки в состоянии магнитной левитации. Поэтому в питательную среду добавлялся гадобутрол – вещество, обладающее парамагнитными свойствами. Также сбоку с противоположных сторон имеются круглые окошки для наблюдения за ходом эксперимента и визуального контроля при совершении манипуляций с культурой в биопринтере (рис. 3).

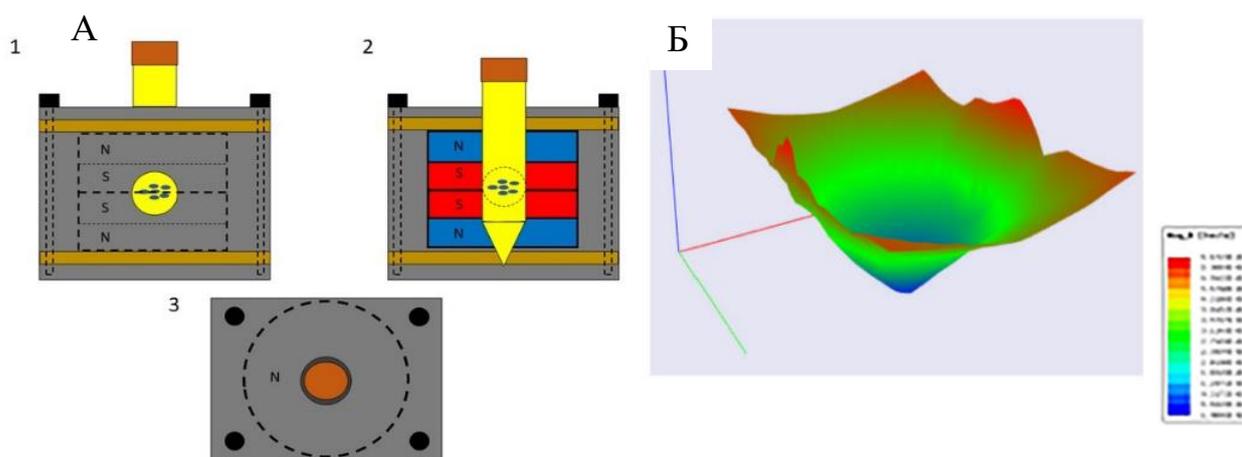


Рис. 3. Схема магнитного биопринтера. А – общий вид биопринтера (1 – вид сбоку, 2 – вид в продольном разрезе, 3 – вид сверху), Б – график, демонстрирующий градиент магнитного поля в среде.

Для отработки методики работы с биопринтером был поставлен ряд пробных экспериментов. Чтобы оценить наличие возможного токсического эффекта гадобутрола на бактерии, разведенную в 100 раз из ночной культуру энтерогеморрагического штамма *E. coli* ATCC 43890 инкубировали со встряхиванием в среде LB с добавлением 0,2 М гадобутрола в течение 24 ч при 37⁰С, после инкубации произвели высевы из серийных разведений полученной культуры с последующим подсчетом КОЕ. В качестве отрицательного контроля использовали культуру этого же штамма в среде с добавлением стерильного фосфатного буфера в соотношении 1:4 вместо гадобутрола. В среде с гадобутролом выросло приблизительно в 4,4 раза меньше бактерий, чем в контроле ($1,12 \times 10^8$ КОЕ/мл против $4,92 \times 10^8$ КОЕ/мл соответственно). Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что несмотря на небольшое снижение плотности ночной культуры, бактерии могут эффективно размножаться в присутствии 0,2 М гадобутрола.

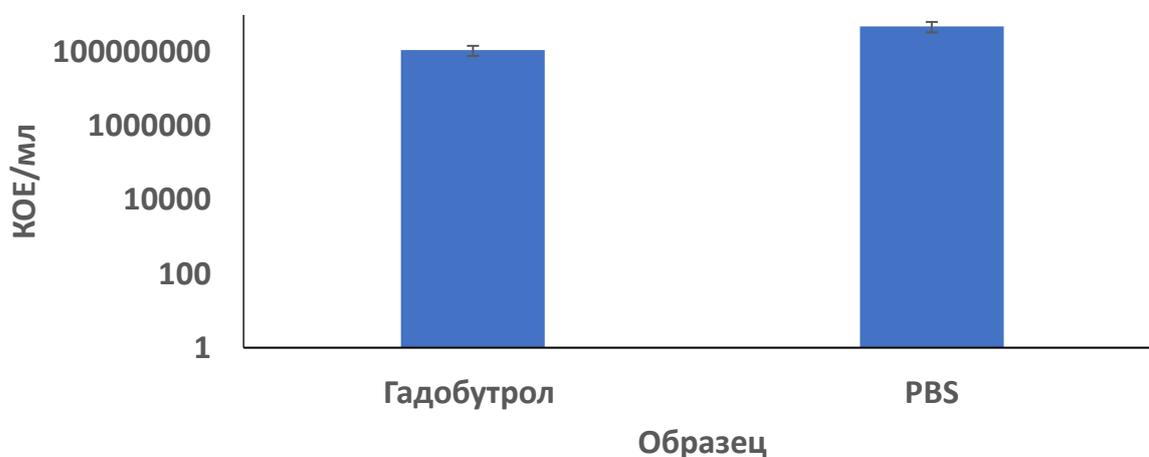


Рис. 4. Влияние гадобутрола на рост культуры *E. coli* ATCC 43890. подсчет КОЕ из стационарной культуры с гадобутролом.

Далее было определено влияние магнитного поля на бактериальную культуру в среде с гадобутролом. Стационарную культуру штамма *E. coli* ATCC 43890, выращенную аналогично предыдущим экспериментам, поместили в магнитный биопринтер и наблюдали за изменениями в культуре в течение 24 ч. Спустя 2 ч наблюдений началось перемещение бактерий в

направлении центра объема среды, периферическая часть при этом становилась прозрачной. Концентрация бактерий продолжилась, и спустя 24 ч в районе магнитной ловушки сформировался плотный бактериальный агрегат диаметром 4 мм и высотой 10 мм. В следующем эксперименте мы снизили концентрацию гадобутрола до 0,1 М. В данных условиях бактерии сформировали аналогичный агрегат несколько большего диаметра (8 мм) и смещенный несколько ближе ко дну емкости со средой (рис. 5).

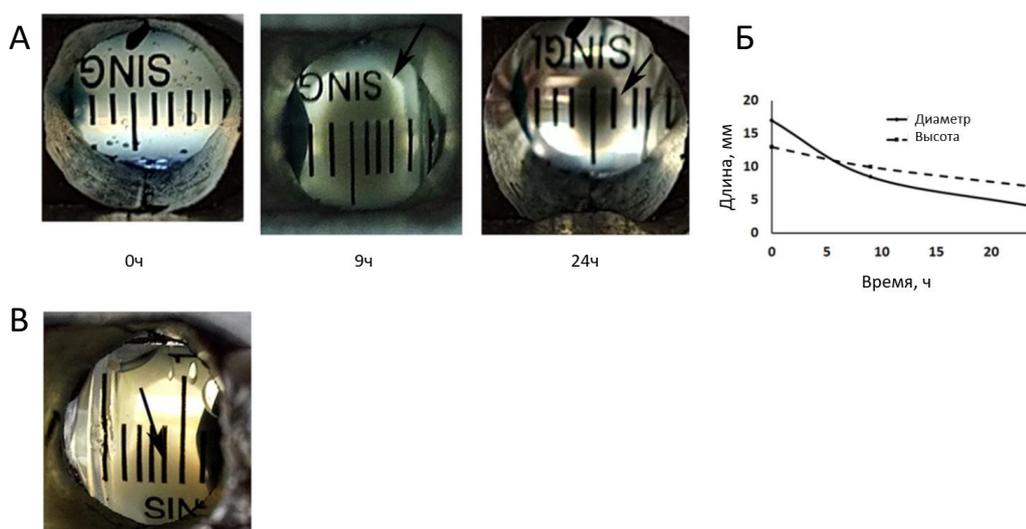


Рис. 5. Влияние магнитного поля в биопринтере на культуру *E. coli* ATCC 43890. А – среда с 0,2 М гадобутрола, Б – Динамика концентрации бактерий, В – среда с 0,1 М гадобутрола.

Далее был изучен рост бактерий в условиях магнитной левитации. Стационарную культуру штамма *E. coli* ATCC 43890 развели в 100 раз свежей средой LB с 0,2 М гадобутрола, поместили в магнитный биопринтер и инкубировали при 37⁰С в течение 24ч. После инкубации в магнитной ловушке наблюдался бактериальный агрегат, аналогичный тем, что получились по итогам предыдущих 2 экспериментов, но меньших размеров (рис. б). В повторном эксперименте с использованием концентрации гадобутрола 0,1 М бактериальный агрегат упал на дно емкости под действием собственной тяжести. На основании этих результатов в последующей работе мы использовали концентрации гадобутрола 0,2 М и время инкубации не менее 24ч.

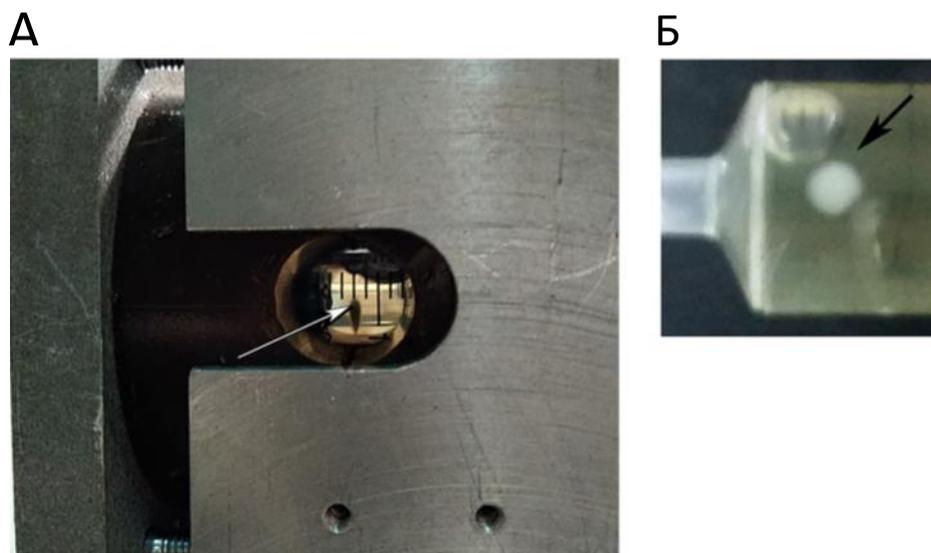


Рис. 6. Бактериальный агрегат, сформированный *E. coli* ATCC 43890 при росте в магнитном биопринтере. А – среда с 0,2 М гадобутрола, Б – среда с 0,1 М гадобутрола.

3.2. Поведение грамотрицательных и грамположительных бактерий, помещенных в магнитный биопринтер

Далее мы сравнили 4 штамма патогенных бактерий: грамположительные *S. aureus* штамм ATCC 25923 и *L. monocytogenes* штамм EGDe, грамотрицательные *P. aeruginosa* штамм 2943 и использованный ранее *E. coli* штамм ATCC 43890. *S. aureus* и *L. monocytogenes* выращивали в среде ВНИ, *E. coli* и *P. aeruginosa* выращивали в среде LB. Обе среды были дополнены 0,2 М гадобутролом. Спустя 24 часа все протестированные штаммы сформировали агрегаты в магнитном биопринтере. (рис. 7)

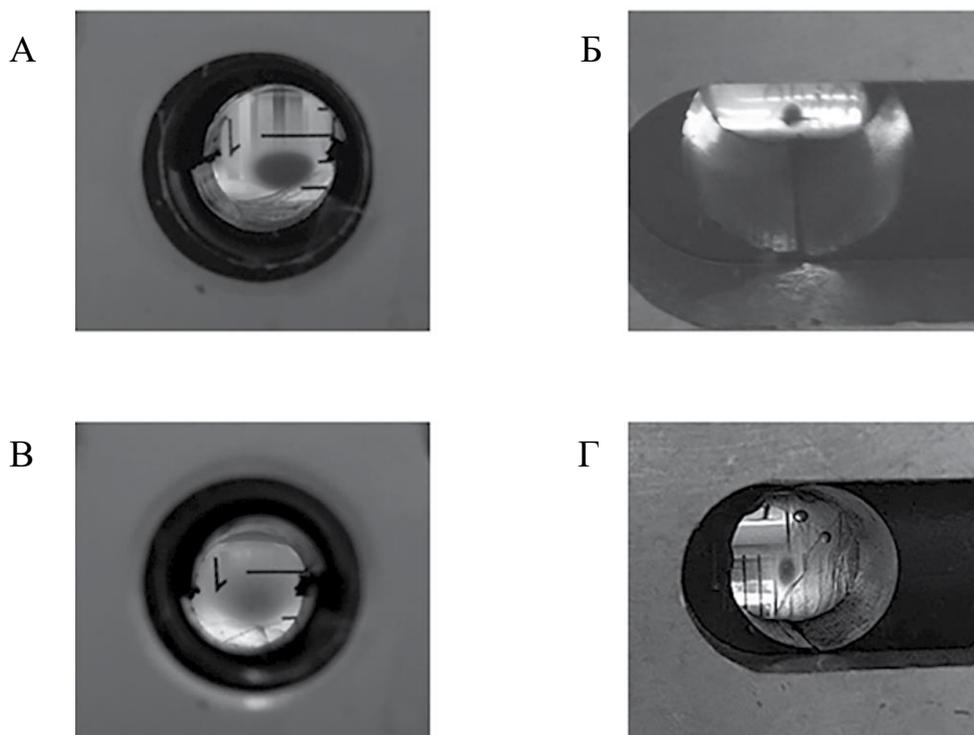


Рис. 7. Агрегаты, сформированные патогенными бактериями через 72 часа после начала эксперимента. А – *S. aureus*, Б – *L. monocytogenes*, В – *P. aeruginosa*, Г – *E. coli*.

Продолжение инкубации в течение дополнительных 48 часов не изменило внешний вид агрегатов. Для того чтобы проанализировать жизнеспособность бактерий в агрегатах, проводили окраску агрегатов дифференциальным красителем BacLight™ LIVE/DEAD™ Biofilm Viability Kit (рис. 8А) и последующую микроскопию с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопии (КЛСМ). Окраска дифференциальным красителем показала, что процент живых бактерий в агрегатах составлял от 82 для *E. coli* до 99% для *L. monocytogenes* (рис. 8Б).

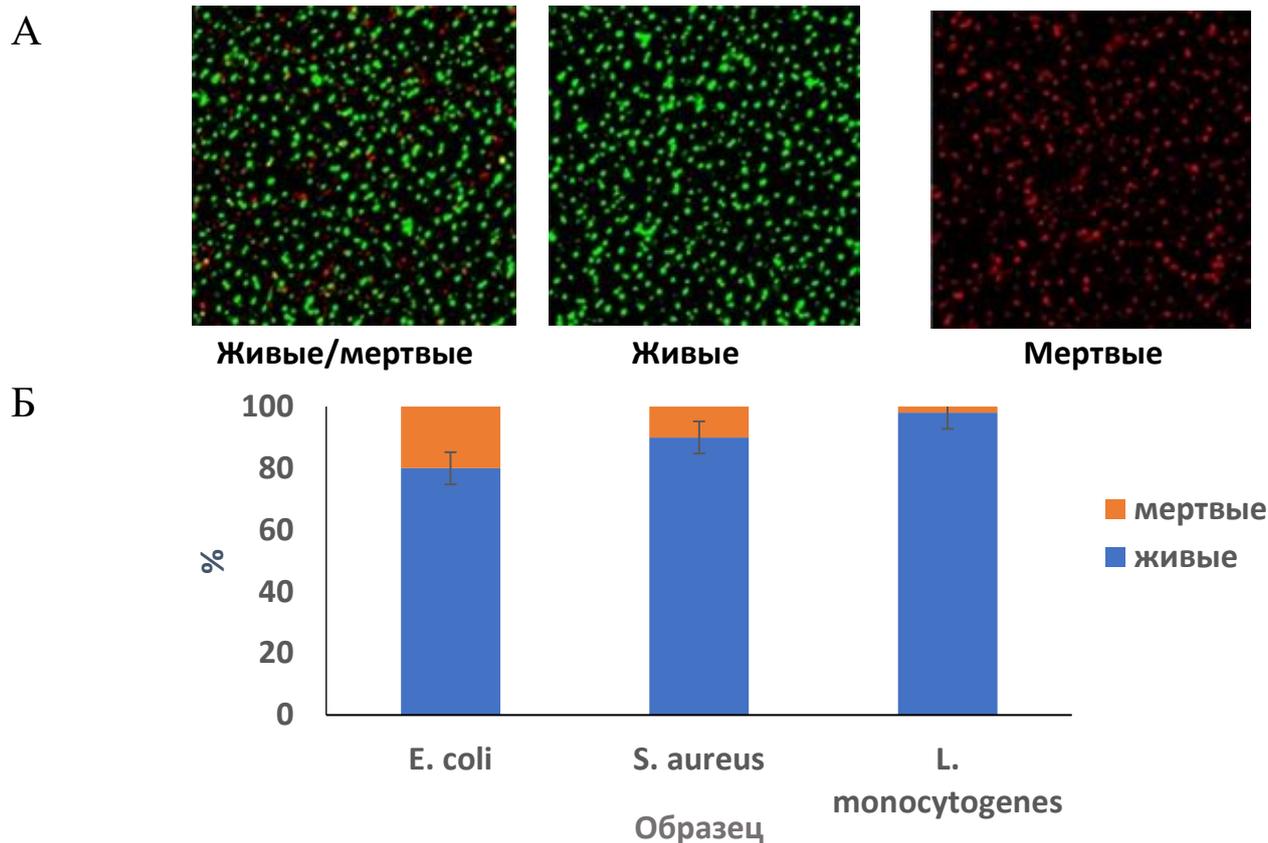
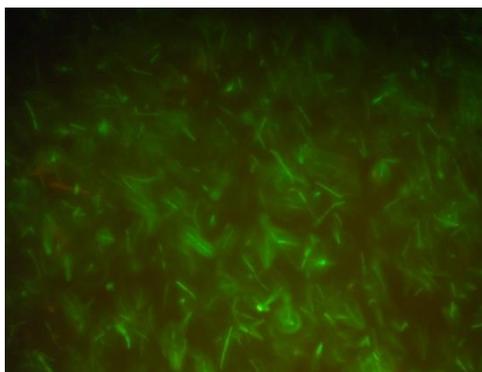


Рис. 8. Относительное количество живых и мертвых бактерий в агрегате через 72 часа после начала эксперимента. А – окраска агрегата, сформированного *E. coli*, красителем Live/Dead, Б – соотношение живых и мертвых клеток в агрегате для разных видов бактерий

Во время определения соотношения живых/мертвых клеток в агрегате, были обнаружены аномально длинные клетки *L. monocytogenes*. Была сформулирована гипотеза, что это было связано с добавлением гадобутрола в среду. Чтобы это проверить мы провели ряд экспериментов с различными условиями: наличие/отсутствие магнитного поля, гадобутрола, шутелирования, комнатная температура/температура 37°C. Гипотеза подтвердилась, и во всех образцах с добавлением гадобутрола независимо от других условий были обнаружены аномальные клетки. Данный эффект не наблюдался при работе с другими видами бактерий (рис. 9).

А



Б

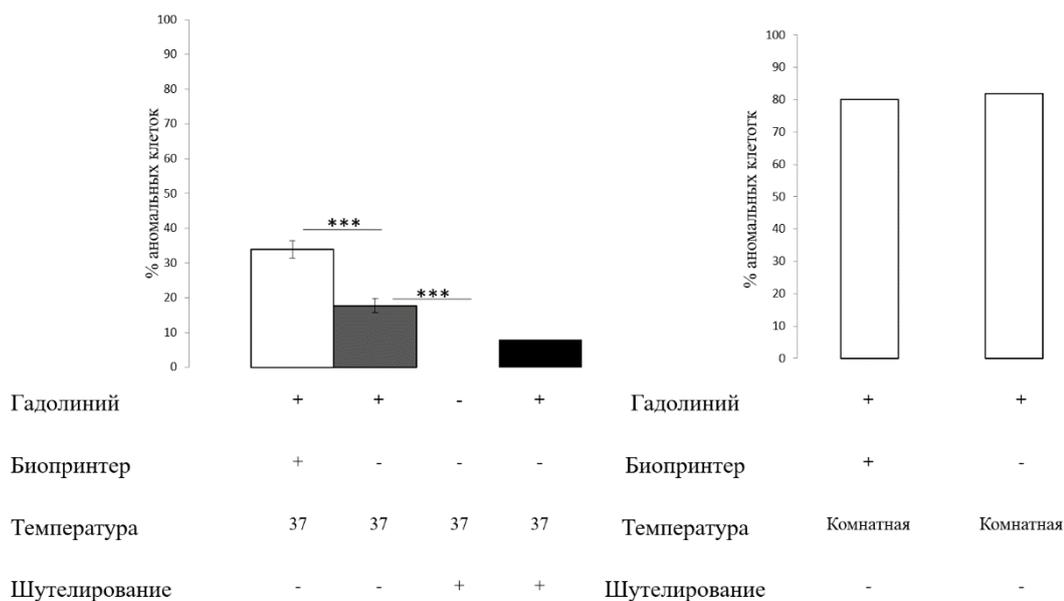


Рис. 9. Влияние гадобутрола на морфологию *L. monocytogenes*. А – образец агрегата *L. monocytogenes* из магнитного биопринтера, изученный с помощью эпифлуоресцентной микроскопии, Б – соотношение нормальных и аномальных клеток в разных экспериментальных условиях

Далее была определена численность бактериальных клеток в агрегате и возможность наличия бактерий в окружающей агрегат среде. Для этого были забраны автоматическим дозатором бактерии из магнитной ловушки и периферического объема среды и произведены высевы из серийных разведений полученных образцов после 24ч и 72 ч для *S. aureus* и после 24ч и 144ч для *E. coli*. Обнаружилось, что прозрачная часть среды не стерильна и в ней находилось приблизительно $3,4 \times 10^5$ КОЕ/мл после 24 ч инкубации и $3,1 \times 10^7$ КОЕ/мл после 72ч инкубации для *S.aureus* (0,3% и 18% от общего числа бактерий в культуре соответственно), $1,4 \times 10^6$ КОЕ/мл после 24ч

инкубации и $1,6 \times 10^7$ КОЕ/мл после 144ч инкубации для *E. coli* (4,5% и 10% от общего числа бактерий в культуре соответственно). В самой же магнитной ловушке было приблизительно $9,7 \times 10^7$ КОЕ/мл после 24ч инкубации и $1,4 \times 10^8$ КОЕ/мл после 72ч инкубации для *S. aureus*, $2,9 \times 10^7$ после 24ч инкубации и $1,4 \times 10^8$ КОЕ/мл после 144ч инкубации для *E. coli*. (рис. 10)

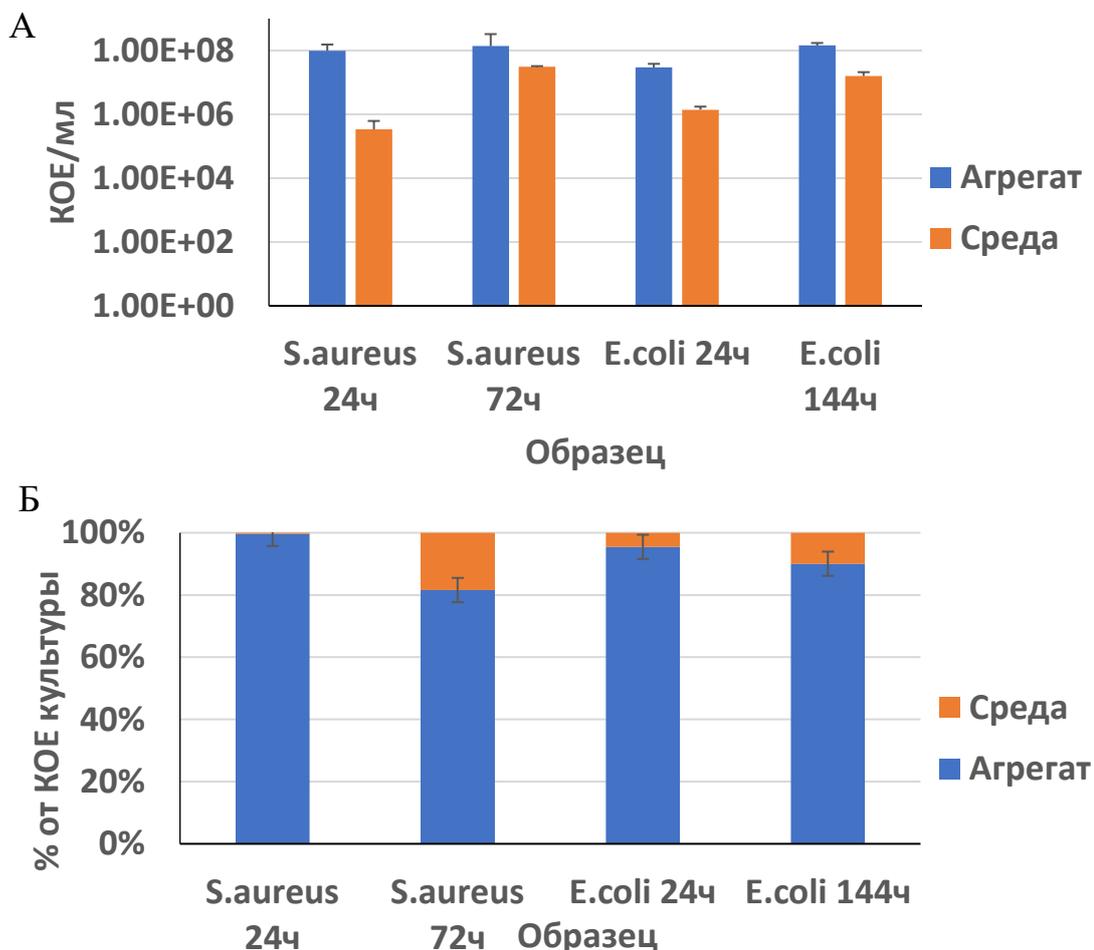


Рис. 10. Результаты подсчета КОЕ в культурах, выросших в магнитном биопринтере. А – число клеток в культуре в биопринтере, Б – соотношение клеток в магнитной ловушке и в среде

3.3. Анализ морфологии автоагрегатов *E. coli* с помощью КЛСМ и СЭМ

Т.к. бактериальные автоагрегаты, ровно как и биопленки, обычно исследуются с помощью КЛСМ и СЭМ, эти методы были использованы в

данной работе. Подготовка и окрашивание образцов описаны в главе «Материалы и методы». Исследование содержимого магнитной ловушки культуры *E. coli* ATCC 43890 с помощью КЛСМ выявило наличие бактериальных агрегатов в большом количестве, состоящих из бактериальных клеток (окрашены зеленым флуоресцентным красителем SYTO9) и внеклеточного матрикса (окрашены красным флуоресцентным красителем FilmTracer™ SYPRO® Ruby). Исследование с помощью СЭМ также выявило бактериальные клетки, погруженные во внеклеточный матрикс. Таким образом, содержимое магнитной ловушки представляет собой не столько единый автоагрегат, сколько скопление множества мелких бактериальных автоагрегатов, образовавшихся в большом количестве в магнитной ловушке без наличия какой-либо подложки за счет сближения бактериальных клеток под действием магнитного поля. (рис. 11).

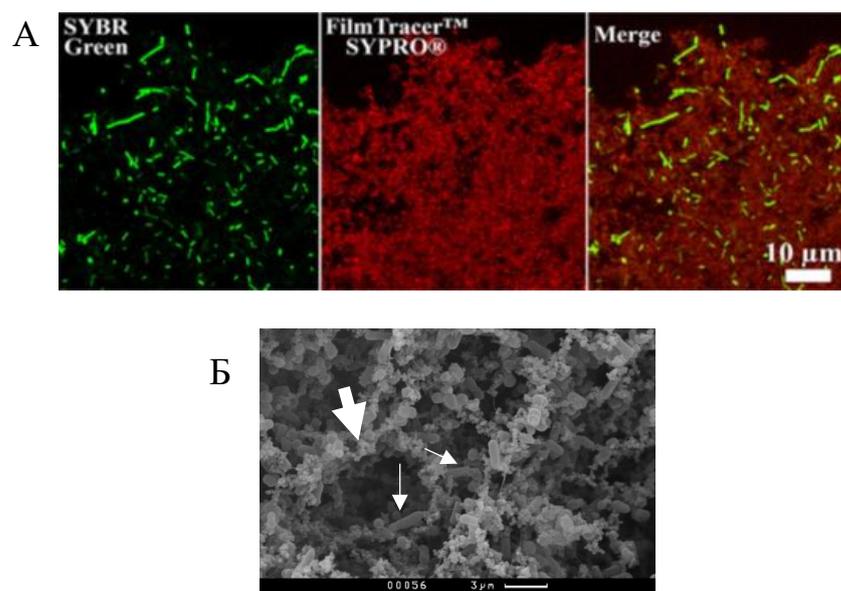


Рис. 11. Визуализация бактериальных автоагрегатов с помощью КЛСМ (А) и СЭМ (Б). Большой стрелкой обозначены тяжи внеклеточного полимерного матрикса, маленькой – бактериальные клетки.

3.4. Сравнительная характеристика автоагрегации и формирования биопленок патогенными и непатогенными штаммами *E. coli*

Проведено сравнение способности формировать биопленки и параметров автоагрегации в магнитном биопринтере для трёх штаммов *E. coli*: вирулентного штамма АТСС 43890 (серовар O157:H7), пробиотического штамма М17 и лабораторного штамма JM109 (производный K12). Все указанные штаммы были охарактеризованы по следующим признакам: соотношение числа КОЕ в агрегате и в среде, число КОЕ бактерий на 1 мм³ агрегата, формирование биопленок в лунках полистиролового планшета, а также оценка автоагрегации с помощью седиментационного теста.

Все штаммы бактерий сформировали агрегаты, однако их геометрические параметры заметно различались: самый крупный агрегат сформировал штамм JM109 (объем 283 мм³), агрегаты двух других штаммов были значительно меньше – 36 мм³ для АТСС 43890 и 42,5 мм³ для М17 (рис. 12А).

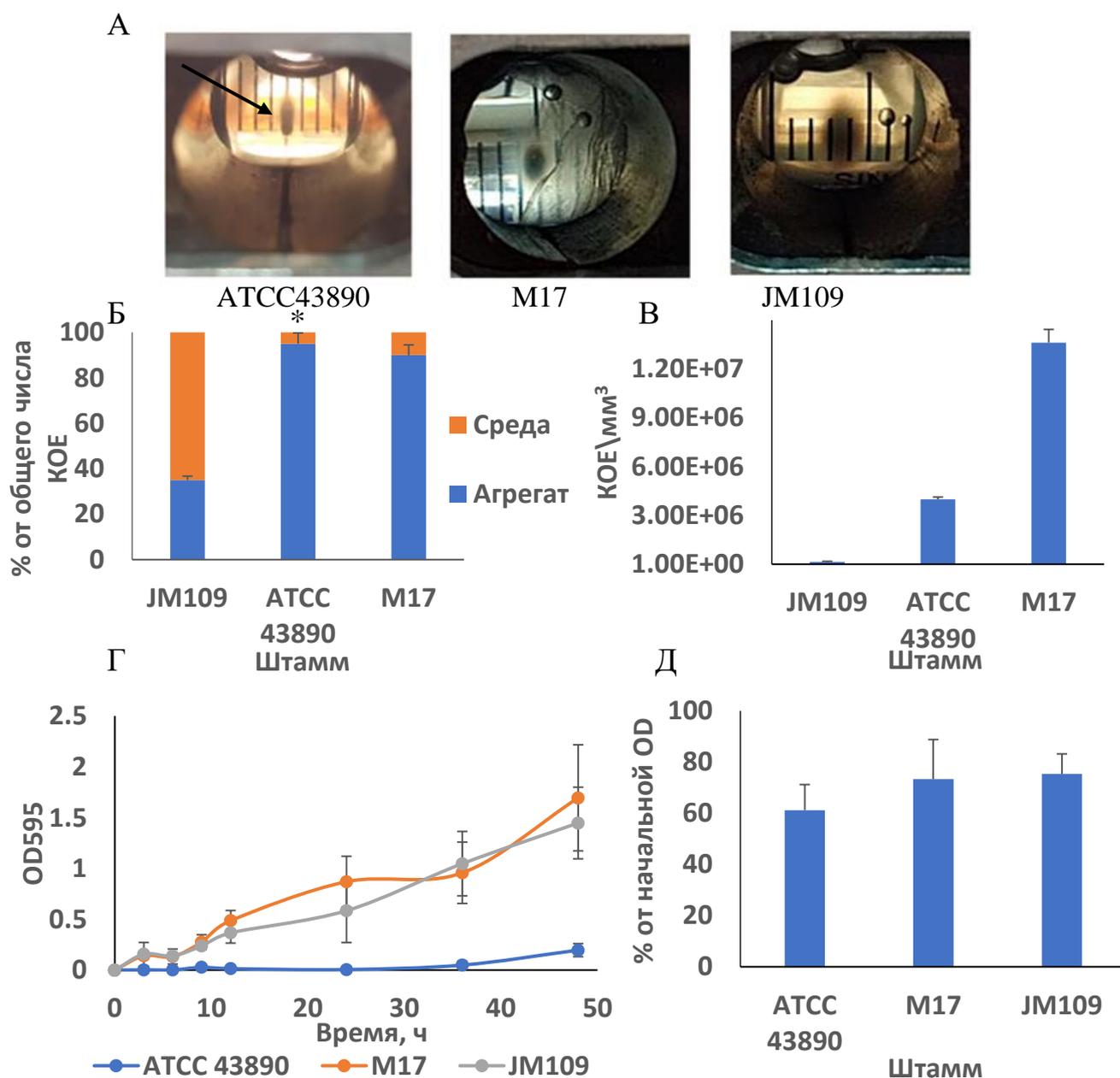


Рис. 12. Сравнительная характеристика эффективности автоагрегации и формирования биопленок штаммами *E. coli*. А – внешний вид агрегатов, Б – соотношение КОЕ агрегат/среда (* – $p < 0,05$), В – плотность КОЕ на 1 мм³ агрегата, Г – динамика формирования биопленок, Д – оценка автоагрегации с помощью седиментационного теста.

При подсчете числа клеток в агрегате и окружающей агрегат среде у штамма JM109 было больше всего свободноплавающих клеток в среде – 60% от общего числа клеток в культуре ($p < 0,05$), у штаммов ATCC 43890 и M17 наоборот, большинство клеток находилось в агрегате, а в среде было всего

лишь 5% и 10% от общего числа клеток в культуре, соответственно (Рис. 12Б).

Исходя из полученных данных была рассчитана плотность бактериальных клеток на единицу объема агрегата – $1,3 \times 10^5$ КОЕ/мм³, $4,0 \times 10^6$ КОЕ/мм³, $1,4 \times 10^7$ КОЕ/мм³ для JM109, ATCC 43890 и M17, соответственно (рис. 12В).

Для исследования способности к формированию биопленок был использован стандартный метод окраски биопленок, выросших в 96-луночном круглодонном планшете, кристалвиолетом [239]. Штаммы JM109 и M17 сформировали примерно одинаковые по толщине биопленки в течение 48 ч, в отличие от штамма ATCC 43890, который не способен формировать биопленки *in vitro*, что характерно для штаммов *E. coli* серотипа O157:H7 (рис. 12Г).

Способность бактерий к автоагрегации была дополнительно исследована с помощью стандартного метода, а именно седиментационного теста [119]. Полученные результаты сравнивали с результатами экспериментов с биопринтером. По итогам проведенных экспериментов значения оптической плотности для штаммов JM109 и M17 практически не отличались, а значения оптической плотности штамма ATCC 43890 отличались приблизительно на 10% от остальных штаммов ($p > 0,05$) (рис. 12Д).

Одним из ключевых факторов, определяющих как способность к формированию биопленок, так и способность к автоагрегации, является способность к формированию внеклеточного матрикса – сложной полимерной субстанции, состоящей преимущественно из экзополисахаридов, белков и внеклеточной ДНК. При исследовании *E. coli* и ряда других грамотрицательных бактерий на предмет продукции внеклеточного матрикса часто пользуются стандартным методом определения связывания красителя

конго красного, связывающегося с курлями – амилоидоподобными белковыми структурами, находящимися на поверхности бактерий и входящими в структуру внеклеточного матрикса, в том числе, при выращивании *E. coli* на агаре [240]. Установлено, что штамм ATCC 43890 в этих условиях сформировал белые колонии, что означало отсутствие продукции курлей, что характерно для штаммов серотипа O157:H7, а штаммы M17 и JM109 сформировали красные колонии, что означало наличие курлей в составе колоний этих штаммов (Рис. 13А).

Наличие белков курлей в автоагрегатах было оценено с помощью модифицированного метода определения курлей с помощью конго красного: краситель добавили не в агар, а жидкую среду LB с гадобутролом, и выращивали в этой среде исследуемые штаммы в магнитном биопринтере. После инкубации бактерий в течение 144ч связавшийся с агрегатом краситель был смыт 50% спиртом и по оптической плотности полученного раствора делался вывод о наличии матрикса в агрегатах и его количестве. Результаты в магнитном биопринтере оказались диаметрально противоположными тем, что были в эксперименте на агаре: штамм ATCC 43890 связал приблизительно в 2 раза больше красителя, чем штамм JM109 (Рис. 13Б).

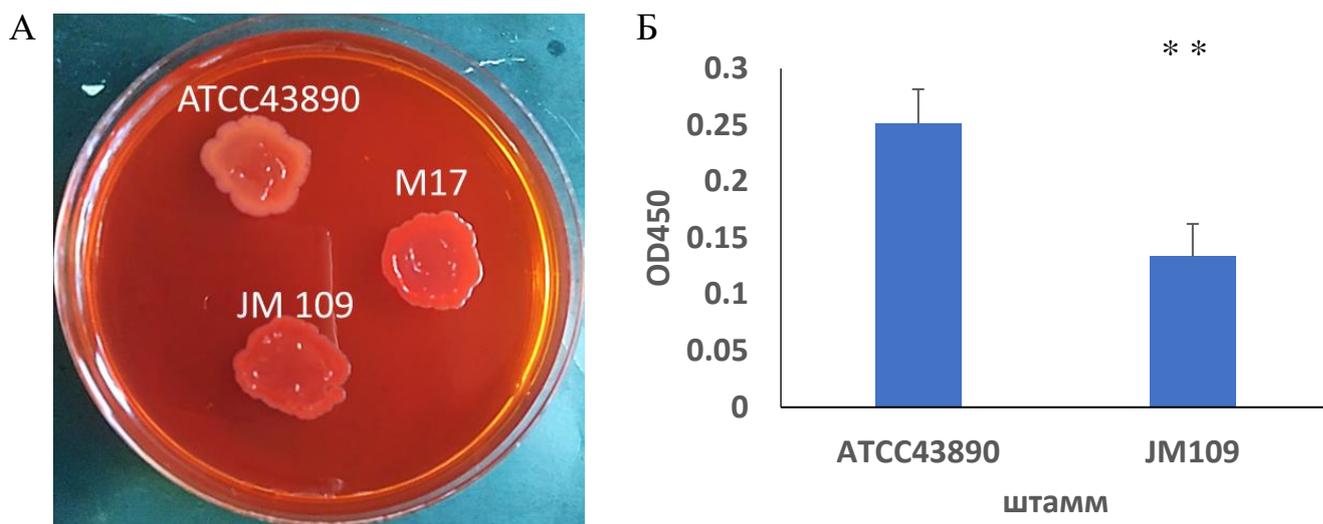


Рис. 13. Продукция курлей штаммами *E. coli*. А – оценка продукции курлей на агаре с конго красным, Б – связывание конго красного агрегатами в магнитном биопринтере (** – $p < 0,005$)

На основании этих результатов была сформулирована гипотеза, что способность формировать биопленки и автоагрегаты не всегда коррелируют и что, возможно, механизмы формирования биопленок и автоагрегации различаются.

3.5. Исследование устойчивости бактерий в биопринтере к антибиотикам

Была изучена устойчивость бактерий в агрегате к антибиотикам, т.к. устойчивость к антимикробным препаратам является одним их характерных свойств бактерий, погруженных во внеклеточный матрикс. Для начала была охарактеризована чувствительность к антибиотикам штамма *E. coli* ATCC 43890 диско-диффузионным методом и методом определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в бульонной культуре.

Для определения устойчивости к антибиотикам диско-диффузионным методом стационарная культура *E. coli* ATCC 43890 была посеяна газоном на чашки Петри с LB агаром. Сразу же после посева на поверхность агара были положены бумажные диски, пропитанные антибиотиками. После 24ч

инкубации при температуре 37⁰С оценивалось наличие или отсутствие зоны ингибирования роста. В нашем эксперименте зона ингибирования роста наблюдалась вокруг дисков со всеми использованными антибиотиками, а именно ампициллином, ампициллином/сульбактамом, амоксициллином/клавуланатом, цефураксимом, цефиксимом, цефтибутеном, цефепимом, имипинемом, гентамицином, амикацином, ципрофлоксацином, офлоксацином, норфлоксацином, левофлоксацином, триметопримом/сульфаметоксазолом, фурадонином, цефотаксимом, цефтриаксоном, цефтазидимом, тикарциллином/клавуланатом. (рис. 14)

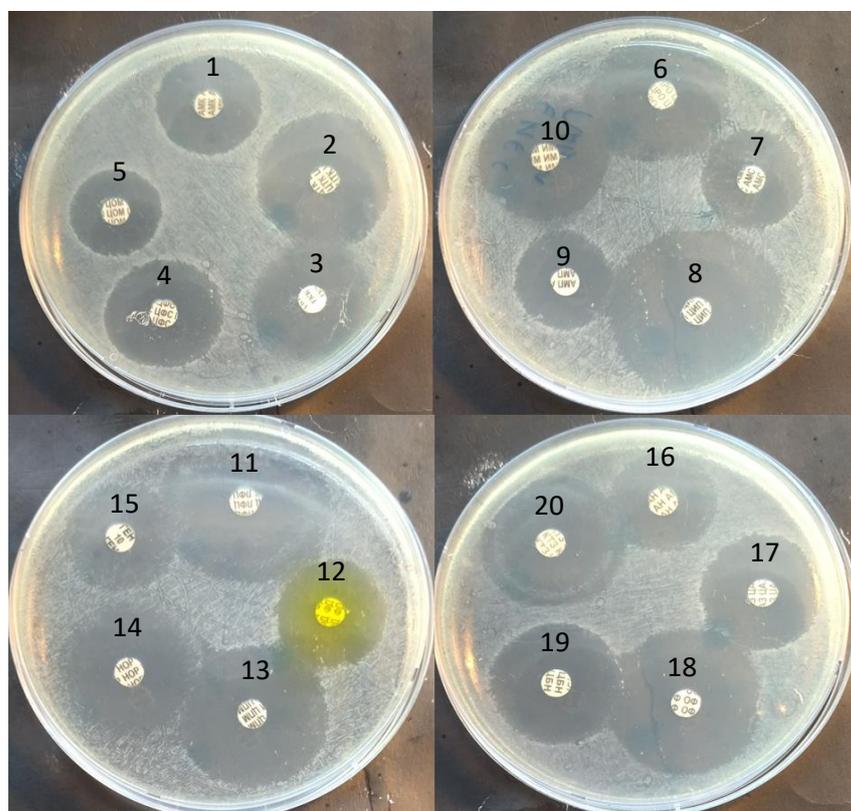


Рис. 14. Определение чувствительности к антибиотикам *E. coli* ATCC 43890 диско-диффузионным методом. 1 – амоксициллин/клавуланат, 2 – цефотаксим, 3 – тикарциллин/клавуланат, 4 – цефиксим, 5 – цефуроксим, 6 – цефтриаксон, 7 – ампициллин/сульбактам, 8 – ципрофлоксацин, 9 – ампициллин, 10 – имипенем, 11 – левофлоксацин, 12 – фурадонин, 13 – цефепим, 14 – норфлоксацин, 15 – гентамицин, 16 – амикацин, 17 – цефтазидим, 18 – офлоксацин, 19 – цефтибутен, 20 – ко-тримоксазол

Далее была определена минимальная ингибирующая концентрация гентамицина в бульонной культуре. Для этого стационарная культура *E. coli* ATCC 43890 была разведена в 100 свежей средой, после чего в пробирки с культурами добавили среду с разведенным в ней антибиотиком. Конечные концентрации составили 100 мкг/мл, 50 мкг/мл, 25 мкг/мл, 12,5 мкг/мл, 6,25 мкг/мл, 3,125 мкг/мл, 1,56 мкг/мл, 0,78 мкг/мл. Концентрация считалась ингибирующей, если в пробирке отсутствовал рост бактерий в сравнении в отрицательным контролем (культура без антибиотика), что определялось по оптической плотности при длине волны 595 нм. По итогам эксперимента минимальная ингибирующая концентрация гентамицина для *E. coli* ATCC 43890 составила 6,25 мкг/мл. (рис.15).

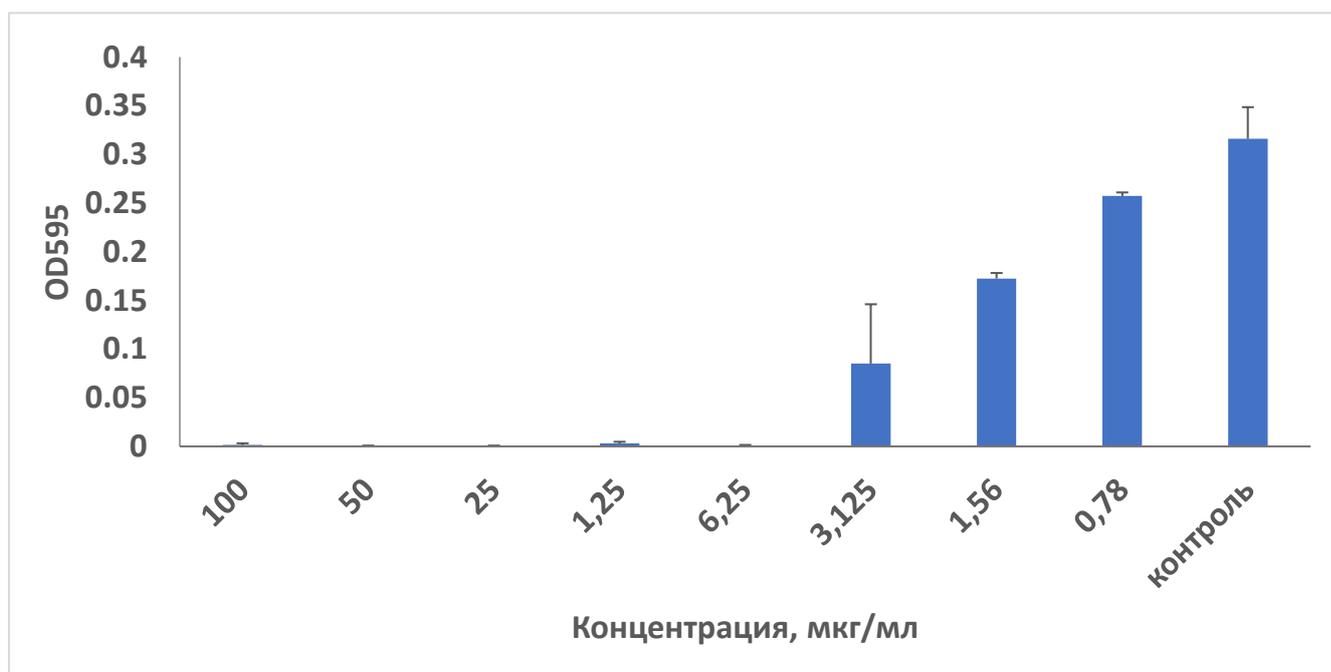


Рис. 15. Определение МИК гентамицина для *E. coli* ATCC 43890.

После характеристики штамма была определена чувствительность бактерий к гентамицину в магнитном биопринтере. Разведенная в 100 раз средой LB с гадобутролом культура *E. coli* ATCC 43890 была помещена в биопринтер и проинкубирована в течение 144ч при температуре 37⁰С. После инкубации в культуру был добавлен гентамицин в конечной концентрации 80 мкг/мл без извлечения емкости с культурой из биопринтера. После экспозиции антибиотиком в течение 24ч были произведены высевы из

серийных разведений агрегата. В качестве отрицательного контроля использовался агрегат, выросший в после 168 ч инкубации. Устойчивость культуры в агрегате определялась как процентное соотношение КОЕ в опытном образце после экспозиции гентамицином и контрольного образца. По итогам эксперимента добавление к выросшим агрегатам *E. coli* ATCC 43890 гентамицина в концентрации 80 мкг/мл (что в 12,8 раз выше МИК для планктонной культуры этого штамма) привело к 5-кратному снижению числа живых клеток после 24 ч часов экспозиции. (рис. 16). Таким образом, бактерии, находящиеся внутри агрегата, устойчивы к действию гентамицина в концентрации в 12,8 раза выше МИК.

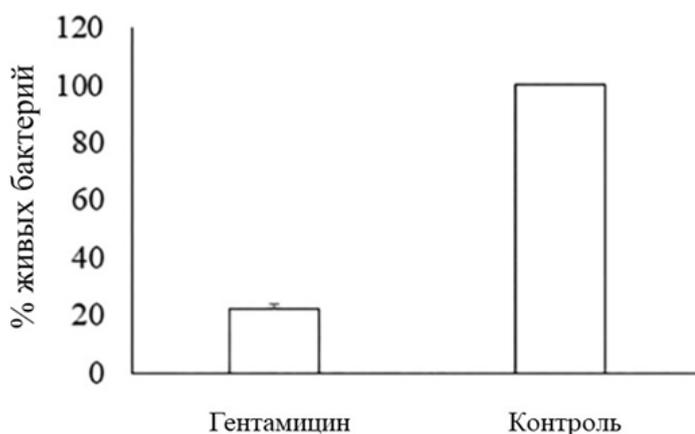


Рис. 16. Процент выживших клеток в магнитном биопринтере после экспозиции гентамицином.

3.6. Влияние генетических факторов на способность бактерий к автоагрегации

Данная система может быть использована для анализа генетических детерминант бактериальной автоагрегации. Штамм ATCC 43890, способный к автоагрегации, но не формирующий биопленки, был выбран как модель для изучения генетических детерминант автоагрегации. В частности, нас интересовало как увеличение продукции курлей может повлиять на

эффективность автоагрегации. Для этого был отобран продуцирующий курли мутант. С целью получения такого мутанта разведения стационарной культуры высевали на питательный агар LB с добавлением конго красного, и отбирали красные колонии среди белых колоний родительского штамма, не продуцирующего курли. Красные колонии отбирались с частотой 2 на 1000 белых колоний. По итогам первого посева были отобраны 16 красных клонов. Каждый из них был пересеян по 2 раза на агар с конго красным для того, чтобы отделить мутантные клоны от клонов, у которых изменение цвета было обусловлено изменением фенотипа. После 2 пересевов красный цвет сохранили 4 из 16 клонов, им были даны названия Cpm1, Cpm2, Cpm3, Cpm4 (Cpm – curli producing mutant). Все 4 мутантных клон были заморожены при -80°C в жидкой среде LB с добавлением 20% глицерина. Для дальнейшей работы был выбран клон Cpm1 (далее – Cpm). Перед исследованием в магнитном биопринтере было проведено сравнение штамма Cpm с штаммом дикого типа по способности формировать биопленки на пластике в лунках 96-луночных планшетов. Различий между штаммами не было обнаружено. Таким образом, изменения, обусловленные мутацией, которые были получены в дальнейших экспериментах в магнитном биопринтере, будут относиться только к автоагрегации независимо от способности к формированию биопленок.

Увеличенная продукция курлей на агаре сопровождалась существенным увеличением доли бактерий в агрегате относительно свободноплавающих бактерий в биопринтере. Если у штамма дикого типа количество бактерий в агрегате составляло около 90%, то у мутанта в агрегате находилось около 99% бактерий. Таким образом, полученные данные указывают, что увеличение производства курлей увеличивает эффективность формирования автоагрегатов (рис. 17).

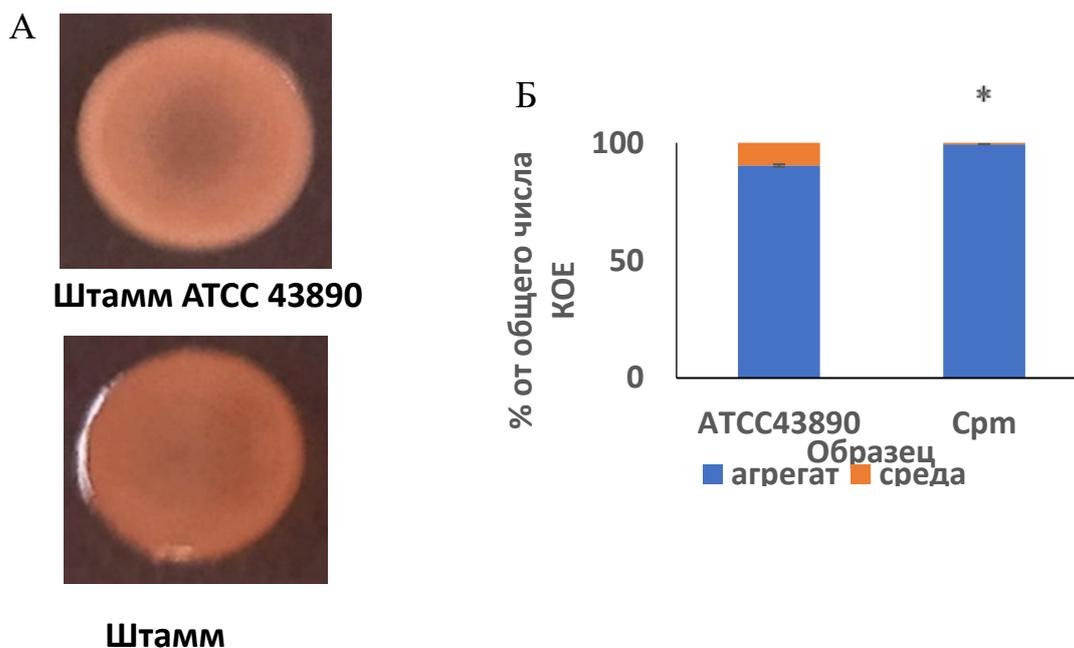


Рис. 17. Сравнение фенотипа дикого штамма *E. coli* ATCC 43890 и мутантного штамма Cpm. А – связывание конго красного на агаре, Б – соотношение КОЕ в агрегате и в среде при росте в биопринтере (* – $p < 0,05$)

3.7. Картирование мутации штамма Cpm

Для дальнейшего изучения полученного мутанта было проведено картирование полученной мутации в бактериальной хромосоме. Для картирования были отобраны гены, кодирующие белки, регулирующие экспрессию гена *csgD*. Ген *CsgD* у *E. coli* является ключевым регулятором продукции внеклеточного матрикса, в том числе белков курлей, а также перехода от подвижного состояния к адгезированному. К белкам, положительно регулирующим экспрессию *csgD*, относятся MlrA, OmpR, IHF, RstA. Штаммы *E. coli* серотипа O157:H7 не продуцируют белок MlrA, т.к. нормальная структура гена *mlrA* нарушена встроенным в него профагом *stx1*. Однако в культуре этих штаммов как правило присутствуют в незначительном количестве клетки, утратившие профаг и восстановившие изначальную структуру гена *mlrA*. Поэтому мы рассматривали утрату профага *stx1* как одну из возможных причин продукции курлей штаммом

Срп. К белкам, отрицательно регулирующим экспрессию *csqD* относятся H-NS, СрхR, CRP, RscB. В структуре гена *rscB* находятся 2 пары прямых повторов, которые, согласно литературным данным, являются мутационными хот-спотами (Chen et al., 2015). По этой причине вероятность мутации, приводящей к продукции курлей штаммом *срп*, в данном гене выше, чем в остальных генах, кодирующих данную группу белков. Таким образом, для картирования были выбраны гены *mlrA* и *rscB*.

Методом ПЦР были амплифицированы последовательности ДНК генов *mlrA* и *rscB* у штамма Срп, дикого штамма ATCC 43890 и контрольного штамма *E. coli* M17, у которого, в отличие от штаммов серотипа O157:H7, в гене *mlrA* отсутствует профаг *stx1*. Для получения последовательности гена *rscB* были использованы праймеры *rscB-F* и *rscB-R*, для получения последовательности гена *mlrA* – MlrA-A, MlrA-B, MlrA-C, MlrA-F. Полученные последовательности ДНК анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Если в последовательности гена *mlrA* находился профаг, то в геле были видны 2 фрагмента ДНК - ≈ 700 п.н. и 800 п.н., продукты пар MlrA-A/MlrA-B и MlrA-C/MlrA-F; если же была восстановлена нормальная структура гена *mlrA*, то в геле был виден один фрагмент ≈ 340 п.н. – продукт пары MlrA-A/MlrA-F. В смеси с праймерами для анализа гена *mlrA* у штаммов ATCC 43890 и *срп* были 2 фрагмента ДНК - ≈ 700 п.н. и 800 п.н., у штамма M17 - один фрагмент ≈ 340 п.н. Таким образом, выпадение профага *stx1* как возможная причина продукции курлей штаммом Срп была исключена. (рис. 18) Длина ПЦР продукта, полученного с праймерами *rscB-F* и *rscB-R*, в норме без мутаций составляла 1000 п.н. Длина последовательности гена *rscB* была одинакова у всех трех штаммов.

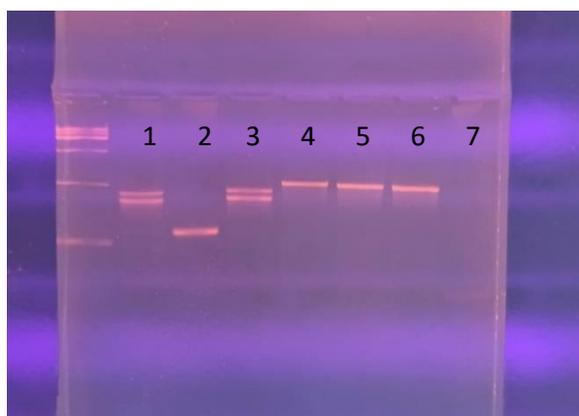


Рис. 18. Изучение структуры генов *mlrA* и *rscB* с помощью ПЦР. 1,2,3 – праймеры *mlrA* F, *mlrA* E, *mlrA* A, *mlrA* B, 4,5,6 – праймеры *rscB* F и *rscB* R. 1,4 – *E. coli* Cpm, 2,5 – *E. coli* M17, 3,6 – *E. coli* ATCC 43890, 7 – отрицательный контроль

Далее был проведен поиск более мелких мутаций в последовательности гена *rscB*. Для этого была определена последовательность гена *rscB* у штаммов CPM и ATCC 43890. Секвенирование образцов произвели в ЦКП “ГЕНОМ”. Анализ сиквенсов производили в программе BioEdit. По результатам проведенного анализа сиквенсов была обнаружена точечная замена 639 нуклеотида в гене *rscB* с цитозина на аденин, что привело к замене 206-й аминокислоты с серина на фенилаланин в RcsB мутантных штаммов по сравнению с родительским штаммом ATCC 43890. Стоит отметить, что получившиеся последовательности нуклеотидов и аминокислот у мутантов в данном участке гена совпали с последовательностями штамма M17 и что сиквенсы всех 3 исследованных мутантов имели одинаковую мутацию. (рис. 19) В результате, для дальнейшей работы нами был выбран один штамм, обозначенный Cpm (curli producing mutant).

Аминокислотная замена в штамме Cpm произошла в участке связывания белка RcsB с RcsA. Гетеродимер, получающийся при связывании RcsA и фосфорилированной формы RcsB, отрицательно регулирует экспрессию генов, играющих важную роль в адгезии бактерий к поверхности и друг к другу и формировании биопленок, а именно генов жгутикового белка флагеллина, Ag43 и курлей. Мутация в участке связывания могла привести к

снижению аффинности белков RcsA и RcsB. По итогам проделанной работы была сформулирована гипотеза о том, что именно данная мутация являлась причиной изменений в фенотипе, наблюдаемых у штамма Срт.

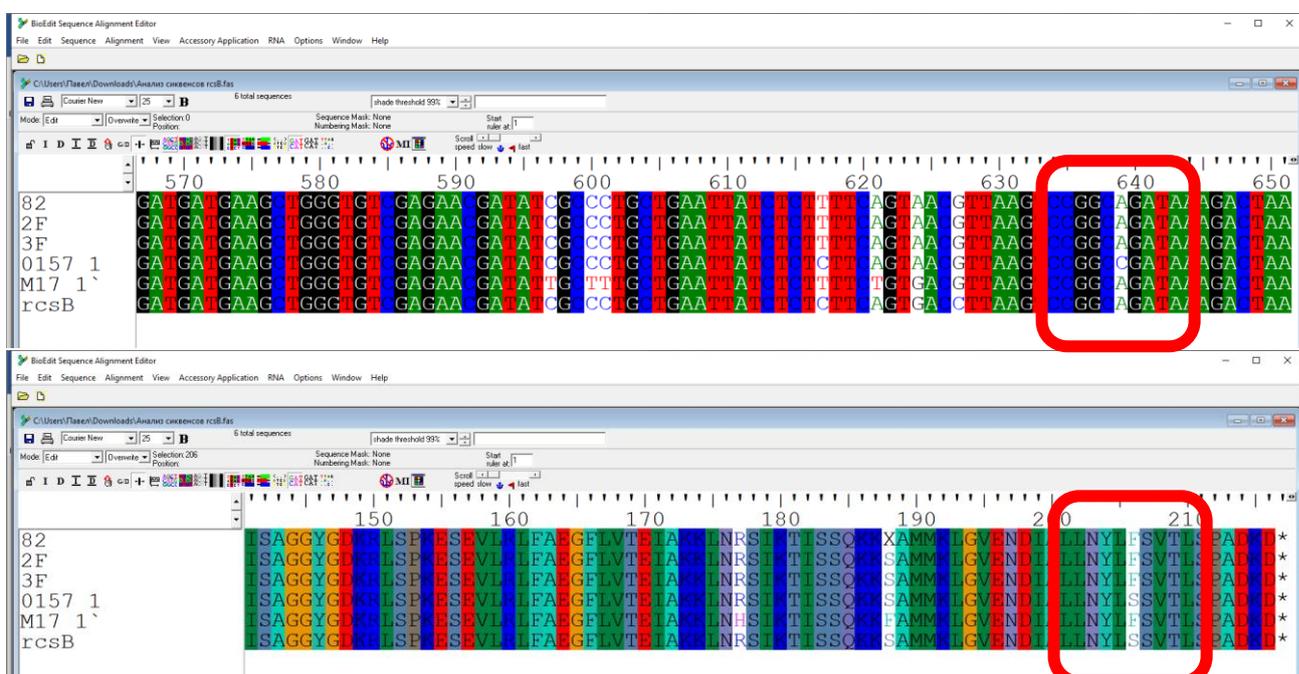


Рис. 19. Анализ сиквенсов гена *rcsB*. Сверху – последовательность ДНК, снизу – последовательность белка. Образцы: 82 – Срт1, 2F – Срт2, 3F – Срт3, O157 1 – штамм дикого типа ATCC 43890, M17 1 – M17, rcsB – последовательность, взятая из база данных GenBank

3.8. Получение рекомбинантного штамма

Как уже было сказано выше, обнаруженная мутация гена *rcsB* затронула участок связывания белка RcsB с белком RcsA, тем самым снижая их аффинность друг к другу и, как следствие, снижая количество функциональных молекул гетеродимера RcsA-RcsB в бактериальной клетке. Мы предположили, что гиперэкспрессия гена *rcsA* может компенсировать пониженную вследствие мутации аффинность белков RcsA и RcsB. Для проверки этой гипотезы был получен гиперэкспрессионный мутант на основе штамма Срт. Нуклеотидную последовательность гена *rcsA* амплифицировали методом ПЦР с праймерами RcsA1 и RcsA2 (длина

полученного фрагмента – 895 п.н.). В качестве матрицы использовалась геномная последовательность дикого штамма *E. coli* ATCC 43890. Продукт амплификации клонировали в вектор pAL2-T. Отбор трансформированных клонов вели по их резистентности к ампициллину, обеспечиваемой вектором, и с помощью биохимического теста утилизации галактозы (X-Gal) в присутствии изопропилтиогалактозида (ИПТГ). Наличие правильно лигированных вставок в отобранных клонах проверяли с помощью вырезания вставки из выделенной плазмиды рестриктазами EcoR1 и PaeI, а также ПЦР с праймерами RcsA2 и RcsA4 с последующей визуализацией полученных результатов с помощью электрофореза в агарозном геле. Отрицательным контролем послужил один из клонов, окрасившихся в синий цвет при селекции. После селекции были отобраны 3 клона, из которых только у одного был обнаружен подходящий результат после рестрикции (фрагменты ≈ 3000 п.н. и ≈ 1000 п.н.). Проверка ориентации вставки в лизатах отобранного клона с помощью ПЦР выявила фрагмент ДНК длиной ≈ 1300 п.н., что соответствовало расчетам. (рис. 20)

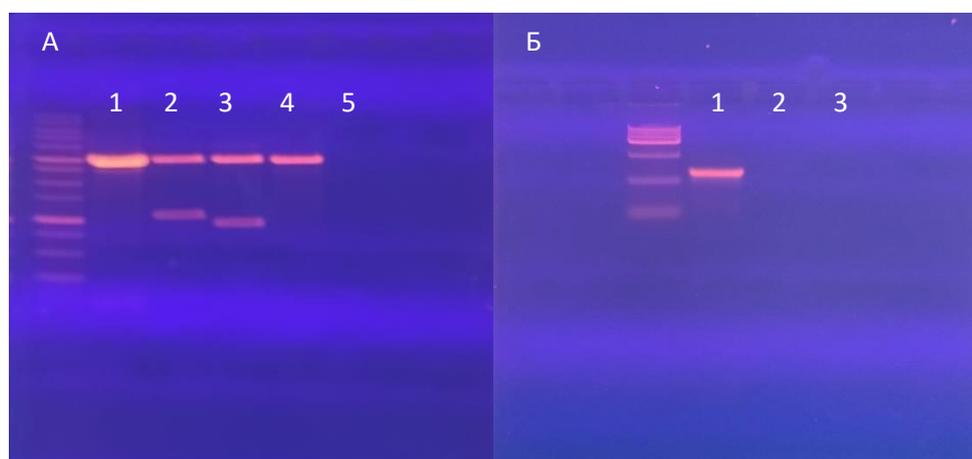


Рис. 20. Анализ конструкции pAL2T::*rcaA*. А – последовательности после рестрикции EcoR1 и PaeI. 1 – конструкция pAL2T::*rcaA* до рестрикции, 2,3,4 - конструкция pAL2T::*rcaA*, выделенная из отобранных клонов после рестрикции, 5 – отрицательный контроль, Б – последовательности, полученные после ПЦР с праймерами *rcaA2* и *rcaA4*. 1 – конструкция Сrm(pAL2-T::*rcaA*), 2 – вектор Сrm(pAL2-T), 3 – отрицательный контроль

Из отобранного таким образом клона сеяли культуру для выделения плазмид. Штамм с гиперэкспрессией RcsA получали трансформированием полученной конструкции в штамм *Spm*. Трансформированный мутантный штамм получил название *Spm(pAL2-T::rcsA)*. В качестве контроля в дальнейших исследованиях использовался мутантный штамм, в который трансформировали вектор pAL2-T без лигированной последовательности *rcsA*. Данный штамм получил название *Spm(pAL2-T)*.

3.9. Исследование фенотипа полученных рекомбинантных штаммов

Фенотип штаммов *Spm(pAL2-T::rcsA)* (далее в тексте *Spm::pRcsA*), *Spm(pAL2-T)* (далее в тексте *Spm*) и родительских штаммов исследовался в магнитном биопринтере методами высевов с подсчетом КОЕ в агрегатах и в окружающей агрегаты среде и связывания агрегатами конго красного аналогично тому, что было сделано при исследовании дикого типа и штамма *Spm*. Высевы образцов агрегатов и среды на агар показали, что соотношение числа бактериальных КОЕ в агрегатах и в среде было достоверно больше у штамма *Spm::pRcsA*, чем у контрольного штамма *Spm* (10,7 и 7,3 соответственно; $p < 0,05$) (рис. 21А).

Методом оценки связывания конго красного в магнитном биопринтере было показано, что штамм *Spm::pRcsA* связал на 35% больше красителя, чем контрольный штамм (0,022 и 0,034 оптические единицы соответственно; $p < 0,05$) (рис. 21Б).

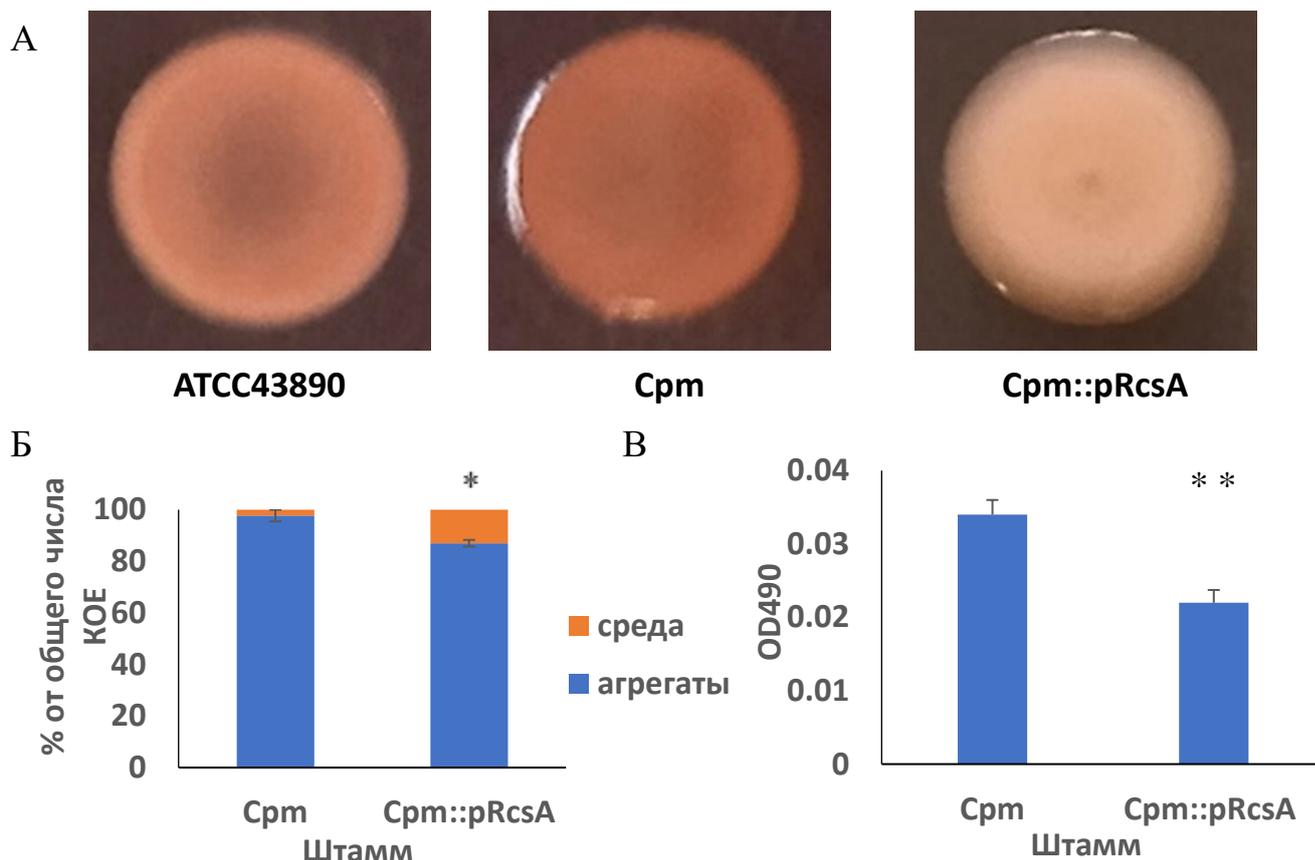


Рис. 21. Фенотип рекомбинантного штамма Cpm::pRcsA. А – связывание конго красного на агаре, Б – соотношение КОЕ в агрегате и среде (* – $p < 0,05$), В – связывание конго красного в биопринтере (** – $p < 0,005$)

Таким образом, полученные результаты показали, что увеличение/уменьшение продукции курлей, связывающих конго красный, коррелирует с увеличением/уменьшением эффективности автоагрегации, а также, что отрицательный контроль продукции курлей гетеродимером RsaB/RcsA негативно влияет на эффективность автоагрегации.

3.10. Сравнение спектра секретируемых белков штамма M17 в условиях магнитной левитации и стационарной культуры

Для лучшего понимания механизмов, влияющих на автоагрегацию, был проведен протеомный анализ бактериальной культуры в биопринтере. Стационарные культуры *E. coli* M17 развели в 100 раз средой LB с 0,2 М гадобутрола для исследуемого образца и средой LB с 20% стерильного

раствора фосфатного буфера для отрицательного контроля. После инкубации в течение 144ч образцы зафиксировали 4% раствором формалина в течение 24ч. Протеомный анализ зафиксированных образцов, проведенный на базе ИБХФ РАН с использованием базы данных KEGG, показал, что белки, у которых были обнаружены различия в степени экспрессии в условиях эксперимента, принадлежали к следующим функциональным классам: 1) белки, участвующие в реализации генетической информации, 2) стрессорные белки, 3) белки, участвующие в метаболизме углеводов стрессорные белки, 4) поверхностные белки. Из белков, относящихся к первому классу, в магнитном биопринтере повысилась экспрессия рибосомального белка S1 в 1,74 раза. Из стрессорных белков было выявлено повышение экспрессии НАДН:хинон-оксидоредуктазы WrbA в 2 раза, шаперона ClpX в 2,1 раза и протеаза ClpXP в 6 раз, а также снижение экспрессии субъединицы С алкилгидропероксидредуктазы AC в 2 раза. Из белков, участвующих в метаболизме углеводов, повысилась экспрессия изоцитратлиазы AceA в 2,46 раза и изоцитратдегидрогеназы Idh в 3,73, снизилась экспрессия ацетаткиназы AskA, анаэробной глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы и GlpA транскетолазы Tkt1 в 2,4 раза, а также метилглиоксальсинтазы MgsA в 2 раза Среди поверхностных белков произошло повышение экспрессии белка-транспортера BtuB в 3,5 раза, адгезина Ag43 в 2,5 раза и структурного белка жгутиков FliC в 14 раз (таблица 5).

Таблица 5. Изменения протеома культуры *E. coli* M17 при росте в биопринтере

Название белка	Соотношение экспрессии биопринтер/контроль	Функциональный класс белков
RS1	1,74	Белки, участвующие в реализации генетической информации
RS6	0,76	
Pnp	0,71	
RpoB	0,81	
Rho	0,93	
KatG	1,19	Стрессорные белки
WrbA	2	
AhpC	0,54	
DnaK	1,23	
ClpB	2,14	
ClpXP	6,06	
AceA	2,46	Белки, участвующие в метаболизме углеводов
Idh	3,73	
TdcE	1,15	
PflB	1,07	
MgsA	0,5	
ElbB	1,07	
AckA	0,44	
GlpA	0,41	
Tkt1	0,41	
BtuB	3,48	
Ag43	2,46	
FliC	13,93	

В августе-сентябре 2019 года был проведен эксперимент на базе МКС с целью исследовать сочетанное воздействие магнитного поля в биопринтере и невесомости на биологические объекты, в том числе на бактерии *E. coli* штамм M17. В условиях невесомости были выращены 2 группы образцов – в биопринтере и без биопринтера для оценки влияния космических условий на рост бактерий независимо от магнитного поля. Образцы выращивались и фиксировались на борту МКС, после чего возвращались на Землю, где уже проходило их исследование с помощью протеомного анализа. Т.к., за исключением условий невесомости, условия экспериментов на МКС и предыдущего эксперимента на Земле были одинаковыми, то результаты этих экспериментов были объединены. Это дало возможность оценить различия в

экспрессии белков на Земле и в космосе. Таким образом, было проведено сравнение протеомов в следующих группах образцов: 1) невесомость/контроль без биопринтера на Земле, 2) невесомость+биопринтер/контроль на Земле, 3) невесомость/биопринтер на Земле. Сравнение проводилось по тем же функциональным классам белков, что и в предыдущем эксперименте. В условиях невесомости среди белков, участвующих в реализации генетической информации, повысилась экспрессия белка-терминатора транскрипции Rho на 87% и снизилась экспрессия β -субъединицы РНК-полимеразы RpoB на 62%. Среди стрессорных белков повысилась экспрессия гидропероксидазы KatG и НАД(Ф)Н дегидрогеназы (хинона) WbrA в 2 и 2,83 раза соответственно и снизилась экспрессия шаперонов DnaK на 67%, ClpB в 2 раза и ClpXP на 46%. Среди белков, участвующих в метаболизме углеводов, повысилась экспрессия изоцитратлиазы AceA в 4,29 раза и D-лактатдегидратазы ElpB в 2,46 раза и снизилась экспрессия изоцитратдегидрогеназы Idh на 53%, пируватформатлиаз TdcE на 71% и PflB на 67% и ацетаткиназы AskA на 43%. Среди поверхностных белков повысилась экспрессия белка-транспортера VtuB в 16 раз и белка-адгезина Ag43 в 2,64 раза.

При сочетанном воздействии невесомости и магнитного поля на бактерии среди белков, участвующих в реализации генетической информации, была повышена экспрессия рибосомального белка S6 в 2,3 раза, полинуклеотидфосфорилазы Pnp в 5,28 раза и белка-терминатора транскрипции Rho в 2 раза и снизилась экспрессия β -субъединицы РНК-полимеразы RpoB на 84%. Среди стрессорных белков повысилась экспрессия гидропероксидазы KatG в 3,48 раз, НАД(Ф)Н дегидрогеназы (хинона) WbrA в 4 раза, субъединицы C алкилгидропероксидредуктазы AhpC в 2,14 раза и снизилась экспрессия белков-шаперонов DnaK и ClpB на 91% и 88% соответственно. Среди поверхностных белков повысилась экспрессия белка-транспортера VtuB в 73,52 раза и белка-адгезина Ag43 в 2,46 раза.

Наконец, при сравнении протеомов культур, выращенных в условиях невесомости и в биопринтере на Земле, были обнаружены следующие различия: среди белков, участвующих в реализации генетической информации, в невесомости повышена экспрессия белков RS6 и Pnp в 2,3 раза каждый, а также Rho в 2 раза, понижена экспрессия рибосомального белка RS1 на 43% и RpoB на 53%; из стрессорных белков повышена экспрессия KatG на 74% и AphC в 2,14 раза, понижена экспрессия DnaK на 73%, ClpB на 77%, ClpXP на 92%, среди белков, участвующих в метаболизме углеводов, повышена экспрессия AceA в 2,3 раза, MgsA в 3,48 раза, ElbB и Tkt1 в 2,64 раза, понижена экспрессия Idh на 87%, TdcE в 4 раза, PflB на 67% и GlpA на 62%, среди поверхностных белков повышена экспрессия VtuB в 4,29 раза и понижена экспрессия FliC на 93% (таблица 6).

Сравнение результатов изменений протеома, вызванных условиями космического полета и магнитной левитации, показывает, что и те и другие условия достоверно увеличивают экспрессию поверхностных белков Ag43 и VtuB, а также белка гликозилатного шунта AceA. С другой стороны, нами был выявлен различия, отличающие бактерии, выращенные в условиях космоса и в условиях магнитной левитации – эти различия в первую очередь касались белков обходного метилглиоксалевого пути и, в частности, основного белка MgsA. Причины сходства и различий в протеоме *E. coli*, выращенных в магнитном биопринтере на Земле и в условиях космического эксперимента, обсуждаются ниже.

Таблица 6. Сравнение протеомов культур *E. coli* M17 в различных экспериментальных условиях

Название белка	Соотношения экспрессии			Функциональный класс белков
	Космос/контроль на Земле	Космос+биопринтер/контроль на Земле	Космос/биопринтер на Земле	
RS1	1,07	-	0,57	Белки, участвующие в реализации генетической информации
RS6	1,62	2,3	2,3	
Pnp	1,62	5,28	2,3	
RpoB	0,38	0,16	0,47	
Rho	1,87	2	2	
KatG	2	3,48	1,74	Стрессорные белки
WrbA	2,83	4	1,41	
AhpC	1,15	2,14	2,14	
DnaK	0,33	0,09	0,27	
ClpB	0,5	0,12	0,23	
ClpXP	0,54	-	0,08	
AceA	4,29	9,85	2,3	Белки, участвующие в метаболизме углеводов
Idh	0,47	0,06	0,13	
TdcE	0,29	0,07	0,25	
PflB	0,33	0,18	0,33	
MgsA	1,62	5,66	3,48	
ElbB	2,46	-	2,46	
AckA	0,57	-	1,41	
GlpA	1,15	3,03	0,38	
Tkt1	1,07	3,03	2,64	
BtuB	16	73,52	4,29	
Ag43	2,64	2,46	1,07	Поверхностные белки
FliC	1,07	-	0,07	

Глава 4. Обсуждение результатов

4.1. Описание модели и её особенности

В данной работе была предложена экспериментальная модель, которая позволяет проводить *in vitro* исследования бактериальных агрегатов, формируемых в толще жидкости. Предложенный метод основан на росте бактерий в условиях магнитной левитации, когда сила магнитного поля уравнивает силу гравитации. В системе использовались два постоянных магнита с максимальным полем вблизи магнитов 1,3 Тл и градиентом магнитного поля 2,2 Т см⁻¹. Существенным замечанием к системе могла бы быть необходимость учитывать магнитное поле при изучении поведения бактерий. Однако, во-первых, необходимо учитывать, что бактерии при выращивании в данной экспериментальной системе концентрируются в области с наименьшим магнитным полем – таков принцип действия магнитной ловушки. С учетом большого градиента поля (2,2 Т см⁻¹ и расстояния от поверхности магнитов (около 1 см) напряженность магнитного поля в зоне скопления магнитов близка к нулевым значениям. Таким образом, в области скопления бактерий магнитное поле близко по величине к магнитному полю Земли, которое составляет примерно 0,00005 Тл, и существенно меньше, чем поле, используемое в магнитно-резонансной томографии (МРТ) [241; 242]. Чтобы получить эффект магнитной левитации в более слабом магнитном поле, Парфенов с соавт. предложили систему, в которой увеличение магнитной силы достигается благодаря использованию среды с парамагнитными свойствами, формируемыми за счет добавления соединения редкоземельного металла гадолиния – гадобутрола, вещества, используемого в магнитно-резонансной терапии и обладающего низкой токсичностью [228]. В результате использования парамагнитной среды, магнитная левитация может быть достигнута при относительно низких

значениях напряженности магнитного поля [215]. Лежащие в основе этого физические принципы выходят за рамки диссертации, и поэтому в данной работе будет обсуждаться только биологические последствия включения в экспериментальную систему гадобутрола. Основной проблемой, связанной с использованием соединений гадолиния, является их токсичность. Токсичность соединений гадолиния связана с тем, что ион Gd^{3+} может вытеснять из биологических молекул ионы кальция, что сказывается, в первую очередь, на активности кальциевых каналов, и делает свободные ионы гадолиния токсичными для клеток. Однако гадобутрол, представляющий собой неионный комплекс гадолиния (III) с макроциклическим лигандом — дигидрокси-гидроксиметилпропилтетраазациклододекан-триуксусной кислотой (бутролом), в силу своей химической структуры удерживает ион гадолиния даже в биологических жидкостях, что обеспечивает низкую токсичность гадобутрола для живых организмов (рис. 22).

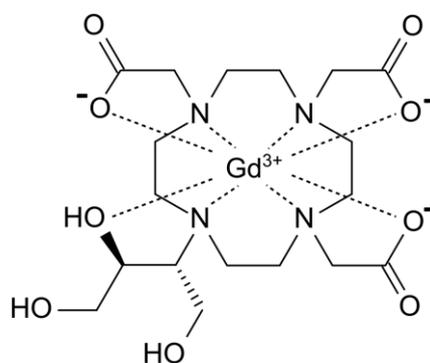


Рис. 22 Структурная формула гадобутрола.

Система, использующая постоянные магниты и среду, содержащую гадобутрол, была применена Парфеновым и соавторами для получения жизнеспособных тканевых микроконструктов без скаффолдов с использованием тканевых сфероидов [228]. Жизнеспособность клеток в тканевых микроконструктах свидетельствовала о низкой токсичности предложенных условий для клеток млекопитающих. В настоящей работе впервые в мире эта система была применена для изучения поведения

бактерий. Результаты работы показали, что токсичность гадобутрола для бактерий также невысокая, а наличие гадобутроа в питательной среде не мешает бактериям размножаться.

При помещении стационарной культуры бактерий в условия магнитной левитации бактерии из ночной культуры группировались в магнитной ловушке, перемещаясь в направлении точки наименьшего магнитного поля. Размер и положение бактериальной массы зависели от концентрации гадобутрола, что предполагает установление определенных связей между бактериями: осаждение массы бактерий как целого при понижении концентрации гадобутрола согласуется с принципами магнитной левитации, описанными выше, с учетом того, что снижение концентрации гадобутрола снижает парамагнитные свойства среды и, следовательно, уменьшает магнитную силу. Тем не менее, после снятия магнитного поля бактериальная масса распадалась, и бактерии распространялись по всему объему емкости со средой, предполагая, что либо связи между бактериями были нестабильными, либо, что такие связи устанавливались между небольшим количеством соседних бактериальных клеток. В целом такое поведение напоминало поведение стационарной культуры, оставленной на столе, за исключением того, что бактерии, оставленные на столе, не левитируют и постепенно осаждаются на дно.

Если же ночную бактериальную культуру разводили свежей средой, обеспечивая ее рост в биопринтере, то бактерии начинали вести себя иначе: формировался плотный агрегат, который, как показали результаты КЛСМ и СЭМ, состоял из более мелких микроагрегатов, образованных бактериями, погруженными во внеклеточный матрикс. Образование агрегатов было не только следствием действия магнитных сил, направляющих бактерии в точку наименьшего магнитного поля, т.к. помимо бактерий, входящих в состав агрегата, внутри рабочего объема присутствовали свободно плавающие бактерии (примерно от 2 до 10% общей популяции). Также сам по себе

гадобутрол не стимулировал бактериальной агрегации, поскольку рост в парамагнитной среде вне магнитного биопринтера не приводил к появлению микроагрегатов. В целом, образование агрегатов было неизбежным процессом роста бактерий в условиях относительно небольшого объема (определяемого локальным минимумом магнитного поля) неподвижной среды без воздействия на них силы тяжести и без поверхности для адгезии. С точки зрения роста в ограниченном пространстве в жидкой среде при уменьшенной силе тяжести, условия магнитной левитации имитируют среду, связанную с хроническими инфекциями, возникающими в ограниченном пространстве альвеол, тканей слизистых оболочек и т.д., заполненных вязкими физиологическими жидкостями, в которых плавучесть бактерий, фактически, является 100-процентной [89; 102; 243].

Как уже было сказано выше, с помощью КЛСМ и СЭМ было выявлено, что агрегаты, полученные в условиях магнитной левитации, морфологически напоминают прикрепленные к поверхности биопленки и микробные коагрегаты из природных экосистем. Еще одной особенностью, которая делала левитирующие агрегаты похожими на биопленки, была продемонстрированная нами сильная потребность в росте и размножении бактерий для образования агрегатов, т.к. при помещении стационарной культуры в биопринтер автоагрегации в заметных масштабах не наблюдалось. Наконец, бактерии в левитирующих агрегатах продемонстрировали повышенную устойчивость к антибиотикам, что является отличительной чертой бактериальных биопленок. Об этих трех биопленкоподобных особенностях сообщалось и в работах других авторов, посвященных изучению агрегатов [4; 89; 102].

Простота манипуляций с бактериями в биопринтере позволила выявить и количественно оценить различия между штаммами *E. coli* в отношении автоагрегатов и биопленок. Штамм JM109, широко используемый для экспериментов с биопленками, демонстрировал слабое образование

автоагрегатов. Штамм ATCC 43890, выбранный из-за его выраженной способности к автоагрегации, не образовывал биопленок на пластиковых поверхностях и агаре. Окрашивание матрикса конго красным показало, что отсутствие матрикса является основной причиной как плохого образования биопленки, так и плохого образования неприкрепленных агрегатов, в зависимости от конкретного штамма и экспериментальных условий. Используемая в работе система позволяла в режиме реального времени отслеживать рост автоагрегатов и количественно определять способность к образованию агрегатов. Данные, полученные с помощью биопринтера, показали, что хорошая способность к образованию биопленки не обязательно означает хорошую способность к образованию неприкрепленных агрегатов, и наоборот. Штамм, демонстрирующий хорошую способность к образованию неприкрепленных агрегатов, может оказаться неэффективным в формировании биопленки. Таким образом, полученные результаты подтверждают ранее опубликованные мнения об ограничениях моделей биопленок для изучения поведения патогенных для человека бактерий, формирующих в процессе инфекции автоагрегаты [244]. Более того, наши исследования предлагают средства для преодоления этих препятствий. Принимая во внимание растущее понимание роли неприкрепленных бактериальных агрегатов в патогенезе хронических инфекций, разработанная система может быть полезна для моделирования поведения бактерий при данных заболеваниях.

4.2. Влияние продукции курлей и механизмов генетической регуляции на автоагрегацию *E. coli* серотипа O157:H7

Одной из задач данного исследования было использование разработанной системы для анализа регуляторных механизмов, контролирующей формирование автоагрегатов патогенными бактериями. В частности, нас интересовало, как будут влиять на формирование

автоагрегатов мутации, влияющие на продукцию курлей, поверхностных структур, играющих важную роль в формировании биопленок *E. coli* [245]. Курли – это типичные для *E. coli* и *Salmonella enterica* филаменты, структурной единицей которых является амилоидный белок курлин. Курли являются одним из основных белковых компонентов матрикса энтеробактерий. Как и другие амилоидные белки, курлин и курли связывают краситель Конго-красный, что делает наблюдения за наличием курлей легко воспроизводимым экспериментом.

Токсин-продуцирующие *E. coli*, относящиеся к серотипу O157:H7, не формируют биопленки и не продуцируют курли при выращивании на агаризованных питательных средах. Это связано с тем, что кодирующий Шига-подобный токсин *stx1* профаг расположен в кодирующей области гена регуляторного белка *mlrA*, положительно регулирующего продукцию курлей и формирование биопленок [246]. Однако неоднократно было показано, что *E. coli* O157:H7 с высокой частотой выщепляют мутации, приводящие к продукции курлей, что выявляется по появлению красных колоний среди белых при выращивании на агаре, содержащем конго красный [246; 247]. Некоторые из этих мутаций связаны с утратой профага, и тогда полностью восстанавливается не только продукция курлей, но и способность штамма формировать биопленки [246]. В других случаях мутант получает способность продуцировать курли, но биопленки не формирует, что обычно связано с мутациями в альтернативных частях генома [247].

В данной работе был получен спонтанный мутант, продуцирующий курли при выращивании на агаре, но не формирующий биопленки. Нами была картирована мутация в гене *rscB* с цитозина на аденин в положении 639, что привело к замене 206-й аминокислоты в белке RcsB с серина на фенилаланин. Данный участок белка RcsB отвечает за связывание с белком RcsA. Белковый гетеродимер RcsB-RcsA отвечает за подавление экспрессии гена *csgD* и является одним из ключевых регуляторов этого гена. CsgD в

свою очередь является ключевым регулятором перехода к адгезированному состоянию из подвижного и продукции внеклеточного матрикса, т.е. напрямую влияет на процессы формирования биопленок и автоагрегацию. В ранее опубликованных другими авторами работах, посвященных получению аналогичных мутантов *E.coli* данного серотипа, акцент был сделан также на гене *rscB*, а также на *mlrA*, т.к. во-первых, оба эти гена относятся к группе генов, контролирующих белок-регулятор CsgD (как уже было сказано выше MlrA регулирует положительно, RcsB – отрицательно), а во-вторых именно в этих генах вероятность получения мутации наиболее высока [246; 248]. В чистой культуре штаммов *E. coli* серотипа O157:H7 всегда присутствуют клетки, утратившие профаг и восстановившие нормальную структуру гена. Экспериментально утрату профага стимулируют выращиванием бактерий на агаре в присутствии дисков с триметопримом/сульфаметоксазолом [246]. Ген *rscB* в свою очередь содержит 2 пары прямых повторов, являющихся мутационными хот-спотами. В отличие от полученных ранее мутаций в *rscB*, в данной работе мутация произошла в концевом участке белка RcsB, отвечающем за связывание с RcsA.

Регулятор транскрипции RcsB относится к классу двухкомпонентных регуляторов, активность которых контролируется фосфорилированием гистидина в регуляторном домене. В отличие от большинства других двухкомпонентных регуляторов транскрипции, RcsB проявляет свою активность как форме гомодимеров (RcsB/RcsB), так и в форме гетеродимеров и, в частности, гетеродимера RcsB/RcsA) [249]. Области RcsB, участвующие в формировании гомо- и гетеро-димеров, отличаются [250]. В частности, гетеродимер RcsB/RcsA вовлечен в контроль продукции курлей [251]. Таким образом, с учетом картирования мутации в области формирования гетеродимера, мутантный белок потерял свою функцию, что привело к более заметным изменениям в продукции курлей, чем при мутациях в других участках гена [246; 247]. Доказательством того, что

именно проблемы формирования гетеродимера RcsB/RcsA повлияли на способность мутантного штамма СРМ продуцировать курли, было подавление этого фенотипа в условиях гиперэкспрессии RcsA: действительно, точечная мутация, по-видимому, не полностью нарушила, а лишь уменьшила способность RcsB формировать гетеродимеры с RcsA, что могло быть компенсировано увеличением концентрации RcsA.

Полученные в данной работе результаты указывают на то, что курли влияют на формирование неприкрепленных автоагрегатов *E. coli* O157:H7; а также что увеличение производства курлей, не влияющее на способность *E. coli* O157:H7 формировать биопленки, увеличивает эффективность формирования автоагрегатов. Эти результаты подтверждают выводы о том, что способность формировать биопленки и способность формировать неприкрепленные автоагрегаты у *E. coli* регулируются независимо. Тем не менее, с большой вероятностью можно утверждать, что контролирующие эти процессы регуляторные пути пересекаются. На последнее указывает то, что курли, вовлеченные в формирование неприкрепленных агрегатов, также являются существенным элементом биопленок, формируемых штаммами других серотипов *E. coli*, а также *S. typhimurium*.

4.3. Изменения в протеоме агрегированных бактерий в магнитном биопринтере и в невесомости

В космических экспериментах, Zea и соавторы показали, что растущие в условиях микрогравитации бактерии формируют автоагрегаты [180]. Микрогравитация сама по себе стимулирует автоагрегацию клеток. Комплексный эксперимент с *Salmonella typhimurium*, выращенной на борту космического корабля "Atlantis" STS-115, продемонстрировал, что в бактериальной культуре последовательно активируются некоторые гены, участвующие в процессе производства внеклеточного матрикса. Эти данные

были подтверждены экспериментами на Земле, в которых бактерии выращивали в различных моделях роторного типа, моделирующих условия свободного падения [196; 252]. Эти данные и сходство условий микрогравитации и магнитной левитации наводят на мысль, что используемая в этой работе экспериментальная система может быть использована для моделирования физиологии бактерий в условиях микрогравитации.

Для описания изменений у бактерий, выращенных в условиях микрогравитации и в условиях магнитной левитации по сравнению со стандартными условиями культивирования, нами в сотрудничестве с сотрудниками Сколковского института Науки и Технологии были определены изменения в протеоме комменсального штамма *E. coli*, выращенного на МКС и в магнитном биопринтере.

Важной особенностью, отличающей бактерии, выращенные в условиях микрогравитации и магнитной левитации, от контроля на Земле, была сверхэкспрессия кобаламинового мембранного транспортера *VtuB*. У *E. coli* есть по крайней мере два витамин-B12-зависимых фермента: B12-зависимая метионинсинтаза и этаноламиндезаминаза. B12-зависимая метионинсинтаза, которая катализирует последнюю стадию биосинтеза метионина, имеет функциональный гомолог, независимый от B12, поэтому его потребность в кобаламинозависимом белке может быть не столь высокой [253]. Этанолминдезаминаза используется для утилизации этаноламина, ценного микробного источника азота и углерода, полученный из мембранного фосфолипида фосфатидилэтанолamina. Клеточные мембраны могут дополняться фрагментами лизированных клеток, и может потребоваться активация *VtuB* для обеспечения эффективного использования мертвой части популяции. В контроле на Земле культура мертвых бактерий оседала на дно. Однако ситуация была иной в культурах, выращенных в условиях микрогравитации и магнитной левитации, где мертвые и живые бактерии

находились в непосредственной близости. Таким образом, фрагменты лизированных клеток должны быть в избытке в культурах, выращенных в условиях микрогравитации и магнитной левитации, что объясняет потребность в $VtuV$.

Особенностью космического эксперимента в данной работе была пролонгированная инкубация бактерий в течение шести дней. Это время соответствует поздней стационарной фазе жидкой культуры на Земле, когда питательные ресурсы исчерпываются, бактерии голодают и выжившие перерабатывают ресурсы, высвобождаемые лизированными клетками. Два пути активировались в клетках, выращенных в условиях микрогравитации и магнитной левитации; этими путями были метилглиоксальный шунт и глиоксилатный шунт. Ограничения питания, доступность промежуточных продуктов прямого гликолиза и других метаболитов, поставляемых лизированными клетками, а также ограничения кислорода могут привести к активации обходного метилглиоксального пути и глиоксилатного шунта в условиях микрогравитации.

Обход метилглиоксальный путь активируется в условиях ограничения питания или избытка промежуточных продуктов прямого гликолиза [254]. Превращение метилглиоксаля в пируват через D-лактат является предпочтительным направлением образования пирувата в условиях затруднения гликолиза [255]. Глиоксилатный шунт имеет ту же активность некоторых ферментов, что и цикл трикарбоновых кислот. Однако он отличается быстрым преобразованием изоцитрата в сукцинат с помощью изоцитратлиазы $AceA$ и малата с помощью глиоксилата с помощью малатсинтазы $AceB$. Глиоксилатный шунт необходим, когда ацетил-КоА является прямым продуктом метаболического пути, например, путем деградации ацетата, жирных кислот и алканов, т. е. этот путь обеспечивает выживание клеток в условиях голодания. Глиоксилатный шунт позволяет

клеткам превращать две единицы ацетил-КоА в сукцинат и избегать стадий высвобождения CO₂ цикла трикарбоновых кислот.

Таким образом, активация глиоксилатного шунта более эффективна с точки зрения продукции биомассы и позволяет снизить важное для клетки закисление среды при отсутствии конвекционных потоков. Сукцинат, продукт глиоксилатного шунта, содержит акцептор H⁺ в анаэробных условиях вместо кислорода с низким содержанием кислорода. В аэробных условиях производство сукцината в естественных условиях невозможно. Таким образом, изменения в углеводном обмене свидетельствовали о том, что бактерии в условиях микрогравитации и магнитной левитации подвергались дефициту питательных веществ и кислорода, а метаболизм выживших был изменен для обеспечения адекватного потребления фрагментов лизированных клеток. Используя подходы транскриптома и протеома, Crabbe в соавт. продемонстрировал анаэробный способ роста *P. aeruginosa* PAO1 в условиях космического полета и предложили конструкцию аппаратов для обработки жидкости (FPA), обеспечивающую ограниченную доступность кислорода для бактерий, выращенных на борту МКС. Аппаратное обеспечение, использованное в нашем космическом эксперименте, было очень похоже на FPA, описанное Crabbe в соавт. [256]. Таким образом, результаты данного исследования подтверждают сильную бактериальную реакцию на низкую доступность кислорода в условиях космического полета, что может быть частично связано с дизайном эксперимента.

Параллельные наземные опыты на бактериях, выращенных в условиях магнитной левитации, позволили оценить влияние различных параметров на изменения углеводного обмена. В условиях магнитной левитации кислород обеспечивался наличием воздуха в емкостях со средой, наполненных наполовину. При этом ограничения в питании были одинаковыми как в земных, так и в космических условиях. Глиоксилатный шунт активировался у

бактерий, выращенных в условиях магнитной левитации, а также в условиях микрогравитации, хотя эффект в условиях магнитной левитации был не столь выражен, как в условиях микрогравитации. Между тем, затруднение гликолиза и активация обходного пути метилглиоксаля наблюдались в условиях микрогравитации, однако не в условиях магнитной левитации, что позволяет предположить, что ограничение кислорода было более важным для этих изменений углеводного обмена в условиях космического полета, чем влияние дефицита питательных веществ, магнитной силы или микрогравитации.

В целом полученные результаты показали, что ограничения по кислороду и питательным веществам в условиях космического полета вызывали бактериальный ответ через те же механизмы, которые широко изучались на Земле. Тем не менее, отсутствие конвекционных токов в условиях микрогравитации влияет на этот отклик, а введение магнитной силы еще больше его усиливает. Эти данные могут быть полезны в биотехнологии для более эффективного получения некоторых соединений, таких как сукцинат, который широко используется в химической промышленности, в частности, для синтеза полимеров на основе 1,4-бутандиола, или метилглиоксаль, который используется в онкологии [257].

Данные протеомного анализа продемонстрировали активацию белков Ag43 в культурах, выращенных в условиях микрогравитации и магнитной левитации. Находящийся на поверхности аутотранспортер Ag43 отвечает за автоагрегацию и коагрегацию *E. coli* в статических жидких культурах [162]. Ag43 контролирует аутоагрегацию и морфологию колоний в зависимости от фазы культур и наличия стресса. Было показано, что активация Ag43 способствует автоагрегации клеток посредством прямых контактов Ag43-Ag43 в условиях клеточного стресса, вызванного накоплением в цитоплазме неправильно свернутого белка [258]. Наши результаты показывают, что Ag43 отвечает за автоагрегацию *E. coli* в условиях космического полета.

Магнитная сила, приложенная к бактериям, выращенным в условиях космического полета, не повышала экспрессию Ag43. В земных условиях магнитная сила индуцировала продукцию Ag43 по сравнению с наземным контролем до уровня, наблюдаемого в условиях космического полета. Вероятно, автоагрегация, управляемая Ag43, играет важную роль в метаболических изменениях в условиях микрогравитации и магнитной левитации. В частности, вызванное Ag43 плотное скопление бактерий в автоагрегатах обеспечило живые бактерии пищей в виде фрагментов мертвых бактерий, что объясняет активацию ферментов глиоксилатного шунта и переносчика витамина B12 BtuB, необходимого для утилизации метаболитов из мертвых клеток. Ситуация была иной в 144-часовом контроле, когда мертвые бактерии покрывали дно колбы, а живые плавали вверху. В совокупности полученные данные позволяют предположить, что магнитная левитация может быть полезна для моделирования взаимодействия, происходящего в условиях микрогравитации между бактериями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была апробирована новая модель для изучения бактериальной агрегации, основанная на феномене магнитной левитации. Инкубация бактерий, выращиваемых в питательной среде с добавлением 0,2 М гадобутрола для придания среде парамагнитных свойств и помещенных в неравновесное магнитное поле, приводила к формированию бактериальных автоагрегатов, состоящих из бактериальных клеток и внеклеточного полимерного матрикса, окрашиваемых красителями, разработанными для биопленок и, видимо, сходных по составу с матриксом биопленок. В рамках сравнительного исследования штаммов *E. coli* были обнаружены различия в способности к автоагрегации между штаммами, не коррелирующие со способностью к формированию прикрепленных к субстрату биопленок, что указывает на различия в механизмах, обуславливающих данные процессы. Этот вывод был поддержан получением мутантного штамма со спонтанной мутацией в участке гена *rcsB*, который более эффективно продуцировал поверхностные фимбрии курли при выращивании на агаре и в автоагрегатах и демонстрировал более эффективную автоагрегацию по сравнению с родительским штаммом, однако не отличался от родительского штамма по неспособности к формированию биопленок. С использованием разработанной модели впервые было показано, что автоагрегация энтерогеморрагической *E. coli* серотипа O157:H7 негативно контролируется гетеродимером RcsB/RcsA: точечная замена в гене *rcsB* с цитозина на аденин в позиции 639, приводящая к замене 206-й аминокислоты с серина на фенилаланин, нарушала связывание белка RcsB с белком RcsA, увеличив эффективность автоагрегации, а гиперэкспрессия RcsA, компенсировавшая данную мутацию, приводила к уменьшению эффективности автоагрегации. С помощью разработанной экспериментальной системы и проведенного протеомного анализа были продемонстрированы схожая активация экспрессии поверхностных белков Ag43 и VtuB пробиотического штамма *E. coli* M17, а также активация глиоксилатного шунта при росте бактерий в

условиях магнитной левитации и условиях невесомости в рамках эксперимента на борту МКС по сравнению с ростом в стандартной планктонной культуре. В целом, полученные результаты свидетельствуют, что разработанную модель можно использовать для изучения механизмов феномена автоагрегации бактерий, в том числе, вызванной условиями роста бактерий в космосе.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны оптимальные условия для получения и культивирования бактериальных автоагрегатов в новой экспериментальной системе, основанной на феномене магнитной левитации (магнитном биопринтере), разработаны количественные критерии эффективности автоагрегации, проведено сравнение со стандартными моделями автоагрегации.
2. На штаммах *E. coli* с разными способностями к формированию биопленок показано, что способность образовывать прикрепленные биопленки и способность автоагрегировать могут не коррелировать. Штаммы бактерий, хорошо формирующие биопленки, могут плохо автоагрегировать, а штаммы, не формирующие биопленки, могут эффективно автоагрегировать.
3. Показано, что регулятор транскрипции гетеродимер RcsB/RcsA отрицательно регулирует автоагрегацию патогенных *E. coli* O157:H7.
4. Показано, что при выращивании бактерий *E. coli* M17 в условиях магнитной левитации на Земле и в условиях микрогравитации в космосе сходным образом увеличивается экспрессия поверхностных белков Ag43 и VtuB и изменяется экспрессия ряда белков, участвующих в метаболизме углеводов, что свидетельствует о сходстве физиологических процессов автоагрегации бактерий в этих условиях и возможности использования разработанной экспериментальной системы для моделирования условий невесомости.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АСМ** – атомно-силовая микроскопия
- ГМФ** – гуанозинмонофосфат
- ИПТГ** - Изопропилβ-D-тиогалактозидаза
- КЛСМ** – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- МИК** – минимальная ингибирующая концентрация
- МКС** – международная космическая станция
- ПЦР** – полимеразная цепная реакция
- СЭМ** – сканирующая электронная микроскопия
- АТСС** – Американская коллекция типовых культур
- ВНИ** – среда с сердечно – мозговым экстрактом
- CSP** – белковые частицы, связывающие кумпасси
- Dam** – Дезоксиаденозинметилаза
- FDA** - Управление по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США
- FSC** – сигнал прямого рассеяния
- Har** – белок-аутопорттер *H. Influenzae*
- LB** – среда Лурия-Бертани
- SDS** – додецилсульфат натрия
- SSC** – сигнал бокового рассеяния
- TEP** – прозрачные экзополимерные частицы
- PBS** – раствор фосфатного буфера
- SAAT** – самоассоциирующиеся аутопорттеры

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Høiby N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections // *APMIS*, 2017, Vol. 125, No. 4, P. 272-275.
2. Stewart P.S., William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms // *The Lancet*, 2001, Vol. 358, No. 9276, P. 135-138.
3. Walters M.C., 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 // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, Vol. 47, No. 1, P. 317-323.
4. Alhede M., Kragh K.N., Qvortrup K., Allesen-Holm M., Van Gennip M., Christensen L.D., Jensen P.Ø., Nielsen A.K., Parsek M., Wozniak D., Molin S., Tolker-Nielsen T., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. Phenotypes of Non-Attached *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates Resemble Surface Attached Biofilm // *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, No. 11, P. e27943.
5. Stoodley P., Nistico L., Johnson S., Lasko L.-A., Baratz M., Gahlot V., Ehrlich G.D., Kathju S. Direct Demonstration of Viable *Staphylococcus aureus* Biofilms in an Infected Total Joint Arthroplasty: A Case Report // *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 2008, Vol. 90, Direct Demonstration of Viable *Staphylococcus aureus* Biofilms in an Infected Total Joint Arthroplasty, No. 8, P. 1751-1758.
6. Passow U. Transparent exopolymer particles (TEP) in aquatic environments // *Progress in Oceanography*, 2002, Vol. 55, No. 3-4, P. 287-333.
7. Busch K., Endres S., Iversen M.H., Michels J., Nöthig E.-M., Engel A. Bacterial Colonization and Vertical Distribution of Marine Gel Particles (TEP and CSP) in the Arctic Fram Strait // *Frontiers in Marine Science*, 2017, T. 4, C. 166.
8. Zäncker B., Engel A., Cunliffe M. Bacterial communities associated with individual transparent exopolymer particles (TEP) // *Journal of Plankton Research*, 2019, Vol. 41, No. 4, P. 561-565.

9. Gernaey K.V., Sin G. Wastewater Treatment Models // Encyclopedia of Ecology. — Elsevier, 2008. — P. 3707-3718.
10. Hall C.W., Mah T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria // FEMS Microbiology Reviews, 2017, Vol. 41, No. 3, P. 276-301.
11. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm Formation as Microbial Development // Annual Review of Microbiology, 2000, Vol. 54, No. 1, P. 49-79.
12. Vaccari L., Molaei M., Niepa T.H.R., Lee D., Leheny R.L., Stebe K.J. Films of bacteria at interfaces // Advances in Colloid and Interface Science, 2017, Vol. 247, P. 561-572.
13. Flemming H.-C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life // Nature Reviews Microbiology, 2016, Vol. 14, Biofilms, No. 9, P. 563-575.
14. Gupta P., Sarkar S., Das B., Bhattacharjee S., Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review // Archives of Microbiology, 2016, Vol. 198, Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall, No. 1, P. 1-15.
15. Anderson G.G., O'Toole G.A. Innate and Induced Resistance Mechanisms of Bacterial Biofilms // Bacterial Biofilms : Current Topics in Microbiology and Immunology/ соот. R.W. Compans, M.D. Cooper, T. Honjo, H. Koprowski, F. Melchers, M.B.A. Oldstone, S. Olsnes, P.K. Vogt; ред. T. Romeo. — Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. — Т. 322. — С. 85-105.
16. Sorroche F.G., Spesia M.B., Zorreguieta Á., Giordano W. A Positive Correlation between Bacterial Autoaggregation and Biofilm Formation in Native *Sinorhizobium meliloti* Isolates from Argentina // Applied and Environmental Microbiology, 2012, Vol. 78, No. 12, P. 4092-4101.
17. Kragh K.N., Hutchison J.B., Melaugh G., Rodesney C., Roberts A.E.L., Irie Y., Jensen P.Ø., Diggle S.P., Allen R.J., Gordon V., Bjarnsholt T. Role of

- Multicellular Aggregates in Biofilm Formation // *mBio*, 2016, Vol. 7, No. 2, P. e00237-16.
18. Corno G., Coci M., Giardina M., Plechuk S., Campanile F., Stefani S. Antibiotics promote aggregation within aquatic bacterial communities // *Frontiers in Microbiology*, 2014, T. 5.
 19. Ochiai K., Kurita-Ochiai T., Kamino Y., Ikeda T. Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria // *Journal of Medical Microbiology*, 1993, Vol. 39, No. 3, P. 183-190.
 20. Malik A., Sakamoto M., Hanazaki S., Osawa M., Suzuki T., Tochigi M., Kakii K. Coaggregation among Nonflocculating Bacteria Isolated from Activated Sludge // *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, Vol. 69, No. 10, P. 6056-6063.
 21. Zhou J., Mopper K., Passow U. The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater // *Limnology and Oceanography*, 1998, Vol. 43, No. 8, P. 1860-1871.
 22. Passow U. Production of transparent exopolymer particles (TEP) by phyto- and bacterioplankton // *Marine Ecology Progress Series*, 2002, Vol. 236, P. 1-12.
 23. Engel A. Distribution of transparent exopolymer particles (TEP) in the northeast Atlantic Ocean and their potential significance for aggregation processes // *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2004, Vol. 51, No. 1, P. 83-92.
 24. Cunliffe M., Murrell J.C. The sea-surface microlayer is a gelatinous biofilm // *The ISME Journal*, 2009, Vol. 3, No. 9, P. 1001-1003.
 25. Ortega-Retuerta E., Reche I., Pulido-Villena E., Agustí S., Duarte C.M. Uncoupled distributions of transparent exopolymer particles (TEP) and dissolved carbohydrates in the Southern Ocean // *Marine Chemistry*, 2009, Vol. 115, No. 1-2, P. 59-65.

26. Engel A., Galgani L. The organic sea-surface microlayer in the upwelling region off the coast of Peru and potential implications for air–sea exchange processes // *Biogeosciences*, 2016, Vol. 13, No. 4, P. 989-1007.
27. Mari X., Passow U., Migon C., Burd A.B., Legendre L. Transparent exopolymer particles: Effects on carbon cycling in the ocean // *Progress in Oceanography*, 2017, Vol. 151, Transparent exopolymer particles, P. 13-37.
28. Trunk T., S. Khalil H., C. Leo J., Bacterial Cell Surface Group, Section for Genetics and Evolutionary Biology, Department of Biosciences, University of Oslo, Oslo, Norway Bacterial autoaggregation // *AIMS Microbiology*, 2018, Vol. 4, No. 1, P. 140-164.
29. Farrell A., Quilty B. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, T. 28, № 6, C. 316-324.
30. McLean J.S., Pinchuk G.E., Geydebrekht O.V., Bilskis C.L., Zakrajsek B.A., Hill E.A., Saffarini D.A., Romine M.F., Gorby Y.A., Fredrickson J.K., Beliaev A.S. Oxygen-dependent autoaggregation in *Shewanella oneidensis* MR-1 // *Environmental Microbiology*, 2008, Vol. 10, No. 7, P. 1861-1876.
31. Schembri M.A., Hjerrild L., Gjermansen M., Klemm P. Differential Expression of the *Escherichia coli* Autoaggregation Factor Antigen 43 // *Journal of Bacteriology*, 2003, Vol. 185, No. 7, P. 2236-2242.
32. Skurnik M., Bölin I., Heikkinen H., Piha S., Wolf-Watz H. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp // *Journal of Bacteriology*, 1984, Vol. 158, No. 3, P. 1033-1036.
33. Bossier P., Verstraete W. Triggers for microbial aggregation in activated sludge? // *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, Vol. 45, No. 1-2, P. 1-6.

34. Haaber J., Cohn M.T., Frees D., Andersen T.J., Ingmer H. Planktonic Aggregates of *Staphylococcus aureus* Protect against Common Antibiotics // PLoS ONE, 2012, Vol. 7, No. 7, P. e41075.
35. Tree J.J., Ulett G.C., Hobman J.L., Constantinidou C., Brown N.L., Kershaw C., Schembri M.A., Jennings M.P., McEwan A.G. The multicopper oxidase (CueO) and cell aggregation in *Escherichia coli* // Environmental Microbiology, 2007, Vol. 9, No. 8, P. 2110-2116.
36. Fexby S., Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Roos V., Høiby N., Givskov M., Klemm P. Biological Trojan Horse: Antigen 43 Provides Specific Bacterial Uptake and Survival in Human Neutrophils // Infection and Immunity, 2007, Vol. 75, Biological Trojan Horse, No. 1, P. 30-34.
37. Galdiero F., Carratelli C.R., Nuzzo I., Bentivoglio C., Galdiero M. Phagocytosis of bacterial aggregates by granulocytes // European Journal of Epidemiology, 1988, Vol. 4, No. 4, P. 456-460.
38. Meuskens I., Michalik M., Chauhan N., Linke D., Leo J.C. A New Strain Collection for Improved Expression of Outer Membrane Proteins // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, T. 7, C. 464.
39. Nikel P.I., Martínez-García E., De Lorenzo V. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology // Nature Reviews Microbiology, 2014, Vol. 12, No. 5, P. 368-379.
40. Klebensberger J., Rui O., Fritz E., Schink B., Philipp B. Cell aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 as an energy-dependent stress response during growth with sodium dodecyl sulfate // Archives of Microbiology, 2006, Vol. 185, No. 6, P. 417-427.
41. Klebensberger J., Lautenschlager K., Bressler D., Wingender J., Philipp B. Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy // Environmental Microbiology, 2007, Vol. 9, No. 9, P. 2247-2259.
42. Klebensberger J., Birkenmaier A., Geffers R., Kjelleberg S., Philipp B. SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to

- detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa* // Environmental Microbiology, 2009, Vol. 11, No. 12, P. 3073-3086.
43. Hazelbauer G.L., Falke J.J., Parkinson J.S. Bacterial chemoreceptors: high-performance signaling in networked arrays // Trends in Biochemical Sciences, 2008, Vol. 33, Bacterial chemoreceptors, No. 1, P. 9-19.
44. Aravind L., Ponting C.P. The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins // FEMS Microbiology Letters, 1999, Vol. 176, No. 1, P. 111-116.
45. Hahn M.W., Moore E.R.B., Höfle M.G. Role of Microcolony Formation in the Protistan Grazing Defense of the Aquatic Bacterium *Pseudomonas* sp. MWH1 // Microbial Ecology, 2000, T. 39, № 3, C. 175-185.
46. Blom J.F., Zimmermann Y.S., Ammann T., Pernthaler J. Scent of Danger: Floc Formation by a Freshwater Bacterium Is Induced by Supernatants from a Predator-Prey Coculture // Applied and Environmental Microbiology, 2010, Vol. 76, Scent of Danger, No. 18, P. 6156-6163.
47. Matz C., Bergfeld T., Rice S.A., Kjelleberg S. Microcolonies, quorum sensing and cytotoxicity determine the survival of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to protozoan grazing // Environmental Microbiology, 2004, Vol. 6, No. 3, P. 218-226.
48. Zhou P., Liu J., Merritt J., Qi F. A YadA-like autotransporter, Hag1 in *Veillonella atypica* is a multivalent hemagglutinin involved in adherence to oral streptococci, *Porphyromonas gingivalis*, and human oral buccal cells // Molecular Oral Microbiology, 2015, Vol. 30, No. 4, P. 269-279.
49. Corno G., Villiger J., Pernthaler J. Coaggregation in a microbial predator-prey system affects competition and trophic transfer efficiency // Ecology, 2013, Vol. 94, No. 4, P. 870-881.
50. Long R., Azam F. Abundant protein-containing particles in the sea // Aquatic Microbial Ecology, 1996, Vol. 10, P. 213-221.

51. Thornton D.C.O. Coomassie Stainable Particles (CSP): Protein Containing Exopolymer Particles in the Ocean // *Frontiers in Marine Science*, 2018, T. 5, Coomassie Stainable Particles (CSP), C. 206.
52. Grossart H., Simon M. Significance of limnetic organic aggregates (lake snow) for the sinking flux of particulate organic matter in a large lake // *Aquatic Microbial Ecology*, 1998, Vol. 15, P. 115-125.
53. Grossart H., Simon M. Limnetic macroscopic organic aggregates (lake snow): Occurrence, characteristics, and microbial dynamics in Lake Constance // *Limnology and Oceanography*, 1993, Vol. 38, Limnetic macroscopic organic aggregates (lake snow), No. 3, P. 532-546.
54. Weiss P., Schweitzer B., Amann R., Simon M. Identification in situ and dynamics of bacteria on limnetic organic aggregates (lake snow) // *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, Vol. 62, No. 6, P. 1998-2005.
55. Kirchman D. The production of bacteria attached to particles suspended in a freshwater pond // *Limnology and Oceanography*, 1983, Vol. 28, No. 5, P. 858-872.
56. Alfiansah Y.R., Hassenrück C., Kunzmann A., Taslihan A., Harder J., Gärdes A. Bacterial Abundance and Community Composition in Pond Water From Shrimp Aquaculture Systems With Different Stocking Densities // *Frontiers in Microbiology*, 2018, T. 9, C. 2457.
57. Bockelmann U., Manz W., Neu T.R., Szewzyk U. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods // *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, Vol. 33, No. 2, P. 157-170.
58. Neu T. In situ cell and glycoconjugate distribution in river snow studied by confocal laser scanning microscopy // *Aquatic Microbial Ecology*, 2000, Vol. 21, P. 85-95.
59. Jorand F., Zartarian F., Thomas F., Block J.C., Bottero J.Y., Villemin G., Urbain V., Manem J. Chemical and structural (2D) linkage between bacteria

- within activated sludge flocs // *Water Research*, 1995, Vol. 29, No. 7, P. 1639-1647.
60. Zita A., Hermansson M. Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs // *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, Vol. 63, No. 3, P. 1168-1170.
61. Da Motta M., Pons M.-N., Roche N., Vivier H. Characterisation of activated sludge by automated image analysis // *Biochemical Engineering Journal*, 2001, Vol. 9, No. 3, P. 165-173.
62. Wilén B.-M., Jin B., Lant P. Impacts of structural characteristics on activated sludge floc stability // *Water Research*, 2003, Vol. 37, No. 15, P. 3632-3645.
63. Nielsen P.H., Thomsen T.R., Nielsen J.L. Bacterial composition of activated sludge--importance for floc and sludge properties // *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 2004, T. 49, № 10, C. 51-58.
64. Larsen P., Nielsen J.L., Otzen D., Nielsen P.H. Amyloid-Like Adhesins Produced by Floc-Forming and Filamentous Bacteria in Activated Sludge // *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, Vol. 74, No. 5, P. 1517-1526.
65. Foladori P., Bruni L., Tamburini S., Ziglio G. Direct quantification of bacterial biomass in influent, effluent and activated sludge of wastewater treatment plants by using flow cytometry // *Water Research*, 2010, Vol. 44, No. 13, P. 3807-3818.
66. Urbain V., Block J.C., Manem J. Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach // *Water Research*, 1993, Vol. 27, Bioflocculation in activated sludge, No. 5, P. 829-838.
67. Sanin F.D., Vesilind P.A. Synthetic sludge: A physical/chemical model in understanding bioflocculation // *Water Environment Research*, 1996, Vol. 68, Synthetic sludge, No. 5, P. 927-933.
68. Bitton G. *Wastewater Microbiology*. — 1. — Wiley, 2010.

69. Andreadakis A.D. Physical and chemical properties of activated sludge floc // Water Research, 1993, Vol. 27, No. 12, P. 1707-1714.
70. Snidaro D., Zartarian F., Jorand F., Bottero J.-Y., Block J.-C., Manem J. Characterization of activated sludge flocs structure // Water Science and Technology, 1997, Vol. 36, No. 4, P. 313-320.
71. Wilén B.-M., Balmér P. The effect of dissolved oxygen concentration on the structure, size and size distribution of activated sludge flocs // Water Research, 1999, Vol. 33, No. 2, P. 391-400.
72. Sponza D.T. Extracellular polymer substances and physicochemical properties of flocs in steady and unsteady-state activated sludge systems // Process Biochemistry, 2002, Vol. 37, No. 9, P. 983-998.
73. Jin B., Wilén B.-M., Lant P. A comprehensive insight into floc characteristics and their impact on compressibility and settleability of activated sludge // Chemical Engineering Journal, 2003, Vol. 95, No. 1-3, P. 221-234.
74. Kara F., Gurakan G.C., Sanin F.D. Monovalent cations and their influence on activated sludge floc chemistry, structure, and physical characteristics // Biotechnology and Bioengineering, 2008, Vol. 100, No. 2, P. 231-239.
75. Rosselló-Mora R.A., Wagner M., Amann R., Schleifer K.H. The abundance of *Zoogloea ramigera* in sewage treatment plants // Applied and Environmental Microbiology, 1995, Vol. 61, No. 2, P. 702-707.
76. Shao Y., Chung B.S., Lee S.S., Park W., Lee S.-S., Jeon C.O. *Zoogloea caeni* sp. nov., a floc-forming bacterium isolated from activated sludge // INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, 2009, Vol. 59, No. 3, P. 526-530.
77. Nascimento A.L., Souza A.J., Andrade P.A.M., Andreote F.D., Coscione A.R., Oliveira F.C., Regitano J.B. Sewage Sludge Microbial Structures and Relations to Their Sources, Treatments, and Chemical Attributes // Frontiers in Microbiology, 2018, T. 9, C. 1462.

78. He Q., Zhou J., Wang H., Zhang J., Wei L. Microbial population dynamics during sludge granulation in an A/O/A sequencing batch reactor // *Bioresource Technology*, 2016, Vol. 214, P. 1-8.
79. Zhang T., Shao M.-F., Ye L. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants // *The ISME Journal*, 2012, Vol. 6, No. 6, P. 1137-1147.
80. Rafeeq M.M., Murad H.A.S. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches // *Journal of Translational Medicine*, 2017, Vol. 15, Cystic fibrosis, No. 1, P. 84.
81. Imundo L., Barasch J., Prince A., Al-Awqati Q. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, Vol. 92, No. 7, P. 3019-3023.
82. Hahn H.P. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* – a review // *Gene*, 1997, Vol. 192, No. 1, P. 99-108.
83. De Bentzmann S., Plotkowski C., Puchelle E. Receptors in the *Pseudomonas Aeruginosa* Adherence to Injured and Repairing Airway Epithelium // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 1996, Vol. 154, No. 4_pt_2, P. S155-S162.
84. Campodónico V.L., Gadjeva M., Paradis-Bleau C., Uluer A., Pier G.B. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis // *Trends in Molecular Medicine*, 2008, Vol. 14, No. 3, P. 120-133.
85. Hall-Stoodley L., Stoodley P., Kathju S., Høiby N., Moser C., William Costerton J., Moter A., Bjarnsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, Vol. 65, No. 2, P. 127-145.
86. Garcia-Medina R., Dunne W.M., Singh P.K., Brody S.L. *Pseudomonas aeruginosa* Acquires Biofilm-Like Properties within Airway Epithelial Cells // *Infection and Immunity*, 2005, Vol. 73, No. 12, P. 8298-8305.

87. Hassett D.J., Cuppoletti J., Trapnell B., Lyman S.V., Rowe J.J., Sun Yoon S., Hilliard G.M., Parvatiyar K., Kamani M.C., Wozniak D.J., Hwang S.-H., McDermott T.R., Ochsner U.A. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, Vol. 54, Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways, No. 11, P. 1425-1443.
88. Worlitzsch D., Tarran R., Ulrich M., Schwab U., Cekici A., Meyer K.C., Birrer P., Bellon G., Berger J., Weiss T., Botzenhart K., Yankaskas J.R., Randell S., Boucher R.C., Döring G. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients // *Journal of Clinical Investigation*, 2002, Vol. 109, No. 3, P. 317-325.
89. Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Fiandaca M.J., Pedersen J., Hansen C.R., Andersen C.B., Pressler T., Givskov M., Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients // *Pediatric Pulmonology*, 2009, Vol. 44, No. 6, P. 547-558.
90. Sriramulu D.D. Amino Acids Enhance Adaptive Behaviour of *Pseudomonas Aeruginosa* in the Cystic Fibrosis Lung Environment // *Microbiology Insights*, 2010, Vol. 3, P. MBI.S4694.
91. Williams H.D., Davies J.C. Basic science for the chest physician: *Pseudomonas aeruginosa* and the cystic fibrosis airway: Figure 1 // *Thorax*, 2012, Vol. 67, Basic science for the chest physician, No. 5, P. 465-467.
92. Staudinger B.J., Muller J.F., Halldórsson S., Boles B., Angermeyer A., Nguyen D., Rosen H., Baldursson Ó., Gottfreðsson M., Guðmundsson G.H., Singh P.K. Conditions Associated with the Cystic Fibrosis Defect Promote Chronic *Pseudomonas aeruginosa* Infection // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2014, Vol. 189, No. 7, P. 812-824.
93. Caceres S.M., Malcolm K.C., Taylor-Cousar J.L., Nichols D.P., Saavedra M.T., Bratton D.L., Moskowitz S.M., Burns J.L., Nick J.A. Enhanced *In*

- Vitro* Formation and Antibiotic Resistance of Nonattached *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates through Incorporation of Neutrophil Products // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, Vol. 58, No. 11, P. 6851-6860.
94. Fung C., Naughton S., Turnbull L., Tingpej P., Rose B., Arthur J., Hu H., Harmer C., Harbour C., Hassett D.J., Whitchurch C.B., Manos J. Gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* in a mucin-containing synthetic growth medium mimicking cystic fibrosis lung sputum // *Journal of Medical Microbiology*, 2010, Vol. 59, No. 9, P. 1089-1100.
95. Secor P.R., Michaels L.A., Ratjen A., Jennings L.K., Singh P.K. Entropically driven aggregation of bacteria by host polymers promotes antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, Vol. 115, No. 42, P. 10780-10785.
96. Lee B., Haagensen J.A.J., Ciofu O., Andersen J.B., Høiby N., Molin S. Heterogeneity of Biofilms Formed by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis // *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, Vol. 43, No. 10, P. 5247-5255.
97. Deligianni E., Pattison S., Berrar D., Ternan N.G., Haylock R.W., Moore J.E., Elborn S.J., Dooley J.S. *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro // *BMC Microbiology*, 2010, Vol. 10, No. 1, P. 38.
98. James G.A., Swogger E., Wolcott R., Pulcini E. deLancey, Secor P., Sestrich J., Costerton J.W., Stewart P.S. Biofilms in chronic wounds // *Wound Repair and Regeneration*, 2008, Vol. 16, No. 1, P. 37-44.
99. Pabst B., Pitts B., Lauchnor E., Stewart P.S. Gel-Entrapped *Staphylococcus aureus* Bacteria as Models of Biofilm Infection Exhibit Growth in Dense Aggregates, Oxygen Limitation, Antibiotic Tolerance, and Heterogeneous Gene Expression // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, Vol. 60, No. 10, P. 6294-6301.

100. Alhede M., Er Ö., Eickhardt S., Kragh K., Alhede M., Christensen L.D., Poulsen S.S., Givskov M., Christensen L.H., Høiby N., Tvede M., Bjarnsholt T. Bacterial biofilm formation and treatment in soft tissue fillers // *Pathogens and Disease*, 2014, Vol. 70, No. 3, P. 339-346.
101. Kirketerp-Møller K., Jensen P.Ø., Fazli M., Madsen K.G., Pedersen J., Moser C., Tolker-Nielsen T., Høiby N., Givskov M., Bjarnsholt T. Distribution, Organization, and Ecology of Bacteria in Chronic Wounds // *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, Vol. 46, No. 8, P. 2717-2722.
102. Fazli M., Bjarnsholt T., Kirketerp-Møller K., Jørgensen B., Andersen A.S., Kroghfelt K.A., Givskov M., Tolker-Nielsen T. Nonrandom Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in Chronic Wounds // *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, Vol. 47, No. 12, P. 4084-4089.
103. Watters C., DeLeon K., Trivedi U., Griswold J.A., Lyte M., Hampel K.J., Wargo M.J., Rumbaugh K.P. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice // *Medical Microbiology and Immunology*, 2013, Vol. 202, No. 2, P. 131-141.
104. Morgan S.J., Lippman S.I., Bautista G.E., Harrison J.J., Harding C.L., Gallagher L.A., Cheng A.-C., Siehnel R., Ravishankar S., Usui M.L., Olerud J.E., Fleckman P., Wolcott R.D., Manoil C., Singh P.K. Bacterial fitness in chronic wounds appears to be mediated by the capacity for high-density growth, not virulence or biofilm functions // *PLOS Pathogens*, 2019, Vol. 15, No. 3, P. e1007511.
105. Ensgraber M., Loos M. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus // *Infection and Immunity*, 1992, Vol. 60, No. 8, P. 3072-3078.
106. Bergström J.H., Birchenough G.M.H., Katona G., Schroeder B.O., Schütte A., Ermund A., Johansson M.E.V., Hansson G.C. Gram-positive bacteria are held at a distance in the colon mucus by the lectin-like protein ZG16 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, Vol. 113, No. 48, P. 13833-13838.

107. Rosan B., Appelbaum B., Golub E., Malamud D., Mandel I.D. Enhanced saliva-mediated bacterial aggregation and decreased bacterial adhesion in caries-resistant versus caries-susceptible individuals // *Infection and Immunity*, 1982, Vol. 38, No. 3, P. 1056-1059.
108. Golub E.E., Cheruka J., Boosz B., Davis C., Malamud D. A comparison of bacterial aggregation induced by saliva, lysozyme, and zinc // *Infection and Immunity*, 1985, Vol. 48, No. 1, P. 204-210.
109. Koop H.M., Valentijn-Benz M., Nieuw Amerongen A.V., Roukema P.A., De Graaff J. Aggregation of 27 oral bacteria by human whole saliva: Influence of culture medium, calcium, and bacterial cell concentration, and interference by autoaggregation // *Antonie van Leeuwenhoek*, 1989, Vol. 55, Aggregation of 27 oral bacteria by human whole saliva, No. 3, P. 277-290.
110. Yamaguchi T. Human salivary aggregation in *Streptococcus intermedius* type g strains: relationship with IgA // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2004, Vol. 41, Human salivary aggregation in *Streptococcus intermedius* type g strains, No. 2, P. 101-107.
111. Kitada K., Oho T. Effect of saliva viscosity on the co-aggregation between oral streptococci and *Actinomyces naeslundii* // *Gerodontology*, 2012, Vol. 29, No. 2.
112. Itzek A., Chen Z., Merritt J., Kreth J. Effect of salivary agglutination on oral streptococcal clearance by human polymorphonuclear neutrophil granulocytes // *Molecular Oral Microbiology*, 2017, Vol. 32, No. 3, P. 197-210.
113. Reid G., Bruce A.W., Llano M., McGroarty J.A., Blake M. Bacterial aggregation in sepsis // *Current Microbiology*, 1990, Vol. 20, No. 3, P. 185-190.
114. Rosen D.A., Hooton T.M., Stamm W.E., Humphrey P.A., Hultgren S.J. Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection // *PLoS Medicine*, 2007, Vol. 4, No. 12, P. e329.

115. Robino L., Scavone P., Araujo L., Algorta G., Zunino P., Pérez M.C., Vignoli R. Intracellular Bacteria in the Pathogenesis of Escherichia coli Urinary Tract Infection in Children // *Clinical Infectious Diseases*, 2014, Vol. 59, No. 11, P. e158-e164.
116. Conover M.S., Hadjifrangiskou M., Palermo J.J., Hibbing M.E., Dodson K.W., Hultgren S.J. Metabolic Requirements of Escherichia coli in Intracellular Bacterial Communities during Urinary Tract Infection Pathogenesis // *mBio*, 2016, Vol. 7, No. 2, P. e00104-16.
117. Mulvey M.A., Schilling J.D., Hultgren S.J. Establishment of a Persistent *Escherichia coli* Reservoir during the Acute Phase of a Bladder Infection // *Infection and Immunity*, 2001, Vol. 69, No. 7, P. 4572-4579.
118. Justice S.S., Hung C., Theriot J.A., Fletcher D.A., Anderson G.G., Footer M.J., Hultgren S.J. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, Vol. 101, No. 5, P. 1333-1338.
119. Misawa N., Blaser M.J. Detection and Characterization of Autoagglutination Activity by *Campylobacter jejuni* // *Infection and Immunity*, 2000, Vol. 68, No. 11, P. 6168-6175.
120. Jonsson P., Wadström T. Cell surface hydrophobicity of *Staphylococcus aureus* measured by the salt aggregation test (SAT) // *Current Microbiology*, 1984, Vol. 10, No. 4, P. 203-209.
121. Martinez R.J. Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica* // *Infection and Immunity*, 1983, Vol. 41, No. 3, P. 921-930.
122. Arenas J., Nijland R., Rodriguez F.J., Bosma T.N.P., Tommassen J. 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 // *Molecular Microbiology*, 2013, Vol. 87, Involvement of three meningococcal surface-exposed

- proteins, the heparin-binding protein <span style="font-variant, No. 2, P. 254-268.
123. Eboigbodin K.E., Newton J.R.A., Routh A.F., Biggs C.A. Role of Nonadsorbing Polymers in Bacterial Aggregation // *Langmuir*, 2005, Vol. 21, No. 26, P. 12315-12319.
 124. Girón J.A., Ho A.S.Y., Schoolnik G.K. An Inducible Bundle-Forming Pilus of Enteropathogenic *Escherichia coli* // *Science*, 1991, Vol. 254, No. 5032, P. 710-713.
 125. Saldaña Z., Erdem A.L., Schüller S., Okeke I.N., Lucas M., Sivananthan A., Phillips A.D., Kaper J.B., Puente J.L., Girón J.A. The *Escherichia coli* Common Pilus and the Bundle-Forming Pilus Act in Concert during the Formation of Localized Adherence by Enteropathogenic *E. coli* // *Journal of Bacteriology*, 2009, Vol. 191, No. 11, P. 3451-3461.
 126. Hebbelstrup Jensen B., Olsen K.E.P., Struve C., Kroghfelt K.A., Petersen A.M. Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli* // *Clinical Microbiology Reviews*, 2014, Vol. 27, No. 3, P. 614-630.
 127. Jafari A., Aslani M.M., Bouzari S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran // *Iranian Journal of Microbiology*, 2012, T. 4, *Escherichia coli*, № 3, C. 102-117.
 128. Jønsson R., Struve C., Boisen N., Mateiu R.V., Santiago A.E., Jenssen H., Nataro J.P., Kroghfelt K.A. Novel Aggregative Adherence Fimbria Variant of Enteroaggregative *Escherichia coli* // *Infection and Immunity*, 2015, Vol. 83, No. 4, P. 1396-1405.
 129. Lang C., Fruth A., Holland G., Laue M., Mühlen S., Dersch P., Flieger A. Novel type of pilus associated with a Shiga-toxigenic *E. coli* hybrid pathovar conveys aggregative adherence and bacterial virulence // *Emerging Microbes & Infections*, 2018, Vol. 7, No. 1, P. 1-16.
 130. Blake M.S., MacDonald C.M., Klugman K.P. Colony morphology of piliated *Neisseria meningitidis*. // *The Journal of experimental medicine*, 1989, Vol. 170, No. 5, P. 1727-1736.

131. Kennouche P., Charles-Orszag A., Nishiguchi D., Goussard S., Imhaus A., Dupré M., Chamot-Rooke J., Duménil G. Deep mutational scanning of the *Neisseria meningitidis* major pilin reveals the importance of pilus tip-mediated adhesion // *The EMBO Journal*, 2019, Vol. 38, No. 22, P. e102145.
132. Adams David.W., Stutzmann S., Stoudmann C., Blokesch M. DNA-uptake pili of *Vibrio cholerae* are required for chitin colonization and capable of kin recognition via sequence-specific self-interaction // *Nature Microbiology*, 2019, Vol. 4, No. 9, P. 1545-1557.
133. Cohen N., Zhou H., Hay A.G., Radian A. Curli production enhances clay-*E. coli* aggregation and sedimentation // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2019, Vol. 182, P. 110361.
134. Liu Y.L., He T.T., Liu L.Y., Yi J., Nie P., Yu H.B., Xie H.X. The *Edwardsiella piscicida* Type III Translocon Protein EseC Inhibits Biofilm Formation by Sequestering EseE // *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, Vol. 85, No. 8, P. e02133-18.
135. Pu M., Rowe-Magnus D.A. A Tad pilus promotes the establishment and resistance of *Vibrio vulnificus* biofilms to mechanical clearance // *npj Biofilms and Microbiomes*, 2018, Vol. 4, No. 1, P. 10.
136. Béchon N., Jiménez-Fernández A., Witwinowski J., Bierque E., Taib N., Cokelaer T., Ma L., Ghigo J.-M., Gribaldo S., Beloin C. Autotransporters Drive Biofilm Formation and Autoaggregation in the Diderm Firmicute *Veillonella parvula* // *Journal of Bacteriology*, 2020, Vol. 202, No. 21.
137. Habouria H., Pokharel P., Maris S., Garénaux A., Bessaiah H., Houle S., Veyrier F.J., Guyomard-Rabenirina S., Talarmin A., Dozois C.M. Three new serine-protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney // *Virulence*, 2019, Vol. 10, No. 1, P. 568-587.

138. Ageorges V., Schiavone M., Jubelin G., Caccia N., Ruiz P., Chafsey I., Bailly X., Dague E., Leroy S., Paxman J., Heras B., Chaucheyras-Durand F., Rossiter A.E., Henderson I.R., Desvaux M. Differential homotypic and heterotypic interactions of antigen 43 (Ag43) variants in autotransporter-mediated bacterial autoaggregation // *Scientific Reports*, 2019, Vol. 9, No. 1, P. 11100.
139. Khalil H.S., Øgaard J., Leo J.C. Coaggregation properties of trimeric autotransporter adhesins // *MicrobiologyOpen*, 2020, Vol. 9, No. 10, P. e1109.
140. Bhargava S., Johnson B.B., Hwang J., Harris T.A., George A.S., Muir A., Dorff J., Okeke I.N. Heat-Resistant Agglutinin 1 Is an Accessory Enteroaggregative *Escherichia coli* Colonization Factor // *Journal of Bacteriology*, 2009, Vol. 191, No. 15, P. 4934-4942.
141. Fagan R.P., Lambert M.A., Smith S.G.J. The Hek Outer Membrane Protein of *Escherichia coli* Strain RS218 Binds to Proteoglycan and Utilizes a Single Extracellular Loop for Adherence, Invasion, and Autoaggregation // *Infection and Immunity*, 2008, Vol. 76, No. 3, P. 1135-1142.
142. Glaubman J., Hofmann J., Bonney M.E., Park S., Thomas J.M., Kokona B., Ramos Falcón L.I., Chung Y.K., Fairman R., Okeke I.N. Self-association motifs in the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-resistant agglutinin 1 // *Microbiology*, 2016, Vol. 162, No. 7, P. 1091-1102.
143. Nwoko E.Q.A., Okeke I.N. Bacteria autoaggregation: how and why bacteria stick together // *Biochemical Society Transactions*, 2021, Vol. 49, Bacteria autoaggregation, No. 3, P. 1147-1157.
144. Heras B., Totsika M., Peters K.M., Paxman J.J., Gee C.L., Jarrott R.J., Perugini M.A., Whitten A.E., Schembri M.A. The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, Vol. 111, No. 1, P. 457-462.

145. Meng G., Spahich N., Kenjale R., Waksman G., St Geme J.W. Crystal structure of the *Haemophilus influenzae* Hap adhesin reveals an intercellular oligomerization mechanism for bacterial aggregation: Structural framework for bacterial aggregation // *The EMBO Journal*, 2011, Vol. 30, Crystal structure of the *Haemophilus influenzae* Hap adhesin reveals an intercellular oligomerization mechanism for bacterial aggregation, No. 18, P. 3864-3874.
146. Li D., Liang X., Wu C. Characteristics of Nitrogen Removal and Extracellular Polymeric Substances of a Novel Salt-Tolerant Denitrifying Bacterium, *Pseudomonas* sp. DN-23 // *Frontiers in Microbiology*, 2020, T. 11, C. 335.
147. Miljkovic M., Marinkovic P., Novovic K., Jovicic B., Terzic-Vidojevic A., Kojic M. AggLr, a novel aggregation factor in *Lactococcus raffinolactis* BGTRK10-1: its role in surface adhesion // *Biofouling*, 2018, Vol. 34, AggLr, a novel aggregation factor in *Lactococcus raffinolactis* BGTRK10-1, No. 6, P. 685-698.
148. Dong Y., Li S., Zhao D., Liu J., Ma S., Geng J., Lu C., Liu Y. IolR, a negative regulator of the myo-inositol metabolic pathway, inhibits cell autoaggregation and biofilm formation by downregulating RpmA in *Aeromonas hydrophila* // *npj Biofilms and Microbiomes*, 2020, Vol. 6, No. 1, P. 22.
149. Couvigny B., Kulakauskas S., Pons N., Quinquis B., Abraham A.-L., Meylheuc T., Delorme C., Renault P., Briandet R., Lapaque N., Guédon E. Identification of New Factors Modulating Adhesion Abilities of the Pioneer Commensal Bacterium *Streptococcus salivarius* // *Frontiers in Microbiology*, 2018, T. 9, C. 273.
150. Selvaraj A., Jayasree T., Valliammai A., Pandian S.K. Myrtenol Attenuates MRSA Biofilm and Virulence by Suppressing sarA Expression Dynamism // *Frontiers in Microbiology*, 2019, T. 10, C. 2027.
151. Wang Y., Lam A.T.W. Epigallocatechin gallate and gallic acid affect colonization of abiotic surfaces by oral bacteria // *Archives of Oral Biology*, 2020, Vol. 120, P. 104922.

152. Zhang H., Wang Q., Liu H., Kong B., Chen Q. *In vitro* growth performance, antioxidant activity and cell surface physiological characteristics of *Pediococcus pentosaceus* R1 and *Lactobacillus fermentum* R6 stressed at different NaCl concentrations // *Food & Function*, 2020, Vol. 11, No. 7, P. 6376-6386.
153. Blanton L.V., Wang L.T., Hofmann J., DuBow J., Lafrance A., Kwak S., Bowers L., Levine M.A., Hale C.O., Meneely P.M., Okeke I.N. Aggregative Adherence and Intestinal Colonization by Enteroaggregative *Escherichia coli* Are Produced by Interactions among Multiple Surface Factors // *mSphere*, 2018, Vol. 3, No. 2, P. e00078-18.
154. Hanna A., Berg M., Stout V., Razatos A. Role of Capsular Colanic Acid in Adhesion of Uropathogenic *Escherichia coli* // *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, Vol. 69, No. 8, P. 4474-4481.
155. Spacova I., O'Neill C., Lebeer S. *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG inhibits infection of human keratinocytes by *Staphylococcus aureus* through mechanisms involving cell surface molecules and pH reduction // *Beneficial Microbes*, 2020, Vol. 11, No. 7, P. 703-715.
156. Sorroche F., Bogino P., Russo D.M., Zorreguieta A., Nievas F., Morales G.M., Hirsch A.M., Giordano W. Cell Autoaggregation, Biofilm Formation, and Plant Attachment in a *Sinorhizobium meliloti lpsB* Mutant // *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 2018, Vol. 31, No. 10, P. 1075-1082.
157. Petruzzi B., Dickerman A., Lahmers K., Scarratt W.K., Inzana T.J. Polymicrobial Biofilm Interaction Between *Histophilus somni* and *Pasteurella multocida* // *Frontiers in Microbiology*, 2020, T. 11, C. 1561.
158. Schembri M.A., Dalsgaard D., Klemm P. Capsule Shields the Function of Short Bacterial Adhesins // *Journal of Bacteriology*, 2004, Vol. 186, No. 5, P. 1249-1257.
159. Kharadi R.R., Sundin G.W. Physiological and Microscopic Characterization of Cyclic-di-GMP-Mediated Autoaggregation in *Erwinia amylovora* // *Frontiers in Microbiology*, 2019, T. 10, C. 468.

160. Chen H.-H., Chang C.-C., Yuan Y.-H., Liaw S.-J. A CpxR-Regulated *zapD* Gene Involved in Biofilm Formation of Uropathogenic *Proteus mirabilis* // *Infection and Immunity*, 2020, Vol. 88, No. 7, P. e00207-20.
161. Shetty D., Abrahante J., Chekabab S., Wu X., Korber D., Vidovic S. Role of CpxR in Biofilm Development: Expression of Key Fimbrial, O-Antigen and Virulence Operons of *Salmonella Enteritidis* // *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, Vol. 20, Role of CpxR in Biofilm Development, No. 20, P. 5146.
162. Henderson I.R., Meehan M., Owen P. Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12 // *FEMS Microbiology Letters*, 2006, Vol. 149, No. 1, P. 115-120.
163. Henderson I.R., Owen P. The Major Phase-Variable Outer Membrane Protein of *Escherichia coli* Structurally Resembles the Immunoglobulin A1 Protease Class of Exported Protein and Is Regulated by a Novel Mechanism Involving Dam and OxyR // *Journal of Bacteriology*, 1999, Vol. 181, No. 7, P. 2132-2141.
164. De Luna M.D.G., Scott-Tucker A., Desvaux M., Ferguson P., Morin N.P., Dudley E.G., Turner S., Nataro J.P., Owen P., Henderson I.R. The *Escherichia coli* biofilm-promoting protein Antigen 43 does not contribute to intestinal colonization // *FEMS Microbiology Letters*, 2008, Vol. 284, No. 2, P. 237-246.
165. Murphy T.F., Brauer A.L., Pettigrew M.M., LaFontaine E.R., Tettelin H. Persistence of *Moraxella catarrhalis* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Regulation of the Hag/MID Adhesin // *The Journal of Infectious Diseases*, 2019, Vol. 219, No. 9, P. 1448-1455.
166. Fink D.L., St. Geme J.W. Chromosomal Expression of the *Haemophilus influenzae* Hap Autotransporter Allows Fine-Tuned Regulation of Adhesive Potential via Inhibition of Intermolecular Autoproteolysis // *Journal of Bacteriology*, 2003, Vol. 185, No. 5, P. 1608-1615.

167. Chamot-Rooke J., Mikaty G., Malosse C., Soyer M., Dumont A., Gault J., Imhaus A.-F., Martin P., Trellet M., Clary G., Chafey P., Camoin L., Nilges M., Nassif X., Duménil G. Posttranslational Modification of Pili upon Cell Contact Triggers *N. meningitidis* Dissemination // *Science*, 2011, Vol. 331, No. 6018, P. 778-782.
168. Sheikh J., Czeczulin J.R., Harrington S., Hicks S., Henderson I.R., Le Bouguéne C., Gounon P., Phillips A., Nataro J.P. A novel dispersin protein in enteroaggregative *Escherichia coli* // *Journal of Clinical Investigation*, 2002, Vol. 110, No. 9, P. 1329-1337.
169. Velarde J.J., Varney K.M., Inman K.G., Farfan M., Dudley E., Fletcher J., Weber D.J., Nataro J.P. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli* // *Molecular Microbiology*, 2007, Vol. 66, No. 5, P. 1123-1135.
170. Nishi J., Sheikh J., Mizuguchi K., Luisi B., Burland V., Boutin A., Rose D.J., Blattner F.R., Nataro J.P. The Export of Coat Protein from Enteroaggregative *Escherichia coli* by a Specific ATP-binding Cassette Transporter System // *Journal of Biological Chemistry*, 2003, Vol. 278, No. 46, P. 45680-45689.
171. Pearson M.M., Lafontaine E.R., Wagner N.J., St. Geme J.W., Hansen E.J. A *hag* Mutant of *Moraxella catarrhalis* Strain O35E Is Deficient in Hemagglutination, Autoagglutination, and Immunoglobulin D-Binding Activities // *Infection and Immunity*, 2002, Vol. 70, No. 8, P. 4523-4533.
172. Demirdjian S., Sanchez H., Hopkins D., Berwin B. Motility-Independent Formation of Antibiotic-Tolerant *Pseudomonas aeruginosa* Aggregates // *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, Vol. 85, No. 14, P. e00844-19.
173. Nickerson C.A., Ott C.M., Wilson J.W., Ramamurthy R., Pierson D.L. Microbial Responses to Microgravity and Other Low-Shear Environments // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, Vol. 68, No. 2, P. 345-361.

174. Higginson E.E., Galen J.E., Levine M.M., Tennant S.M. Microgravity as a biological tool to examine host–pathogen interactions and to guide development of therapeutics and preventatives that target pathogenic bacteria // *Pathogens and Disease*, 2016, Vol. 74, No. 8, P. ftw095.
175. Senatore G., Mastroleo F., Leys N., Mauriello G. Effect of microgravity & space radiation on microbes // *Future Microbiology*, 2018, Vol. 13, No. 7, P. 831-847.
176. Huang B., Li D.-G., Huang Y., Liu C.-T. Effects of spaceflight and simulated microgravity on microbial growth and secondary metabolism // *Military Medical Research*, 2018, Vol. 5, No. 1, P. 18.
177. Bijlani S., Stephens E., Singh N.K., Venkateswaran K., Wang C.C.C. Advances in space microbiology // *iScience*, 2021, Vol. 24, No. 5, P. 102395.
178. Klimarev S.I., Il'in V.K., Starkova L.V. [Choice of a method and a type of device for water decontamination and warming within physical-chemical life support systems] // *Aviakosmicheskaja I Ekologicheskaja Meditsina = Aerospace and Environmental Medicine*, 2008, T. 42, № 4, C. 3-14.
179. Horneck G., Klaus D.M., Mancinelli R.L. Space Microbiology // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, Vol. 74, No. 1, P. 121-156.
180. Zea L., Larsen M., Estante F., Qvortrup K., Moeller R., Dias De Oliveira S., Stodieck L., Klaus D. Phenotypic Changes Exhibited by *E. coli* Cultured in Space // *Frontiers in Microbiology*, 2017, T. 8, C. 1598.
181. Crabbé A., Nielsen-Preiss S.M., Woolley C.M., Barrila J., Buchanan K., McCracken J., Inglis D.O., Searles S.C., Nelman-Gonzalez M.A., Ott C.M., Wilson J.W., Pierson D.L., Stefanyshyn-Piper H.M., Hyman L.E., Nickerson C.A. Spaceflight Enhances Cell Aggregation and Random Budding in *Candida albicans* // *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, No. 12, P. e80677.

182. Gasset G., Tixador R., Eche B., Lapchine L., Moatti N., Toorop P., Woldringh C. Growth and division of *Escherichia coli* under microgravity conditions // *Research in Microbiology*, 1994, Vol. 145, No. 2, P. 111-120.
183. Fajardo-Cavazos P., Leehan J.D., Nicholson W.L. Alterations in the Spectrum of Spontaneous Rifampicin-Resistance Mutations in the *Bacillus subtilis* *rpoB* Gene after Cultivation in the Human Spaceflight Environment // *Frontiers in Microbiology*, 2018, T. 9, C. 192.
184. Tirumalai M.R., Karouia F., Tran Q., Stepanov V.G., Bruce R.J., Ott C.M., Pierson D.L., Fox G.E. Evaluation of Acquired Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Exposed to Long-Term Low-Shear Modeled Microgravity and Background Antibiotic Exposure // *mBio*, 2019, Vol. 10, No. 1, P. e02637-18.
185. Taylor P. Impact of space flight on bacterial virulence and antibiotic susceptibility // *Infection and Drug Resistance*, 2015, P. 249.
186. Li J., Liu F., Wang Q., Ge P., Woo P.C.Y., Yan J., Zhao Y., Gao G.F., Liu C.H., Liu C. Genomic and transcriptomic analysis of NDM-1 *Klebsiella pneumoniae* in spaceflight reveal mechanisms underlying environmental adaptability // *Scientific Reports*, 2014, Vol. 4, No. 1, P. 6216.
187. Vukanti R., Model M.A., Leff L.G. Effect of modeled reduced gravity conditions on bacterial morphology and physiology // *BMC Microbiology*, 2012, Vol. 12, No. 1, P. 4.
188. Wilson J.W., Ott C.M., Zu Bentrup K.H., Ramamurthy R., Quick L., Porwollik S., Cheng P., McClelland M., Tsaprailis G., Radabaugh T., Hunt A., Fernandez D., Richter E., Shah M., Kilcoyne M., Joshi L., Nelman-Gonzalez M., Hing S., Parra M., Dumars P., Norwood K., Bober R., Devich J., Ruggles A., Goulart C., Rupert M., Stodieck L., Stafford P., Catella L., Schurr M.J., Buchanan K., Morici L., McCracken J., Allen P., Baker-Coleman C., Hammond T., Vogel J., Nelson R., Pierson D.L., Stefanyshyn-Piper H.M., Nickerson C.A. Space flight alters bacterial gene expression and

- virulence and reveals a role for global regulator Hfq // Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, Vol. 104, No. 41, P. 16299-16304.
189. Yim J., Cho S.W., Kim B., Park S., Han Y.H., Seo S.W. Transcriptional Profiling of the Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 Strain under Simulated Microgravity // International Journal of Molecular Sciences, 2020, Vol. 21, No. 8, P. 2666.
 190. Domnin P.A., Parfenov V.A., Kononikhin A.S., Petrov S.V., Shevlyagina N.V., Arkhipova A.Yu., Koudan E.V., Nezhurina E.K., Brzhozovskiy A.G., Bugrova A.E., Moysenovich A.M., Levin A.A., Karalkin P.A., Pereira F.D.A.S., Zhukhovitsky V.G., Lobakova E.S., Mironov V.A., Nikolaev E.N., Khesuani Y.D., Ermolaeva S.A. Combined Impact of Magnetic Force and Spaceflight Conditions on Escherichia coli Physiology // International Journal of Molecular Sciences, 2022, Vol. 23, No. 3, P. 1837.
 191. Arunasri K., Adil M., Venu Charan K., Suvro C., Himabindu Reddy S., Shivaji S. Effect of Simulated Microgravity on E. coli K12 MG1655 Growth and Gene Expression // PLoS ONE, 2013, Vol. 8, No. 3, P. e57860.
 192. Morrison M.D., Fajardo-Cavazos P., Nicholson W.L. Comparison of Bacillus subtilis transcriptome profiles from two separate missions to the International Space Station // npj Microgravity, 2019, Vol. 5, No. 1, P. 1.
 193. Tixador R., Richoilley G., Gasset G., Planel H., Moatti N., Lapchine L., Enjalbert L., Raffin J., Bost R., Zaloguev S.N., Bragina M.P., Moroz A.F., Antsiferova N.G., Kirilova F.M. Preliminary results of cytos 2 experiment // Acta Astronautica, 1985, Vol. 12, No. 2, P. 131-134.
 194. Sharma G., Curtis P.D. The Impacts of Microgravity on Bacterial Metabolism // Life, 2022, Vol. 12, No. 6, P. 774.
 195. Brown R.B., Klaus D., Todd P. Effects of space flight, clinorotation, and centrifugation on the substrate utilization efficiency of E. coli // Microgravity Science and Technology, 2002, Vol. 13, No. 4, P. 24-29.
 196. Herranz R., Anken R., Boonstra J., Braun M., Christianen P.C.M., De Geest M., Hauslage J., Hilbig R., Hill R.J.A., Lebert M., Medina F.J., Vagt N.,

- Ullrich O., Van Loon J.J.W.A., Hemmersbach R. Ground-Based Facilities for Simulation of Microgravity: Organism-Specific Recommendations for Their Use, and Recommended Terminology // *Astrobiology*, 2013, Vol. 13, Ground-Based Facilities for Simulation of Microgravity, No. 1, P. 1-17.
197. Kiss J.Z., Wolverton C., Wyatt S.E., Hasenstein K.H., Van Loon J.J.W.A. Comparison of Microgravity Analogs to Spaceflight in Studies of Plant Growth and Development // *Frontiers in Plant Science*, 2019, T. 10, C. 1577.
198. Valles J.M., Maris H.J., Seidel G.M., Tang J., Yao W. Magnetic levitation-based Martian and Lunar gravity simulator // *Advances in Space Research*, 2005, Vol. 36, No. 1, P. 114-118.
199. Berry M.V., Geim A.K. Of flying frogs and levitrons // *European Journal of Physics*, 1997, T. 18, № 4, C. 307-313.
200. Ashkarran A.A., Mahmoudi M. Magnetic Levitation Systems for Disease Diagnostics // *Trends in Biotechnology*, 2021, Vol. 39, No. 3, P. 311-321.
201. Brooks J.S., Reavis J.A., Medwood R.A., Stalcup T.F., Meisel M.W., Steinberg E., Arnowitz L., Stover C.C., Perenboom J.A.A.J. New opportunities in science, materials, and biological systems in the low-gravity (magnetic levitation) environment (invited) // *Journal of Applied Physics*, 2000, Vol. 87, No. 9, P. 6194-6199.
202. Panina L.V., Gurevich A., Beklemisheva A., Omelyanchik A., Levada K., Rodionova V. Spatial Manipulation of Particles and Cells at Micro- and Nanoscale via Magnetic Forces // *Cells*, 2022, Vol. 11, No. 6, P. 950.
203. Khalil I.S.M., Klingner A., Misra S. Theory of electromagnetics // *Mathematical Modeling of Swimming Soft Microrobots*. — Elsevier, 2021. — P. 43-59.
204. Gaeta M., Cavallaro M., Vinci S.L., Mormina E., Blandino A., Marino M.A., Granata F., Tessitore A., Galletta K., D'Angelo T., Visalli C. Magnetism of materials: theory and practice in magnetic resonance imaging // *Insights into Imaging*, 2021, Vol. 12, Magnetism of materials, No. 1, P. 179.

205. Yamato M., Kimura T. Magnetic Processing of Diamagnetic Materials // *Polymers*, 2020, Vol. 12, No. 7, P. 1491.
206. Guevorkian K., Valles J.M. Swimming *Paramecium* in magnetically simulated enhanced, reduced, and inverted gravity environments // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, Vol. 103, No. 35, P. 13051-13056.
207. Barber-Zucker S., Zarivach R. A Look into the Biochemistry of Magnetosome Biosynthesis in Magnetotactic Bacteria // *ACS Chemical Biology*, 2017, Vol. 12, No. 1, P. 13-22.
208. Goswami P., He K., Li J., Pan Y., Roberts A.P., Lin W. Magnetotactic bacteria and magnetofossils: ecology, evolution and environmental implications // *npj Biofilms and Microbiomes*, 2022, Vol. 8, Magnetotactic bacteria and magnetofossils, No. 1, P. 43.
209. Meister M. Physical limits to magnetogenetics // *eLife*, 2016, Vol. 5, P. e17210.
210. Schenck J.F. Physical interactions of static magnetic fields with living tissues // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2005, Vol. 87, No. 2-3, P. 185-204.
211. Letuta U.G., Avdeeva E.I. Magnetic-dependent ATP pool in *Escherichia coli* // *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2017, Vol. 474, No. 1, P. 196-199.
212. Letuta U.G., Berdinskiy V.L. Biological effects of static magnetic fields and zinc isotopes on *E. coli* bacteria // *Bioelectromagnetics*, 2019, Vol. 40, No. 1, P. 62-73.
213. Dijkstra C.E., Larkin O.J., Anthony P., Davey M.R., Eaves L., Rees C.E.D., Hill R.J.A. Diamagnetic levitation enhances growth of liquid bacterial cultures by increasing oxygen availability // *Journal of The Royal Society Interface*, 2011, Vol. 8, No. 56, P. 334-344.
214. Valles J.M., Lin K., Denegre J.M., Mowry K.L. Stable magnetic field gradient levitation of *Xenopus laevis*: toward low-gravity simulation // *Biophysical*

- Journal, 1997, Vol. 73, Stable magnetic field gradient levitation of *Xenopus laevis*, No. 2, P. 1130-1133.
215. Ermolaeva S.A., Parfenov V.A., Karalkin P.A., Khesuani Y.D., Domnin P.A. Experimentally Created Magnetic Force in Microbiological Space and On-Earth Studies: Perspectives and Restrictions // *Cells*, 2023, Vol. 12, Experimentally Created Magnetic Force in Microbiological Space and On-Earth Studies, No. 2, P. 338.
216. Manzano A.I., Van Loon J.J., Christianen P.C., Gonzalez-Rubio J.M., Medina F.J., Herranz R. Gravitational and magnetic field variations synergize to cause subtle variations in the global transcriptional state of *Arabidopsis* in vitro callus cultures // *BMC Genomics*, 2012, Vol. 13, No. 1, P. 105.
217. Sanavandi H., Guo W. A magnetic levitation based low-gravity simulator with an unprecedented large functional volume // *npj Microgravity*, 2021, Vol. 7, No. 1, P. 40.
218. Tsuchiya K., Nakamura K., Okuno K., Ano T., Shoda M. Effect of homogeneous and inhomogeneous high magnetic fields on the growth of *Escherichia coli* // *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, Vol. 81, No. 4, P. 343-346.
219. Tsuchiya K., Okuno K., Ano T., Tanaka K., Takahashi H., Shoda M. High magnetic field enhances stationary phase-specific transcription activity of *Escherichia coli* // *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 1999, Vol. 48, No. 2, P. 383-387.
220. Liu M., Gao H., Shang P., Zhou X., Ashforth E., Zhuo Y., Chen D., Ren B., Liu Z., Zhang L. Magnetic Field Is the Dominant Factor to Induce the Response of *Streptomyces avermitilis* in Altered Gravity Simulated by Diamagnetic Levitation // *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, No. 10, P. e24697.
221. Zablotskii V., Polyakova T., Lunov O., Dejneka A. How a High-Gradient Magnetic Field Could Affect Cell Life // *Scientific Reports*, 2016, Vol. 6, No. 1, P. 37407.

222. Domnin P., Arkhipova A., Petrov S., Sysolyatina E., Parfenov V., Karalkin P., Mukhachev A., Gusarov A., Moisenovich M., Khesuani Y., Ermolaeva S. An *In Vitro* Model of Nonattached Biofilm-Like Bacterial Aggregates Based on Magnetic Levitation // *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, Vol. 86, No. 18, P. e01074-20.
223. Wang S., Zhang N., Di J., Zhao W., Shi G., Xie R., Hu B., Yang H. Analysis of the effects of magnetic levitation to simulate microgravity environment on the Arp2/3 complex pathway in macrophage // *Journal of Biological Physics*, 2021, Vol. 47, No. 3, P. 323-335.
224. Lee K., Go G., Yoo A., Kang B., Choi E., Park J.-O., Kim C.-S. Wearable Fixation Device for a Magnetically Controllable Therapeutic Agent Carrier: Application to Cartilage Repair // *Pharmaceutics*, 2020, Vol. 12, Wearable Fixation Device for a Magnetically Controllable Therapeutic Agent Carrier, No. 6, P. 593.
225. Mirica K.A., Ilievski F., Ellerbee A.K., Shevkoplyas S.S., Whitesides G.M. Using Magnetic Levitation for Three Dimensional Self-Assembly // *Advanced Materials*, 2011, Vol. 23, No. 36, P. 4134-4140.
226. Subramaniam A.B., Yang D., Yu H.-D., Nemiroski A., Tricard S., Ellerbee A.K., Soh S., Whitesides G.M. Noncontact orientation of objects in three-dimensional space using magnetic levitation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, Vol. 111, No. 36, P. 12980-12985.
227. Durmus N.G., Tekin H.C., Guven S., Sridhar K., Arslan Yildiz A., Calibasi G., Ghiran I., Davis R.W., Steinmetz L.M., Demirci U. Magnetic levitation of single cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, Vol. 112, No. 28.
228. Parfenov V.A., Koudan E.V., Bulanova E.A., Karalkin P.A., Das Pereira F., Norkin N.E., Knyazeva A.D., Gryadunova A.A., Petrov O.F., Vasiliev M.M., Myasnikov M.I., Chernikov V.P., Kasyanov V.A., Marchenkov A.Y., Brakke K., Khesuani Y.D., Demirci U., Mironov V.A. Scaffold-free, label-free and

- nozzle-free biofabrication technology using magnetic levitational assembly // *Biofabrication*, 2018, T. 10, № 3, C. 034104.
229. Do Q.N., Lenkinski R.E., Tircso G., Kovacs Z. How the Chemical Properties of GBCAs Influence Their Safety Profiles In Vivo // *Molecules*, 2021, Vol. 27, No. 1, P. 58.
230. Anderhalten L., Silva R.V., Morr A., Wang S., Smorodchenko A., Saatz J., Traub H., Mueller S., Boehm-Sturm P., Rodriguez-Sillke Y., Kunkel D., Hahndorf J., Paul F., Taupitz M., Sack I., Infante-Duarte C. Different Impact of Gadopentetate and Gadobutrol on Inflammation-Promoted Retention and Toxicity of Gadolinium Within the Mouse Brain // *Investigative Radiology*, 2022, Vol. 57, No. 10, P. 677-688.
231. Erdoğan M.A., Apaydin M., Armagan G., Taskiran D. Evaluation of toxicity of gadolinium-based contrast agents on neuronal cells // *Acta Radiologica*, 2021, Vol. 62, No. 2, P. 206-214.
232. Tisa L.S., Adler J. Calcium ions are involved in *Escherichia coli* chemotaxis. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, Vol. 89, No. 24, P. 11804-11808.
233. Orans J., Johnson M.D.L., Coggan K.A., Sperlazza J.R., Heiniger R.W., Wolfgang M.C., Redinbo M.R. Crystal structure analysis reveals *Pseudomonas* PilY1 as an essential calcium-dependent regulator of bacterial surface motility // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, Vol. 107, No. 3, P. 1065-1070.
234. Gupta H.K., Shrivastava S., Sharma R. A Novel Calcium Uptake Transporter of Uncharacterized P-Type ATPase Family Supplies Calcium for Cell Surface Integrity in *Mycobacterium smegmatis* // *mBio*, 2017, Vol. 8, No. 5, P. e01388-17.
235. Nemiroski A., Soh S., Kwok S.W., Yu H.-D., Whitesides G.M. Tilted Magnetic Levitation Enables Measurement of the Complete Range of Densities of Materials with Low Magnetic Permeability // *Journal of the American Chemical Society*, 2016, Vol. 138, No. 4, P. 1252-1257.

236. Ge S., Whitesides G.M. “Axial” Magnetic Levitation Using Ring Magnets Enables Simple Density-Based Analysis, Separation, and Manipulation // *Analytical Chemistry*, 2018, Vol. 90, No. 20, P. 12239-12245.
237. Ge S., Wang Y., Deshler N.J., Preston D.J., Whitesides G.M. High-Throughput Density Measurement Using Magnetic Levitation // *Journal of the American Chemical Society*, 2018, Vol. 140, No. 24, P. 7510-7518.
238. A. Parfenov V., V. Petrov S., D. A. S. Pereira F., A. Levin A., V. Koudan E., K. Nezhurina E., A. Karalkin P., M. Vasiliev M., F. Petrov O., S. Komlev V., D. Khesuani Y., A. Mironov V. Scaffold-free, Label-free, and Nozzle-free Magnetic Levitational Bioassembler for Rapid Formative Biofabrication of 3D Tissues and Organs // *International Journal of Bioprinting*, 2020, T. 6, № 3, C. 304.
239. O’Toole G.A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay // *Journal of Visualized Experiments*, 2011, No. 47, P. 2437.
240. Garavaglia M., Rossi E., Landini P. The Pyrimidine Nucleotide Biosynthetic Pathway Modulates Production of Biofilm Determinants in *Escherichia coli* // *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, No. 2, P. e31252.
241. Durmus T., Schilling R., Doeblin P., Huppertz A., Hamm B., Taupitz M., Wagner M. Gadobutrol for Magnetic Resonance Imaging of Chronic Myocardial Infarction: Intraindividual Comparison With Gadopentetate Dimeglumine // *Investigative Radiology*, 2012, Vol. 47, Gadobutrol for Magnetic Resonance Imaging of Chronic Myocardial Infarction, No. 3, P. 183-188.
242. Wildgruber M., Stadlbauer T., Rasper M., Hapfelmeier A., Zelger O., Eckstein H.-H., Halle M., Rummeny E.J., Huber A.M. Single-Dose Gadobutrol in Comparison With Single-Dose Gadobenate Dimeglumine for Magnetic Resonance Imaging of Chronic Myocardial Infarction at 3 T: // *Investigative Radiology*, 2014, Vol. 49, Single-Dose Gadobutrol in Comparison With Single-Dose Gadobenate Dimeglumine for Magnetic

- Resonance Imaging of Chronic Myocardial Infarction at 3 T, No. 11, P. 728-734.
243. Jensen L.K., Henriksen N.L., Bjarnsholt T., Kragh K.N., Jensen H.E. Combined Staining Techniques for Demonstration of *Staphylococcus aureus* Biofilm in Routine Histopathology // *Journal of Bone and Joint Infection*, 2018, Vol. 3, No. 1, P. 27-36.
244. Roberts A.E.L., Kragh K.N., Bjarnsholt T., Diggle S.P. The Limitations of In Vitro Experimentation in Understanding Biofilms and Chronic Infection // *Journal of Molecular Biology*, 2015, Vol. 427, No. 23, P. 3646-3661.
245. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms // *Clinical Microbiology Reviews*, 2002, Vol. 15, Biofilms, No. 2, P. 167-193.
246. Chen C.-Y., Nguyen L.-H.T., Cottrell B.J., Irwin P.L., Uhlich G.A. Multiple mechanisms responsible for strong Congo-red-binding variants of *Escherichia coli* O157:H7 strains // *Pathogens and Disease*, 2016, Vol. 74, Multiple mechanisms responsible for strong Congo-red-binding variants of *Escherichia coli* O157, No. 2, P. ftv123.
247. Sharma V.K., Bayles D.O., Alt D.P., Looft T., Brunelle B.W., Stasko J.A. Disruption of rcsB by a duplicated sequence in a curli-producing *Escherichia coli* O157:H7 results in differential gene expression in relation to biofilm formation, stress responses and metabolism // *BMC Microbiology*, 2017, Vol. 17, Disruption of rcsB by a duplicated sequence in a curli-producing *Escherichia coli* O157, No. 1, P. 56.
248. Chen C.-Y., Hofmann C.S., Cottrell B.J., Strobaugh Jr T.P., Paoli G.C., Nguyen L.-H., Yan X., Uhlich G.A. Phenotypic and Genotypic Characterization of Biofilm Forming Capabilities in Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains // *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, No. 12, P. e84863.
249. Wehland M., Bernhard F. The RcsAB Box // *Journal of Biological Chemistry*, 2000, Vol. 275, No. 10, P. 7013-7020.

250. Pannen D., Fabisch M., Gausling L., Schnetz K. Interaction of the RcsB Response Regulator with Auxiliary Transcription Regulators in *Escherichia coli* // *Journal of Biological Chemistry*, 2016, Vol. 291, No. 5, P. 2357-2370.
251. Vianney A., Jubelin G., Renault S., Dorel C., Lejeune P., Lazzaroni J.C. *Escherichia coli* tol and rcs genes participate in the complex network affecting curli synthesis // *Microbiology*, 2005, Vol. 151, No. 7, P. 2487-2497.
252. Crabbé A., De Boever P., Van Houdt R., Moors H., Mergeay M., Cornelis P. Use of the rotating wall vessel technology to study the effect of shear stress on growth behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 // *Environmental Microbiology*, 2008, Vol. 10, No. 8, P. 2098-2110.
253. Urbanowski M.L., Stauffer L.T., Plamann L.S., Stauffer G.V. A new methionine locus, metR, that encodes a trans-acting protein required for activation of metE and metH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* // *Journal of Bacteriology*, 1987, Vol. 169, No. 4, P. 1391-1397.
254. Hopper D.J., Cooper R.A. The regulation of *Escherichia coli* methylglyoxal synthase; a new control site in glycolysis? // *FEBS Letters*, 1971, Vol. 13, No. 4, P. 213-216.
255. Ferguson G.P., Töttemeyer S., MacLean M.J., Booth I.R. Methylglyoxal production in bacteria: suicide or survival? // *Archives of Microbiology*, 1998, T. 170, Methylglyoxal production in bacteria, № 4, C. 209-218.
256. Crabbé A., Schurr M.J., Monsieurs P., Morici L., Schurr J., Wilson J.W., Ott C.M., Tsaprailis G., Pierson D.L., Stefanyshyn-Piper H., Nickerson C.A. Transcriptional and Proteomic Responses of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 to Spaceflight Conditions Involve Hfq Regulation and Reveal a Role for Oxygen // *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, Vol. 77, No. 4, P. 1221-1230.

257. Beauprez J.J., De Mey M., Soetaert W.K. Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers // *Process Biochemistry*, 2010, Vol. 45, Microbial succinic acid production, No. 7, P. 1103-1114.
258. Guerrero Montero I., Dolata K.M., Schlüter R., Malherbe G., Sievers S., Zühlke D., Sura T., Dave E., Riedel K., Robinson C. Comparative proteome analysis in an *Escherichia coli* CyDisCo strain identifies stress responses related to protein production, oxidative stress and accumulation of misfolded protein // *Microbial Cell Factories*, 2019, Vol. 18, No. 1, P. 19.