Четыре вопроса о роли биопленок *P. aeruginosa* для адаптации к неблагоприятным факторам окружающей среды

Four questions about the role of *P. aeruginosa* biofilms for adaptation to adverse environmental factors

Афонюшкин В.Н.

п. Краснообск

DOI CrossRef:10.30917/ATT-VK-1814-9588-2019-2-13
УДК: 574.24

Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*, биопленки, чувство кворума, антагонизм, экология микробных сообществ, эпидемиология

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilms, quorum sense, antagonism, ecology of microbial communities, epidemiology

Резюме. *Pseudomonas aeruginosa* широко представленный вид бактерий, обладающий патогенным потенциалом. Данный инфекционный агент является возбудителем раневых инфекций, фиброзного цистита, фиброзирующей пневмонии, бактериального сепсиса и т.д. Микроорганизм отличается высокой устойчивостью к антисептикам, дезинфектантам реакциям иммунной системы организма. Реакции чувства кворума данного вида бактерий обеспечивают включение многих факторов патогенности. Анализ научной литературы позволил сформулировать пять вопросов, касающихся роли биопленок для адаптации *P. Aeruginosa* к неблагоприятным факторам окружающей среды: Является ли источником заражения *P. aeruginosa* другой человек или преимущественно этиологический агент находится в окружающей среде? Оказывает ли влияние на антибиотикорезистентность образование биопленки? Каким образом реализуется антагонистическая активность микроорганизмов в биопленочной форме? Какова основная функция биопленок в функционировании бактерий? Выдвинута гипотеза о том, что влияние биопленки на повышение антибиотикорезистентности бактерий и, в частности, *P. aeruginosa* носит вторичный характер. Более вероятно – что биопленка выполняет функцию запаса питательных веществ и обеспечения топической конкуренции в условиях дефицита пищевых ресурсов.

Summary. *Pseudomonas aeruginosa* is a widely represented species of bacteria that has a pathogenic potential.

This infectious agent is the causative agent of wound infections, fibrotic cystitis, fibrosing pneumonia, bacterial sepsis, etc. The microorganism is highly resistant to antiseptics, disinfectants, immune system reactions of the body. The reactions of a quorum sense of this kind of bacteria ensure the inclusion of many pathogenicity factors. The analysis of the scientific literature made it possible to formulate four questions concerning the role of biofilms for the adaptation of *P. aeruginosa* to adverse environmental factors: Is another person is predominantly of source an etiological agent or the source of *P. aeruginosa* infection is there in the environment? Does the formation of biofilms influence the antibiotic resistance? How is the antagonistic activity of microorganisms realized in biofilm form? What is the main function of biofilms in the functioning of bacteria? A hypothesis has been put forward that the effect of biofilms on the increase of antibiotic resistance of bacteria and, in particular, *P. aeruginosa* is secondary. It is more likely that biofilm fulfills the function of storing nutrients and providing topical competition in the face of food scarcity.

P. aeruginosa (синегнойная палочка, СГП) широко представленный вид (убиквитарный) обладающий патогенным потенциалом. Данный инфекционный агент является возбудителем раневых инфекций, фиброзного цистита, фиброзирующей пневмонии, бактериального сепсиса [1-3]. Микроорганизм отличается высокой устойчивостью к антисептикам, дезинфектантам реакциям иммунной системы организма. Реакции чувства кворума данного вида бактерий обеспечивают включение многих факторов патогенности [4].

Между медицинскими специалистами и биологами до сих пор идут споры об экологии и эпидемиологии синегнойной инфекции [5]. С одной стороны, СГП можно рассматривать в качестве возбудителя сапроноза – частота инфекционных процессов, антибиотикорезистентность микроорганизмов и характер течения инфекций должны определяться особенностями экологии инфекционного агента в окружающей среде. С другой стороны – в рассуждениях о госпитальных инфекциях, этот инфекционный агент рассматривается в качестве классического инфекционного агента передающегося от человека к человеку через объекты окружающей среды [6-9]. Одним из важных особенностей синегнойной палочки является ее способность к образованию биопленок (в качестве одной из реакций чувства кворума), образование биопленок считается одним из факторов устойчивости к антибиотикам (что, на наш взгляд является весьма дискуссионным утверждением), и антисептикам. Также биопленки препятствуют фагоцитозу (при нахождении синегнойной палочки в организме и работе гуморального иммунитета). Подавление некоторых реакций кворум-сенсинга синегнойной палочки в объектах окружающей среды и в организме человека и животных, может являться важным фактором снижающим риск развития госпитальных инфекций, хронических инфекций плохо поддающихся антибиотикотерапии [10-14]. Подавление роста самой синегнойной палочки не менее важно, чем образование ей биопленок.

Целью данного обзора является анализ роли биопленкообразования и иных реакций чувства кворума в формировании клинически-значимых характеристик *P. aeruginosa*.

Анализ научной литературы позволил поставить нам несколько вопросов посвященных биопленкообразованию

Авторы / Authors

Афонюшкин В.Н., к.б.н., зав. сектором молекулярной биологии Сибирского федерального центра агробιοтехнологий РАН, п. Краснообск, E-mail: lisocim@mail.ru

Донченко Н.А., д.в.н., директор института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего востока Сибирского федерального центра агробιοтехнологий РАН

Козлова Ю.Н., к.б.н., м.н.с. лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск

Давыдова Н.А., к.в.н. с.н.с. сектора молекулярной биологии Сибирского федерального центра агробιοтехнологий РАН

Afonyushkin V.N., Donchenko N.A., Kozlova Ju.N., Davidova N.A.

и реакция чувств кворума, в частности применительно к *P. aeruginosa*. На наш взгляд, окончательной проработки этих вопросов в научной литературе нет.

Вопрос 1. Каким образом происходит заражение синегнойной палочкой людей и животных? Является ли источником заражения *P. aeruginosa* другой человек или преимущественно этиологический агент находится в окружающей среде?

Между медицинскими специалистами и биологами до сих пор идут споры о экологии и эпидемиологии синегнойной инфекции. С одной стороны, СГП можно рассматривать в качестве возбудителя сапроноза и частота инфекционных процессов, антибиотикорезистентность микроорганизмов и характер течения инфекций должны определяться особенностями экологии инфекционного агента в окружающей среде. С другой стороны – в рассуждениях о госпитальных инфекциях этот инфекционный агент рассматривается в качестве классического инфекционного агента передающегося от человека к человеку через объекты окружающей среды.

Проблема накопления *P. aeruginosa* и других возбудителей сапронозов в больницах, инкубаторах, животноводческих помещениях, биотехнологических предприятиях, на наш взгляд, состоит из нескольких частей:

1. Активное подавление сапрофитов, сужение биоразнообразия микробиальных сообществ в больницах сокращает число бактерий антагонистов, продуцентов бактериофагов и уменьшает трофическую и топическую конкуренцию микробиоценозов окружающей среды в отношении синегнойной палочки, золотистого стафилококка и т.д.

2. Контакт бактериальных клеток с агрессивными химическими соединениями активирует защитные механизмы бактерий, что, скорее всего, повышает ее в т.ч. патогенность и антибиотикорезистентность

3. Наличие обилия больных подвергаемых действию антибиотиков, в среде лишенной иных органических загрязнений иной природы, способствует адаптации синегнойной палочки к субстратам производимым человеческим организмом, к существованию в организме человека.

4. Активное разрушение бактериальных клеток приводит к высвобождению ДНК, использование некоторых дезинфектантов не только консервирует эту ДНК предотвращая ее разрушение (в т.ч. бактериальными ДНКазами), но и повышает компетентность бактериальных клеток, повышая вероятность горизонтальной передачи генов антибиотикорезистентности [15].

Вопрос 2. Каким образом реализуется антагонистическая активность микроорганизмов в биопленочной форме?

В известной нам литературе широко описаны различные микробные сообщества входящие в состав биопленок, координировано и взаимовыгодно реагирующие на изменения окружающей среды ("quorum sensing"), регулирующие и синтез практических всех внеклеточных продуктов (пиоцианина, экзотоксина А, экзонуклеазы S и др.). Образующие биопленку бактерии не только механически связаны матриксом, но, по всей видимости, проявляют сложные формы взаимодействия: ассимиляции диффундирующих по матриксу питательных веществ; освобождения от избыточного накопления токсических продуктов, ферментов и других веществ, способных вызвать гибель членов биопленки; синхронной выработки факторов вирулентности. Однако при этом, изучение различных экологических стратегий взаимодействия и биохимических механизмов конкуренции бактерий различных видов проводили исключительно с суспензионными культурами. Поэтому, существующие данные не дают четкого понимания о механизмах взаимодействия и конкуренции микроорганизмов, находящихся в составе биопленок. В этой связи анализ механизмов конкуренции, в частности, получение данных о том, конкурируют ли бактерии друг с другом внутри биопленок, или речь идет о конкуренции между биопленками разных видов, позволит выработать новые гипотезы объясняющие механизмы вза-

имодействия микроорганизмов. Предпочтение в исследованиях отдается представителям патогенной и условно-патогенной микрофлоры встречающейся в экологических нишах богатых органическими соединениями, например, биопленка *Pseudomonas aeruginosa* в системе водоснабжения и канализационных системах [7].

С одной стороны, различные виды и биотипы микроорганизмов находятся друг с другом в состоянии топической и пищевой конкуренции, с другой стороны, нередко имеет место образование синтрофных связей, обмен генетическим материалом, формирование консорциумов и т.п. Одним из ярких механизмов реализации антагонизма является продукция микробиоцинов, конкуренция за факторы питания [16, 17].

Если рассматривать вопросы антагонистической активности бактерий в биопленочной форме то замедление диффузии микробиоцинов, благодаря формированию биопленки, теоретически, позволяет создавать локально их более высокие концентрации. Это может быть полезно в условиях дефицита ресурсов и замедления синтеза белка. Следовательно, в условиях непрерывной убыли микробиоцинов из места их синтеза, наличие биопленки является неоспоримым преимуществом для межвидовой конкуренции бактерий с использованием микробиоцинов. Замедление потери микробиоцинов благодаря биопленке, должно превращать биопленку в зону с повышенной концентрацией микробиоцинов.

Известны небольшие химические соединения, подавляющие реакции чувств кворума, которые могут быть сгруппированы в две категории, согласно их структурам и функциям. К одной группе относятся структурные миметики кворум-сенсинг сигналов, такие как галогенированные фураноны и синтетические AIP, сходные с AHL и AIP сигналами, соответственно. Очевидно, что эти ингибиторы действуют путем интерференции с сигнальными молекулами конкурируя за связывание с рецепторами или снижая концентрацию рецепторов [18]. Другая группа небольших молекул подавляет активность ферментов. Например, триклозан ингибирует *epo*YI-ACP редуктазу, которая нужна для образования основного предшественника AHL [19], клонантел – потенциальный ингибитор двухкомпонентной системы сенсора гистидин-киназы [20].

AHL-лактоназы, гидролизующие гомосерин-лактонное кольцо AHL сигналов были открыты у многих видов микроорганизмов [25]. Первая AHL-лактоназа, кодируемая геном *aiiA* изолята *Bacillus* sp. (240B1) была изучена путем клонирования в *Escherichia coli* с использованием AHL в качестве субстратов.

Некоторые виды бактерий, включая *Variovorax paradoxus*, ряд изолятов *Ralstonia*, *P. aeruginosa* PAO1, и *Streptomyces* sp. have кодируют AHL-ацилазу деградирующую AHL-сигналы путем гидролиза амидной связи AHLs с образованием соответствующей жирной кислоты и гомосеринлактона [21, 22].

В приведенном выше обзоре, в основном обсуждаются вопросы подавления реакций чувств кворума в т.ч. с целью борьбы с биопленками. Сам факт наличия систем регуляции продукции сигналов кворум-сенсинга, заставляет предполагать, что не только дефицит этих медиаторов, способен снизить выживаемость бактерий образующих биопленки, но и их избыток также может препятствовать эффективному размножению микроорганизмов. Можно констатировать, что на сегодняшний день недостаточно изучены вопросы связанные с нарушением баланса реакций кворум-сенсинга СГП (равно как и других видов бактерий формирующих биопленки), которые также могли бы предоставить конкурентное преимущество бактериям-антагонистам, и быть полезными в медицинской практике.

Представляет интерес тот факт, что в большинстве случаев химический состав биопленок варьирует в широких пределах у разных видов [23]. Биопленки многих микроорганизмов могут быть разрушены ограниченным числом

видов бактерий, в первую очередь самым видом-продуцентом биопленки [24].

Вопрос 3. Влияет ли образование биопленок на антибиотикорезистентность?

Одним из важных особенностей синегнойной палочки является ее способность к образованию биопленок (в качестве одной из реакций чувства кворума), образование биопленок считается одним из факторов устойчивости к антибиотикам (что, на наш взгляд является весьма дискуссионным утверждением), и антисептикам. Также биопленки препятствуют фагоцитозу (при нахождении синегнойной палочки в организме и работе гуморального иммунитета). Подавление некоторых реакций кворум-сенсинга синегнойной палочки в объектах окружающей среды и в организме человека и животных, может являться важным фактором снижающим риск развития госпитальных инфекций, хронических инфекций плохо поддающихся антибиотикотерапии и т.д.

Существование бактерий внутри изолированных биопленок обеспечивает им много преимуществ по сравнению с изолированными клетками. По мнению ряда авторов, для практической медицины особенно важно, что бактерии в биопленках имеют повышенную выживаемость в присутствии агрессивных веществ, факторов иммунной защиты и антибиотиков. Бактерии и грибы в биопленках выживают в присутствии антибиотиков, добавленных в количестве, в 500–1000 раз больше, чем их минимальная подавляющая концентрация [25–28]. Механизмы антибиотикорезистентности ассоциируемой с биопленками остаются неясными [29]. Предполагается, что клетки в биопленках могут быть защищены от действия антибиотиков путем ограничения их проникновения через матрикс биопленки [30]. Тем не менее, хотя наблюдается замедление диффузии в биопленке β-лактамов антибиотиков и аминогликозидов, фторхинолоны проникают через биопленку без задержки [31–33].

Применительно к бактериям вообще и *P. aeruginosa*, в частности, нам представляется совершенно не очевидным, что формирование биопленки само по себе может повышать устойчивость к антибиотикам. Рассмотрим, например, такой тест на антибиотикорезистентность как диско-диффузионный метод оценки антибиотикорезистентности. В этом методе слой плотной питательной среды вполне можно рассматривать как аналог биопленки. Антибиотик диффундирует с диска, содержащего антибиотик, и контактирует с суспензией бактерий распределенных по поверхности агара, в течение определенного времени. В течение нескольких часов происходит усреднение концентрации антибиотика в чашке Петри и концентрация падает ниже минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Размеры пор в биопленке недостаточно малы, чтобы биопленку можно было рассматривать в качестве барьера препятствующего контакту антибиотика с клеткой. Например, при оценке антибиотикорезистентности суспензионных и биопленочных форм бактерий фактом замедления диффузии антибиотика в геле биопленки можно пренебречь, так как контакт культуры с антибиотиком происходит в течение нескольких часов, а объем биопленки в исследуемой емкости занимает несколько процентов.

Более значимым фактором может быть перестройка процессов метаболизма бактериальной клетки в процессе реализации реакций чувства кворума, где биопленкообразование является лишь частным случаем реакций чувства кворума.

К ситуациям в которых биопленка может оказывать непосредственно воздействие на устойчивость к антибиотикам можно отнести два момента:

1. Более плавное нарастание концентрации антибактериального соединения в биопленке (в сравнении с суспензионной культурой), что может дать время на активацию механизмов индуцибельной антибиотикорезистентности (включение эффлюкс-помп, например).

2. Создание высоких локальных концентраций фер-

ментов инактивирующих антибиотики (очевидно что более высокомолекулярные ферменты будут диффундировать за пределы биопленки медленнее, чем туда начнут проникать низкомолекулярные антибактериальные соединения) [34, 35].

Эксперименты по разрушению биопленки синегнойной палочки с помощью фермента альгинат-лиазы показали значительное снижение выживаемости бактерий в присутствии гентамицина и ципрофлоксацина [36]. Это конечно позволяет подтвердить что какая-то связь биопленок с механизмами антибиотикостойчивости все-таки есть, однако является эта связь прямой или она опосредована влиянием самих биопленок на метаболизм бактериальной клетки? Большая часть механизмов устойчивости к антибиотикам, ассоциируемая с биопленками, подразумевает не прямой эффект матрикса биопленки на антибиотики а эффект состояния бактериальной клетки ассоциируемые с процессом биопленкообразования [37,38]. Из этого утверждения следует, что устойчивость к антибиотикам могла бы реализоваться без образования собственно биопленки, во многих случаях, вероятно, достаточно реализации других реакций чувства кворума или стресс-реакций (способных инициировать биопленкообразование), чтобы микроорганизм повысил свою устойчивость к антибиотикам. Например, это может быть за счет образования неделящихся персистентных клеток, замедления роста бактериальной культуры и иных метаболических изменений активируемых в рамках реакций чувства кворума.

Вопрос 4. Какова основная функция биопленок в функционировании бактерий?

Ранее мы уже поставили вопрос о роли вклада биопленки в обеспечении устойчивости микроорганизма к антибиотикам и прочим антибактериальным соединениям. Вопрос о том – зачем нужна биопленка бактериям – остается дискуссионным [39]. Удельная доля микробной биомассы занимает в составе биопленки незначительную часть. При этом биопленки часто образуются в неблагоприятных условиях – когда концентрация бактерий велика и очевидно наличие дефицита питательных ресурсов. Совершенно нелогично ожидать, что при избытке бактерий и дефиците питательных компонентов эволюционно выгодно будет формировать защитные структуры в виде биопленки. Однако, способность бактерий разрушать собственную биопленку и неспособность микроорганизмов других видов делать то же самое, наводит на мысль – биопленка это структура в которой происходит запасание питательных веществ (в труднодоступной для конкурентных видов форме). С другой стороны – высокая гидрофильность биопленок и сравнительно большой удельный объем, который занимает бактериальная культура в биопленочной форме позволяет рассматривать биопленку еще и как средство топической конкуренции. Экзополимеры биопленки не препятствуют диффузии низкомолекулярных соединений, но ограничивают доступ внутрь биопленки посторонних микроорганизмов. Таким образом, микроорганизмы, в составе биопленки, с большей эффективностью конкурируют за микронутриенты в сравнении с суспензионными формами микроорганизмов. Остается не до конца очевидным вопрос – является ли биопленка в первую очередь средством топической конкуренции или запасание источников энергии, и, возможно, воды является более приоритетной функцией.

Заключение

Анализ литературы заставляет прийти к мнению, что образование биопленки не преследует своей целью защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды. Повышение устойчивости биопленочных форм бактерий к антибиотикам является следствием процессов протекающих параллельно с образованием биопленки. Наиболее вероятно – что биопленка выполняет функцию запасаания питательных веществ и обеспечения топической конкуренции в условиях дефицита пищевых ресурсов.

Благодарности. Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ проект № а 18-016-00045

Литература

1. Peleg A.Y., Hooper D.C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. //N. Engl. J. Med. 2010;362 (19):1804-1813. doi: 10.1056/NEJMra0904124
2. Cross A., Allen J.R., Burke J., Duce G., Harris A., John J., Johnson D., Lew M., MacMillan B., Meers P., et al. Nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: review of recent trends. Reviews of infectious diseases. 1983;5 (Suppl 5) :S837-845.
3. Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003;168 (8):918-951.
4. Singh P.K., Schaefer A.L., Parsek M.R., Moninger T.O., Welsh M.J., Greenberg E.P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature. 2000;407 (6805):762-764. doi: 10.1038/35037627
5. Litvin, V., Saprophytic Phase in the Ecology of Causative Agents of Infectious Diseases, Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol., 1985, no. 1, pp. 98-103
6. Somov, G., Varvashevich, T., and Timchenko, N., Psikhrofil'nost' patogennykh bakterii (Psychrophilicity of Pathogenic Bacteria), Novosibirsk: Nauka, 1991.
7. Hardalo C., Edberg S.C. *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. Crit Rev Microbiol. 1997;23(1):47-75.
8. Blanc D.S. The use of molecular typing for the epidemiological surveillance and investigation of endemic nosocomial infections. Infect Genet Evol. 2004;4:193-197
9. Grundmann H., Kropec A., Hartung D., Berner R., Daschner F. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: reservoirs and ecology of the nosocomial pathogen. J. Infect. Dis. 1993;168(4):943-947.
10. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции. //Журнал инфектологии. - 2010. - Т.2. - № 3. - С. 4-15.
11. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284: 1318-22.
12. Costerton W., Veoh R., Shirtliff M., et al. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. Clin. Invest 2003; 112:1466-77.
13. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Ann Rev Microbiol 2000; 54: 49-79.
14. Tetz VV The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. Med Microbiol Lett 1996; 5:426-36.
15. Verraes C., Van Boxtael S., Van Meervenne E., Van Coillie E., Butaye P., Catry B., de Schaezen M.-A., Van Huffel X., Imberechts H., Dierick K., Daube G., Saegerman C., De Block J., Dewulf J., Herman L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. Int. J. Environ. Res. Public Health 2013, 10, 2643-2669.
16. Daniel J. Freedman, Jeffery K. Kondo, and Douglas L. Willrett Antagonism of Foodborne Bacteria by *Pseudomonas* spp.: A Possible Role for Iron Journal of Food Protection, Vol. 52, No. 7, Pages 484-489 (July 1989)
17. W.A. El-Shouny, A.R.H. Al-Baidani and W.T. Hamza Antimicrobial Activity of Pyocyanin Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Surgical Wound-Infections International Journal of Pharmacy and Medical Sciences 1 (1): 01-07, 2011
18. Hentzer M. et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. //EMBO J. 2003, 22, 3803-3815.
19. Hoang T. T. & Schweizer H. P. 1999 Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. J. Bacteriol. 181, 5489-5497.
20. Stephenson K., Yamaguchi Y. & Hoch J. A. 2000 The mechanism of action of inhibitors of bacterial two component signal transduction systems. J. Biol. Chem. 275, 38 900-38 904.
21. Huang J. J., Han J.-I., Zhang L.-H. & Leadbetter J. R. 2003 Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Appl. Environ. Microbiol. 69,
22. Park S.-Y., Kang H.-O., Jang H.-S., Lee J.-K., Koo B.-T. & Yum D.-Y. 2005 Identification of extracellular N-acylhomoserine lactone acylase from a *Streptomyces* sp. and its application to quorum quenching. // Appl. Environ. Microbiol. 71, 2632-2641.
23. Branda S.S., Vik ?, Friedman L., Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. Trends Microbiol. 2005;13:20-26.
24. Murata K., Inose T., Hisano T., Abe S., Yonemoto Y., Yamashita T., Takagi M., Sakaguchi K., Kimura A., Imanaka T. 1993. Bacterial alginate lyase: enzymology, genetics and application. J. Ferment. Bioeng. 76:427-437
25. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15:167-93.
26. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. Nat. Rev. Drug. Discov 2003; 2:114-22.
27. Campanac C., Pineau L., Payard A., Baziard-Mouysset G., Roques C. Interactions between Biocide Cationic Agents and Bacterial Biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1469-74.
28. Chambliss J.D., Hunt S.M., Philip S.S. A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials Appl. and Environmental Microbiology, 2006; 72: 2005-13.
29. Heidi Mulcahy, Laetitia Charron-Mazenod, Shawn Lewenz Extracellular DNA Chelates Cations and Induces Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms //PLOS Pathogens Published: November 21, 2008 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000213>
30. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science 284: 1318-1322.
31. Kumon H., Tomochika K., Matunaga T., Ogawa M., Ohmori H. (1994) A sandwich cup method for the penetration assay of antimicrobial agents through *Pseudomonas* exopolysaccharides. Microbiol Immunol 38: 615-619.
32. Hoyle B.D., Alcantara J., Costerton J.W. (1992) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm as a diffusion barrier to piperacillin. Antimicrob Agents Chemother 36: 2054-2056.
33. Suci P.A., Mittelman M.W., Yu F.P., Geesey G.G. (1994) Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicrob Agents Chemother 38: 2125-2133.
34. Hogan D and Kolter R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? Cur Opin Microbiol. 2002; 5: 472-477.
35. Poole K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. J. Appl. Microbiol 2002; 92: 55S-64S.
36. Laura A. Cotton, Rebecca J. Graham and Rose J. Lee The Role of Alginate in *P. aeruginosa* PAO1 Biofilm Structural Resistance to Gentamicin and Ciprofloxacin //Journal of Experimental Microbiology and Immunology 2009. Vol. 13:58-62
37. Hentzer M. & Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. J. Clin. Invest. 2003, 112, 1300-1307.
38. Bjarnsholt T. & Givskov M. 2007 Quorum-sensing blockade as a strategy for enhancing host defences against bacterial pathogens. Phil. Trans. R. Soc. B 362, 1213-1222.
39. Kimberly K. Jefferson What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiology Letters 236 (2004) 163-173