

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

УНИВЕРСИТЕТ РУАНА

На правах рукописи

Ганнесен Андрей Владиславович

Структура и состав моно- и мультивидовых биопленок микроорганизмов кожи и природных местообитаний: действие на них косметики и некоторых других биологически активных соединений

Специальность 03.02.03 - микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.б.н., профессор Нетрусов А.И.

PhD, профессор Фейоле М.Ж.Ж.

Москва, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

Список основных сокращений.....	3
Введение.....	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы.....	12
1.1. Комменсалы кожи человека и близкие к ним микроорганизмы, их биопленки и взаимодействие с организмом.....	12
1.4. Бинарные биопленки некоторых микроорганизмов кожи человека.....	34
1.5. Матрикс биопленок.....	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
2.1. Объекты исследования.....	49
2.2. Методы.....	53
ГЛАВА 3. Результаты.....	71
3.1. Исследование влияния азитромицина на рост биопленок <i>P. chlororaphis</i>	71
3.1.2. Влияние теплового шока на рост биопленок <i>P. chlororaphis</i> 449 в присутствии азитромицина.....	77
3.3. Исследование влияния компонентов косметики на рост моновидовых биопленок штаммов микробиоты кожи.....	85
3.4. Исследование влияния НУП на моновидовые биопленки микроорганизмов-комменсалов кожи.....	91
3.5. Исследование бинарных биопленок <i>S. aureus</i> и <i>S. epidermidis</i> и влияния на них компонентов косметики и НУП.....	97
3.6. Исследование бинарных биопленок <i>C. acnes</i> и <i>Staphylococcus</i> и влияния на них компонентов косметики и НУП.....	105
3.7. Исследование биохимического состава матрикса биопленок <i>C. acnes</i> RT5.....	117
ГЛАВА 4. Обсуждение.....	124
ВЫВОДЫ.....	139
Список цитированной литературы.....	141
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	181

Список основных сокращений

- АГЛ – ацилгомосеринлактоны
- АК – аминокислоты
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ИД – ингибирующая доза
- КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
- КОЕ – колониеобразующая единица
- МИК – минимальная ингибирующая концентрация
- НУП – натрийуретические пептиды
- ОП – оптическая плотность
- ПНАГ – 6-поли-N-ацетилглюкозамин
- ТВУ – термальная вода Уриажа ^{ТМ}
- ФР – физиологический раствор
- ANP – A-type natriuretic peptide (натрийуретический пептид А-типа)
- BNP – B-type natriuretic peptide (натрийуретический пептид В-типа)
- CAMP-factor (CAMP-фактор) - Christie–Atkins–Munch-Petersen factor (фактор Кристи–Аткинс–Мюнх-Петерсена)
- CNP – C-type natriuretic peptide (натрийуретический пептид С-типа)
- LB – lysogenic broth (лизогенный бульон)
- MQ-вода – вода, очищенная при помощи системы MilliQ
- MRSA – meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (метициллин-устойчивый *S. aureus*)
- MRSE – meticillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (метициллин-устойчивый *S. epidermidis*)
- PS291® - polysaccharide 291® (полисахарид 291® или тефлоза)
- QS – quorum sensing (чувство кворума)
- RCM – reinforced clostridial medium (обогащенная клостридиальная среда)
- TSB – tryptic soy broth (триптон-соевый бульон)
- TSA – tryptic soy agar (триптон-соевый агар)

Введение

Человеческая кожа – это самый крупный орган человека, являющийся местом обитания микроорганизмов нескольких сотен родов (Grice et al., 2009). Подобное сосуществование развилось в ходе эволюции. Организм-хозяин не препятствует поселению микробов-комменсалов, но борется против попавших на него патогенов (в том числе и при помощи комменсалов, (Chiller et al., 2001)). Видовое соотношение микроорганизмов на коже человека зависит от пола, возраста, региона проживания и т.д., но общие закономерности внутри одной группы людей приблизительно одинаковы (Grice et al., 2009; SanMiguel, Grice, 2015). Одним из важных факторов для роста микроорганизмов является микроокружение, обусловленное физиологическими особенностями кожи. Можно выделить три типа физиологического окружения – сальное, влажное и сухое – зависящих от локализации участка кожи и количества потовых и сальных желез на нём (Grice et al., 2009). Каждый тип характеризуется особым соотношением видов микроорганизмов. На сальных и влажных участках преобладают Actinobacteria (род *Propionibacterium*) и Firmicutes (род *Staphylococcus*), а в сухих зонах – Betaproteobacteria и Corynebacteria (Grice et al., 2009; SanMiguel, Grice, 2015).

Здоровье кожи и состояние её микробиома тесно связаны. Разнообразные повреждения и болезни кожи (физические травмы, атопический дерматит, псориаз и другие нарушения в работе иммунной системы) ведут к изменению видового соотношения микроорганизмов кожи (SanMiguel, Grice, 2015). Это приводит к осложнениям (размножению патогенных микробов, воспалению и т.д. (Hong et al., 2011)). Кожа представляет собой барьер, который постоянно взаимодействует с окружающей средой, и подвергается воздействию внутренних и внешних факторов. Эти воздействия могут затрагивать и микробиоту кожи. Внутренние факторы обусловлены гуморальной и нервной регуляцией состояния кожи. Из внешних факторов можно назвать биологические (контакты с другими живыми организмами), физические (воздух, увлажнение, температура окружающей среды, радиация и т.д.) или химические (воздействие различных природных соединений или синтетических веществ). К химическим факторам принадлежат, по сути, все химические вещества, с которыми соприкасается наша кожа, в том числе лекарственные препараты, антибиотики и косметика, которой пользуется множество людей по всему миру. Влияние указанных соединений на кожу очень велико.

Биопленки микроорганизмов – это пространственно и метаболически структурированные сообщества, погруженные во внеклеточный полимерный матрикс и расположенные на границе раздела фаз (Николаев, Плакунов, 2007). Биопленки – это самая распространенная форма жизни микроорганизмов на планете (Ножевникова с соавт., 2015). Границами раздела фаз, на которых растут биопленки, могут быть граница жидкость-воздух, твердое тело – воздух, жидкость-твердое тело и жидкость-жидкость (Hausler, Fuqua, 2012). Образование биопленок – это

универсальное свойство бактерий, биопленки обнаруживаются практически на всех естественных и искусственных поверхностях (Vlamakis et al., 2013). Внутри биопленок клетки подвергаются воздействию (как физическому, так и биологическому) совершенно иного рода, нежели в планктонной форме. В биопленке присутствуют резкие градиенты концентраций питательных веществ, газов и ионов; тесное соседство клеток обуславливает их физический контакт, обмен сигнальными молекулами и продуктами метаболизма. Это определяет их особые свойства (Николаев, Плакунов, 2007).

При образовании биопленок формируется специфический биопленочный фенотип (Николаев, Плакунов, 2007): изменение уровня экспрессии ряда генов, в результате чего у клеток появляются особые свойства (например, синтез внеклеточного матрикса), отличных от свойств клеток того же штамма в планктонной форме. В результате биопленка приобретает фактически свойства многоклеточного организма. Ранее была выдвинута гипотеза о том, что биопленки бактерий и амёб могли быть предками многоклеточных животных - губок (Verhoeven et al., 2010). Однако, данная гипотеза некорректна: бактерии имеют биопленочный фенотип, но не генотип, т.е. переключение экспрессии ряда генов в ходе формирования биопленок – процесс обратимый. Клетки могут выйти из состава биопленки обратно в планктонную форму, а значит, нет истинной дифференцировки клеток, как в многоклеточном организме. Несмотря на это, клетки одного вида в составе биопленки могут сильно отличаться по экспрессии генов (Boles, Singh, 2008).

Можно выделить три основных этапа роста биопленок: прикрепление клеток к поверхности раздела фаз, собственно рост и распад (Плакунов с соавт., 2017). В свою очередь, в ходе каждого этапа выделяются отдельные стадии. Так, на этапе прикрепления выделяют стадии обратимой и необратимой адгезии (Николаев, Плакунов, 2007; Dutta et al., 2012; Ribeiro et al., 2012). Клетки на стадии обратимой адгезии могут перемещаться по поверхности при помощи жгутиков или пилей (Romeo, 2008; Harmsen et al., 2010; Dutta et al., 2012). В стадии необратимой адгезии клетки утрачивают подвижность. На этапе роста биопленки происходят синтез матрикса и поселение вторичных колонизаторов (Николаев, Плакунов, 2007; Vlamakis, 2013). Эти события могут происходить как одновременно, так и последовательно, поэтому их можно объединить в одну стадию. Следующей стадией на этапе роста является стадия созревания (Николаев, Плакунов, 2007; Mann, Wozniak, 2012; Vlamakis, 2013). Здесь возможно формирование сложных трехмерных структур наподобие грибовидных тел у *Pseudomonas aeruginosa* (Hansen et al., 2010) или округлых выпуклых бугорков у *Bacillus subtilis* (Vlamakis, 2013). На стадии распада часть клеток утрачивает биопленочный фенотип и возвращается в свободное состояние.

Отдельно необходимо упомянуть чувство кворума или кворум-сенсинг. Кворум-сенсинг (quorum-sensing, QS) – это межклеточные взаимодействия между бактериями, которые позволяют сообществу координировать экспрессию генов в ответ на изменение плотности популяции (Camilli, Bassler, 2006). Известно, что системы QS способствуют формированию биопленок, и множество молекул служат факторами QS у бактерий (Worthington et al, 2013). Исследования QS у грамотрицательных бактерий проводятся в основном на *Vibrio fisheri*, *V. cholerae* и *P. aeruginosa* (Worthington et al, 2013). Если говорить обобщенно, система QS у грамотрицательных бактерий реализована посредством двух белков: один белок ответственен за синтез сигнальной молекулы, обычно называемой аутоиндуктором (AI), а второй белок является рецептором аутоиндуктора (Worthington et al, 2013). Работа систем кворум-сенсинга во многом определяет формирование биопленок, и для борьбы с биопленками современные методики борьбы с биопленками все чаще основаны на ингибировании систем QS, например, N-(2-пиримидил)-бутанамидом (Kalia, 2015; Furiga et al., 2016; Leoni, Rampioni, 2018).

Есть несколько причин, по которым микробные биопленки интенсивно изучаются в настоящее время. Во-первых, с точки зрения фундаментальной науки представляет интерес, каким образом бактерии способны существовать в виде многоклеточных сообществ. Во-вторых, образование биопленок является значительной проблемой в медицине и промышленности, поскольку в составе биопленок бактерии многократно устойчивее к антибиотикам, иммунному ответу макроорганизма и обработке биоцидами (Harmsen et al., 2010), нежели планктонные культуры (совокупность клеток микроорганизмов, находящихся во взвешенном состоянии в жидкой среде). Интересный феномен представляют собой клетки-персистеры – небольшая популяция физиологически малоактивных клеток в составе биопленки, во много раз более устойчивых к антибиотикам, нежели остальные клетки биопленки (Плакунов с соавт., 2010). Клетки-персистеры способны восстановить популяцию после гибели большей части клеток вследствие внешнего негативного воздействия, что делает их одним из факторов устойчивости биопленок (Michiels, Fauvart, 2016).

Помимо негативной роли, микробные биопленки выполняют и позитивные функции, такие как, например, разрушение токсических, трудных для биодegradации загрязнителей почвы и сточных вод (Perni et al., 2013). Фундаментальной задачей является понимание того, механизм формирования у бактерий в составе биопленок так называемых свойства на уровне группы (group-level properties, Nadell et al., 2013) пространственная структура биопленки и координация поведения клеток при взаимодействии друг с другом и с поверхностью (Nadell et al., 2013). Также, большой интерес представляют собой регуляторные сигнальные пути как внутри клетки, так и между клетками в составе биопленок.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что исследование биопленок является одним из приоритетных направлений современной микробиологии, причем биопленок не только моновидовых, но и мультивидовых. Особенно важно исследование микробиома человека и биопленок, формируемых микроорганизмами в организме человека, поскольку микробиом человека во многом определяет состояние и функционирование ряда систем организма человека (Thomas et al., 2017), а в случае биопленок патогенных микроорганизмов – хронических инфекций, трудно поддающихся лечению. Более 60% всех хронических заболеваний вызываются биопленками патогенных микроорганизмов (Плакунов с соавт., 2017). В частности, исследование биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека и близких к ним микроорганизмов и влияния на них различных активных соединений, чему посвящена настоящая работа, крайне актуально. Во-первых, это важно для фундаментальной науки для исследования биопленок и их взаимодействия с организмом человека. Во-вторых, это актуально для прикладных областей знания, таких как биотехнология, косметология и фармакология. В косметологии в настоящее время все больше растет интерес к новым компонентам компонентам чего? в связи с постепенным отказом от консервантов и все большей связью косметологии, дерматологии и микробиологии, что требует разработки новых средств, поддерживающих баланс микробиоты кожи человека. В фармакологии актуален поиск новых соединений для борьбы с биопленками, которые могут усиливать действие уже существующих антимикробных агентов, таких как антибиотики. В биотехнологии необходимо управлять ростом биопленок для получения определенного продукта или проведения необходимого биохимического процесса (такого, как анаммокс-процесс на станциях очистки сточных вод (Ножевникова с соавт., 2015)). Также, помимо исследований действия разнообразных химических агентов на биопленки, необходимо исследовать их структуру, в частности, матрикс биопленок, являющийся барьером на пути активных соединений (Zhurina et al., 2014). Знание структуры и биохимического состава матрикса биопленок позволит подбирать вещества с лучшей способностью преодолевать барьер матрикса и достигать клеток.

Целью работы являлось исследовать ряд типичных представителей микробиома кожи и близких к ним микроорганизмов: влияние на них биологически активных соединений разной природы, формирование этими микроорганизмами моновидовых и бинарных биопленок, изучение возможных механизмов действия исследуемых соединений, а также определение биохимического состава матрикса биопленок кожного акнеического штамма *Cutibacterium acnes* RT5.

Для достижения поставленной цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1) Исследовать влияние антибиотика азитромицина, широко применяющегося в лечении инфекций, вызываемых псевдомонадами, на рост культур и биопленок *Pseudomonas chlororaphis* – непатогенного микроорганизма, близкого к обитающему на коже патогену *Pseudomonas aeruginosa*.

2) Исследовать действие антигельминтного препарата никлозамида на рост культур и биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека *Micrococcus luteus*, *Kytococcus schroetrii* и *Staphylococcus aureus*. Проверить способность никлозамида усиливать действие азитромицина.

3) Исследовать влияние компонентов косметики Термальной воды Уриаж™ (ТВУ) и олигосахарида PS291® (тефлозы) на рост моновидовых и бинарных планктонных культур и биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека *S. aureus*, *S. epidermidis* и акнеических штаммов *C. acnes*.

4) Исследовать влияние натрийуретических пептидов (НУП) А- и С-типов на рост моновидовых и бинарных планктонных культур и биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека *S. aureus*, *S. epidermidis* и акнеических штаммов *C. acnes*.

5) Исследовать биохимический состав матрикса биопленок акнеического штамма *C. acnes* RT5 различными методами.

Научная новизна исследований

Впервые показано, что антибиотик азитромицин в субингибиторных концентрациях стимулирует рост биопленок *P. chlororaphis*, и что в этом процессе участвует ацилгомосеринлактон (АГЛ) - зависимая система кворум-сенсинга (QS). Впервые показан необычный характер воздействия азитромицина на рост биопленок *P. chlororaphis*: стимуляция роста биопленок происходит при относительно высоких концентрациях, тогда как ингибирование наблюдается при наличии в среде концентраций на несколько порядков меньше МИК. Показано, что биопленки, подвергнутые предварительно стимуляции антибиотками обладают повышенным количеством полисахаридного компонента матрикса, а также более устойчивы к тепловому шоку.

Показан выраженный ингибирующий эффект никлозамида на рост планктонных культур и биопленок *S. aureus*, *M. luteus* и *K. schroeteri*. Обнаружено, что никлозамид снимает эффект стимуляции роста биопленок *S. aureus* субингибиторными концентрациями азитромицина, что делает его перспективным антибиопленочным агентом.

Показано, что ТВУ™ и PS291® значительно подавляют рост биопленок *S. aureus* и *C. acnes*, не проявляя при этом токсического эффекта на клетки микроорганизмов. Вероятно, данные соединения модифицируют способность бактериальных клеток к адгезии, что делает перспективным создание на их основе новых косметических препаратов. Оба эти соединения

обладают регуляторным эффектом и смещают соотношение численности бактерий в бинарной биопленке *S. aureus* и *S. epidermidis* в сторону *S. epidermidis*, что благоприятно для состояния кожи, т.к. золотистый стафилококк представляет большую опасность, чем *S. epidermidis*. Аналогичным образом, в бинарной биопленке *S. aureus* и *C. acnes* в присутствии исследованных соединений соотношение количества клеток в бинарной биопленке сдвигается в сторону *C. acnes*.

Впервые показано, что НУП человека оказывают сильное влияние на рост биопленок грамположительных микроорганизмов микробиоты кожи человека. Установлено, что их эффект в отношении биопленок *S. aureus*, *S. epidermidis* и *C. acnes* зависит от условий культивирования, что может определять специфику их влияния на формирование биопленок при различных физиологических состояниях кожи. Показано, что НУП способны регулировать состав бинарных биопленок комменсалов кожи: усиливать конкурентные преимущества *S. epidermidis* и *C. acnes* перед *S. aureus*, что предполагает совместную эволюцию микробиоты кожи и регуляторных молекул-метаболитов человека. Это делает НУП перспективными для применения в косметологии и дерматологии для нормализации баланса микробиоты кожи.

Впервые исследовано соотношение биохимических компонентов матрикса биопленок *C. acnes*. Показано, что доминирующими компонентами матрикса биопленок *C. acnes* являются полисахариды. Впервые проведено детальное исследование тотального протеома матрикса биопленок *C. acnes*, выявлены белки-компоненты матрикса, предположены их роли в матриксе. Впервые проведено исследование матрикса *C. acnes* с помощью SERS-спектроскопии и получены профили SERS-спектров клеток бактерий в биопленках и матрикса биопленок *C. acnes*.

Практическая значимость работы

Показана универсальность явления стимуляции роста биопленок субингибиторными концентрациями антибиотика азитромицина, который стимулирует рост не только биопленок патогенов человека, но и почвенных сапротрофов. Показана вовлеченность системы QS у *P. chlororaphis* в стимуляцию роста биопленок азитромицином, что подтверждает перспективность подавления ее работы для снятия эффекта стимуляции. Показано, что стимуляция азитромицином приводит к более интенсивному синтезу полисахаридов матрикса. Установлено, что матрикс биопленок играет значительную роль в устойчивости их к тепловому шоку, и биопленки *P. chlororaphis*, сформированные при стимулирующей концентрации азитромицина, в условиях теплового шока растут лучше, чем сформированные в отсутствие антибиотика (что может использоваться при их биотехнологическом применении). Показана перспективность нетоксичного для человека в антибиопленочных концентрациях никлозамида для борьбы с биопленками грамположительных микроорганизмов, а также его способность

снимать эффект стимуляции роста биопленок азитромицином у *S. aureus*, что делает никлозамид перспективным компонентом бинарных антибиопленочных препаратов.

Показана перспективность создания новых косметических средств с модулирующим микробиоту человека действием на основе ТВУ™ и PS291® для борьбы с *C. acnes* и *S. aureus* на коже человека.

Показана перспективность применения НУП в антибактериальной терапии, а также обнаружено новое свойство НУП, а именно - способность регулировать состав микробиоты кожи, что открывает широкие перспективы в эндокринологии и клинической практике.

Разработана методика выделения матрикса биопленок грамположительных бактерий, позволяющая изолировать матрикс без применения специальных химических агентов, сохраняют нативный состав матрикса. Показано присутствие разнообразных белков в матриксе *C. acnes*, что создает перспективы для исследования их роли в патогенезе инфекций, вызываемых *C. acnes*. Получены SERS-спектры биомассы и матрикса биопленок *C. acnes* RT5, что будет использовано в будущем для его детекции в различных образцах.

Положения, выносимые на защиту

1) Азитромицин в сверхнизких концентрациях ингибирует рост биопленок *P. chlororaphis* 449, с ростом концентрации возникает стимуляция, прекращающаяся при приближении к МИК. Стимуляция и ингибирование происходят в том числе путем увеличения или снижения синтеза полисахаридной части матрикса биопленок. Биопленки *P. chlororaphis*, сформированные при стимулирующей концентрации азитромицина более устойчивы к тепловому шоку, нежели в контроле без антибиотика. АГЛ-зависимая система QS задействована в процессе стимуляции роста: АГЛ-лактоназа, закодированная в плазмиде, расщепляет АГЛ и полностью снимает эффект стимуляции у генно-модифицированных штаммов *P. chlororaphis*.

2) Никлозамид уже при концентрации 0.1 мкг/мл сильно подавляет рост метаболически активных клеток *S. aureus*, *M. luteus* и *K. schroeteri*. 1 мкг/мл никлозамида в среде полностью подавляет рост метаболически активных бактерий в биопленках. При сочетании с азитромицином, никлозамид нивелирует стимулирующий эффект азитромицина на рост биопленок *S. aureus*.

3) ТВУ™ И PS291®, возможно, за счет модификации способности клеток к адгезии, эффективно подавляют рост биопленок *C. acnes* и *S. aureus*. Эффект термальной воды обусловлен ее химическим составом. Помимо этого, ТВУ и PS291 способны регулировать баланс микроорганизмов кожи: ослабляя конкурентное преимущество *S. aureus*, они увеличивают долю *S. epidermidis* и *C. acnes* в составе бинарных биопленок с *S. aureus*.

4) НУП воздействуют на биопленки *C. acnes*, *S. epidermidis* и *S. aureus*, и характер этого воздействия зависит от условий культивирования, что говорит о разной роли НУП при разных условиях на коже. НУП обладают регуляторной функцией и способны изменять баланс КОЕ микроорганизмов в бинарных биопленках.

5) 54% органического вещества матрикса *C. acnes* RT5 составляют сахара. Около 16% представлено белками и ДНК. Около 30% органического вещества матрикса составляют молекулы, не принадлежащие к сахарам, пептидам или ДНК – это низкомолекулярные метаболиты (порфирины и другие соединения).

6) В матриксе определены 447 белков, включающих в себя более 20 гидролаз разной спецификации, более 40 белков неизвестной природы, множество ферментов и других структурных белков. Большинство белков, по-видимому, появляется в матриксе после автолиза части клеток. Гидролазы, вероятно, вовлечены в процессы вирулентности биопленок *C. acnes* на коже человека и в других нишах в теле человека.

7) При помощи SERS выявлены 57 пиков разной интенсивности, которые нуждаются в дальнейшей интерпретации при помощи других методик. Получены спектры клеток и матрикса биопленок *C. acnes*, которые будут использованы для детекции *C. acnes* методом SERS, а также создания единой базы данных бактериальных SERS-спектров.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были доложены на 11 научных мероприятиях: на III Всероссийской научно-практической конференции «Развитие жизни в процессе абиотических изменений на Земле» (Листвянка, Иркутская область, 2014), на XXVII Зимней молодежной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2015), на VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), на XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015" (Москва, 2015), на X Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2015), на Международном конгрессе “Cosminnov” (Париж, Франция, 2016), на международном конгрессе «Antimicrobial resistance in microbial biofilms and options for the treatment» (Гент, Бельгия, 2016), на XI Международной школе-конференции с международным участием "Актуальные аспекты современной микробиологии" (Москва, 2016), на XXIX Зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2017), на 21 Международной пушкинской школе-конференции молодых учёных "Биология - наука 21 века" (Пушино, 2017), на 9 Международном конгрессе «Skin Ageing and Challenges» (Порту, Португалия).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 6 – статьи в рецензируемых журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science, 4 – в журналах, входящих в ядро РИНЦ (RSCI), 11 – тезисы докладов на всероссийских и международных научных конференциях. Планируется опубликовать еще 2 экспериментальные статьи по материалам диссертации.

Личный вклад автора заключается в работе с литературными источниками, планировании и проведении экспериментальных исследований, результаты которых получены исключительно самим автором или при его определяющем или непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. Участие соавторов соискателя и организаций, в которых они работают, обозначено в тексте работы во всех случаях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из списка основных сокращений, введения, обзора литературы, экспериментальной части (разделы «материалы и методы», «результаты», «обсуждение»), выводов, списка литературы, приложения. Материал изложен на 227 страницах машинописного текста (из них 181 стр. занимает диссертация и 46 – приложение), содержит 13 таблиц и 46 рисунков. Список литературы включает 437 источников, в том числе 417 печатных работ иностранных авторов.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Комменсалы кожи человека и близкие к ним микроорганизмы, их биопленки и взаимодействие с организмом

1.1.1. Микробиота человека

Микробиота человека – это сообщество микроорганизмов-комменсалов, симбионтов и патогенов, которые обитают внутри и снаружи тела человека и экологически взаимосвязаны с ним и друг с другом (Thomas et al., 2017). Человек эволюционировал и продолжает эволюционировать вместе со своей микробиотой (Thomas et al., 2017). Разные авторы по-разному оценивали количество клеток микроорганизмов, живущих в теле человека и на его поверхности (данные в литературе варьировались от 10^{12} до 10^{20} клеток, Bianconi et al., 2013). Аналогично, разброс данных о количестве собственных клеток организма человека был велик – несколько порядков (Sender et al., 2016). В литературе часто встречается оценка соотношения клеток микроорганизмов и клеток тела человека 10:1 (Rosner et al., 2014). Ряд исследователей в

настоящее время подверг сомнению эти данные, уже широко представленные в научной и околонаучной литературе. Согласно Rosner, 2014, часто упоминаемое и цитируемое в научной литературе соотношение клеток микроорганизмов и клеток организма человека, равное 10:1, происходит из работы Luckey, 1972, где количество микроорганизмов оценивалось по их количеству в единице объема содержимого кишечника. Данные, по мнению ряда авторов (Sender et al., 2016), использованные в этой работе и в последующих, зачастую не совсем достоверны, поскольку допускают слишком сильные обобщения и усреднения объемов, массы тела человека, объема клеток микроорганизмов и так далее. Результаты современных исследований метаданных, расчеты с учетом большого количества параметров свидетельствуют о том, что тело человека состоит из порядка 3.72×10^{13} клеток (Bianconi et al., 2013). А клеток микроорганизмов, живущих в нем и на нем – порядка 3.9×10^{13} (Sender et al., 2016), что практически идентично соотношению 1:1.

Тем не менее, видовое разнообразие микробиоты человека очень велико: по современным оценкам, с организмом человека ассоциированы по меньшей мере 40000 штаммов, принадлежащих 1800 родам, суммарно обладающих более чем девятью миллионами генов, отличных от генов человека (Schwiertz, Rusch, 2016), что в 100 раз превышает генов человека (Thomas et al., 2017). Также, микробиота каждого отдельного человека обладает в 10 раз большим количеством генов, нежели ее хозяин (Thomas et al., 2017). В состав микробиоты человека входят представители всех трех доменов жизни (Thursby, Juge, 2017), а также вирусы (Virgin, 2014), образующие виром. Наиболее полные данные о генетическом разнообразии микробиоты человека в настоящее время получают при помощи методов метагеномики и метатранскриптомики, которые, имеют ряд преимуществ (анализ тотальной ДНК позволяет выявить микроорганизмы, которые пока невозможно культивировать в лаборатории) и недостатков (зависимость от метода подготовки нуклеиновых кислот для анализа, невозможность полного описания микроорганизма, Walker, 2016). Методы культивирования на искусственных средах позволяют исследовать пока что очень ограниченное количество микроорганизмов (Walker, 2016).

Микробиота человека выполняет ряд важных функций: синтез полезных веществ (Lai et al., 2010; SanMiguel, Grice, 2015; Nakatsuji et al., 2018), защита от патогенов (SanMiguel, Grice, 2015), поддержка функционирования иммунной системы (SanMiguel, Grice, 2015). Тесное взаимодействие микробиоты человека с организмом с ходом эволюции сформировало отлаженное и очень сложно организованное сообщество, которое некоторые исследователи называют «вторым мозгом» (Ochoa-Repáraz, Kasper, 2016), а организм человека вместе с его микробиотой – «суперорганизмом» (Thomas et al., 2017).

1.2.2. Микробиота кожи человека

Человеческая кожа – это самый крупный орган человека, являющийся местом обитания нескольких сотен родов микроорганизмов (Grice et al., 2009). Подобное сосуществование развилось в ходе эволюции: организм-хозяин не препятствует поселению микробов-комменсалов, но борется против патогенов (в том числе и при помощи комменсалов, Chiller et al., 2001). Видовое соотношение микроорганизмов на коже человека зависит от пола, возраста, региона проживания, сезонности и т.д., но общие закономерности внутри одной группы приблизительно одинаковы (Chiller et al., 2001; SanMiguel, Grice, 2015; Leung et al., 2018). Одним из важных факторов для роста микроорганизмов является микроокружение, обусловленное физиологическими особенностями кожи. Можно выделить три типа физиологического окружения – сальное, влажное и сухое – зависящих от локализации участка кожи и количества потовых и сальных желез на нём (Grice et al., 2009). Каждый тип характеризуется особым соотношением видов микроорганизмов. Если говорить о бактериях, то на сальных и влажных участках преобладают Actinobacteria (род *Propionibacterium*) и Firmicutes (род *Staphylococcus*), а в сухих зонах – Betaproteobacteria и Corynebacteria (Grice et al., 2009; SanMiguel, Grice, 2015).

Кожа, будучи первичным барьером и самым большим органом организма человека, выполняет ряд важных функций: терморегулирующую, выделительную, защитную, газообменную. Микроорганизмы, которые населяют кожу, вовлечены в процессы, происходящие в ней и во многом определяют ее состояние (Achermann et al., 2014; Leung et al., 2018). Изменения состояния кожи (генетические нарушения, заболевания, воздействие внешних факторов) влекут за собой изменение состава микробиоты. Так, к примеру, при atopическом дерматите может резко усиливаться колонизация пораженных участков кожи *S. aureus* (Elfatoiki et al., 2016; Lacey et al., 2016), что приводит к осложнениям. Аналогичная картина может наблюдаться при псориазе (Totte et al., 2016) и фолликулите (Balasubramanian et al., 2017), когда *S. aureus* начинает активно колонизировать полости волосяных фолликулов и вызывать воспаление. Еще одним кожным расстройством является перхоть, характерная, по разным подсчетам, для половины населения Земли (Xu et al., 2016). Этиология перхоти до сих пор является предметом дискуссий, однако, зачастую, с ее развитием ассоциированы кожные грибки рода *Malassezia*, активно развивающиеся на пораженных участках. Сами по себе грибы рода *Malassezia* являются причиной отрубевидного лишая и в некоторых случаях активно размножаются на коже при atopическом дерматите и псориазе (Xu et al., 2016). Также, *Malassezia* являются возбудителями себореи (Soarez et al., 2015).

1.2.3. Некоторые представители микробиоты кожи человека

В данном разделе будут охарактеризованы некоторые микроорганизмы, обитающие на коже человека, и родственные им микроорганизмы.

1.2.3.1. Pseudomonas. На коже человека присутствуют многие виды микроорганизмов. Если говорить о роде *Pseudomonas*, то чаще всего в литературе встречаются упоминания о *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* – это сапротрофный микроорганизм, живущий в почве (Deredjian et al., 2014), однако, гораздо более он известен как патоген человека (Loveday et al., 2014). *P. aeruginosa* посвящено и посвящается ежегодно большое количество работ, поскольку он является более агрессивным, нежели *P. fluorescens* и *P. putida* патогеном и служит причиной большого количества инфекций, таких как кистозный фиброз легких (Fernandez et al., 2013), инфекции мочеполовой системы (Tajbakhsh et al., 2015), заражения искусственных имплантатов (Cole et al., 2014), отитов (Wang et al., 2005). Ранее (до распространения метциллин-устойчивых *Staphylococcus aureus*) *P. aeruginosa* считалась причиной бактериемий с наиболее высокой результирующей смертностью (Kreger et al., 1980). Если говорить об инфекциях кожи человека, то *P. aeruginosa* служит причиной синдрома зеленых ногтей (Chiriac et al., 2015), заражения и воспаления ран (Pfalzgraff et al., 2018), псевдомонадного фолликулита (или «фолликулита горячих труб», т.к. источником заражения часто бывают трубы отопления в бассейнах и других водных объектах, Fowler, Stege, 1990), гангренозной эктимы (Mull et al., 2000) и т.д. *P. aeruginosa* способна разрушать структуру кожи при бактериемиях, что ведет к очень серьезным последствиям (Wu et al., 2011). Особенно опасна *P. aeruginosa* для людей с ослабленным иммунитетом (Bassetti et al., 2018). Трудность в борьбе с инфекциями, вызываемыми *P. aeruginosa*, заключается в ее способности формировать биопленки на коже, в частности, в ранках (Davis et al., 2008; Karna et al., 2016), что затрудняет лечение. Также, поскольку человечество борется с инфекциями, вызываемыми псевдомонадами, достаточно давно, появились мультирезистентные штаммы *P. aeruginosa*, представляющие большую опасность для человека (Potron et al., 2015). Сейчас *P. aeruginosa* считается главным возбудителем инфекций среди грамотрицательных палочек (Bassetti et al., 2018).

По этим причинам *P. aeruginosa* в настоящее время является модельным объектом для изучения развития биопленок и воздействия на них разнообразных антибактериальных соединений. Поскольку *P. aeruginosa* является очень популярным объектом, которому посвящен ряд монографий и множество статей каждый год, остановимся очень кратко на ключевых аспектах, касающихся непосредственно данной работы. Много исследований посвящено устойчивости биопленок *P. aeruginosa* к действию антибиотиков. К примеру, показана устойчивость к тобрамицину и ципрофлоксацину (Stewart et al., 2015), цефтазидиму и колистину (Furiga et al., 2016) и другим. Ряд работ посвящен воздействию на биопленки *P. aeruginosa* азитромицина и его антибиопленочной активности (к примеру, Phelan et al., 2015, Saini et al., 2015), но при этом есть данные и об устойчивости биопленок к азитромицину и

вовлеченность помп MexAB-OprM и MexCD-OprJ в этот процесс (Gillis et al., 2005). Азитромицин также взаимодействует с АГЛ-зависимыми системами QS Las и Rlh у *P. aeruginosa*, блокируя их работу (Tateda et al., 2001), что приводит к нарушению формирования биопленок (Nalca et al., 2006). На *P. aeruginosa* показан эффект стимуляции роста биопленок субингибиторными концентрациями антибиотиков. Так, к примеру, доксициклин и полимиксин В в субингибиторных концентрациях стимулируют рост биопленок *P. aeruginosa* ATCC 9027 (Tote et al., 2009). Гентамицин в субингибиторных концентрациях повышает экспрессию около 30 генов, ответственных за формирование биопленки у *P. aeruginosa*, в том числе протеазы Lon (Marr et al., 2007).

Ряд исследований посвящен взаимодействию *P. aeruginosa* с сигнальными молекулами организма человека. Показано, что катехоламины и γ -аминомасляная кислота (ГАМК) стимулируют рост *P. aeruginosa*, при этом катехоламины и ГАМК еще и усиливают вирулентность *P. aeruginosa* (Lesouhaitier et al., 2009). Тем же эффектом обладают интерферон- γ и динорфины (Lesouhaitier et al., 2009). Недавно показано, что *P. aeruginosa* обладает ортологом рецептора натрийуретического пептида С-типа (CNP, Rosay et al., 2015) - AmiC, благодаря чему, вероятно, CNP способен подавлять рост биопленок *P. aeruginosa*. AmiC у *P. aeruginosa* является регулятором амидазного оперона, меняющего экспрессию генов *ami* (Wilson, Drew, 1991).

P. putida – это сапротрофный микроорганизм, живущий в почве, воде (Fernandez et al., 2015) и в ризосфере, что делает его в ряде случаев полезным микроорганизмом для защиты растений от фитопатогенов (Bernal et al., 2017). Однако, при этом *P. putida* является условным патогеном и может быть причиной госпитальных инфекций (Fernandez et al., 2015). *P. putida* может образовывать биопленки на коже, изменять структуру эпидермиса (Fernandez et al., 2015). Хотя считается, что инфекции и бактеремии, вызываемые *P. putida*, довольно редки и случаются в основном у больных с ослабленным иммунитетом, уже есть данные о мультирезистентных штаммах *P. putida*, представляющих серьезную опасность (Molino et al., 2014; Hardjo Lugito et al., 2015). Например, известны штаммы *P. putida*, устойчивые к антибиотикам карбапенему, ципрофлоксацину (Kumita et al., 2009), цефепиму (Luczkiewicz et al., 2015) и некоторым другим бета-лактамам (Trevino et al., 2010). Известны случаи избыточного роста *P. putida* у больных с гангреной, вызванной диабетом, и осложнений, вызванных таким ростом (Hardjo Lugito et al., 2015).

P. fluorescens также является сапротрофным микроорганизмом, живущим в почве и воде, а также часто встречающимся в ризосфере растений и защищающим их от фитопатогенов (Kremmydas et al., 2013). Как и *P. putida*, *P. fluorescens* может колонизировать кожу человека и быть причиной инфекций, вызванных в том числе формированием биопленок (Scales et al.,

2014), и борьба с подобными инфекциями может быть осложнена по ряду причин. К примеру, есть данные об устойчивости *P. fluorescens* к ряду используемых в качестве антисептиков биоцидов, таких как глутаровый альдегид (Simoes et al., 2006), бензилметилдодecilаммоний (Ferreira et al., 2011). Есть данные об устойчивости *P. fluorescens* к ряду антибиотиков, таких как бета-лактамы (Vompard et al., 1988), цефалоспорины (Luczkiewicz et al., 2015). Показано, что загрязняющий атмосферу диоксид азота увеличивает устойчивость *P. fluorescens* к ципрофлоксацину и хлорамфениколу из-за увеличения экспрессии генов выкачивающих помп MexEF-OprN (Kondakova et al., 2016). Более того, на *P. fluorescens* показано, что ряд молекул, синтезируемых самим организмом человека, модулирует вирулентность и формирование биопленок, причем это могут быть соединения прямого антибактериального действия, так и традиционно не считающиеся защитными. К примеру, вещество P (нейропептид) увеличивает цитотоксичность *P. fluorescens*, а также, наряду с гормоном эпинефрином (адреналином), усиливает способность клеток к свормингу (Biaggini et al., 2015). Гормон серотонин увеличивает подвижность клеток *P. fluorescens* (свимминг, Biaggini et al., 2015). ГАМК в некоторых системах подавляет рост биопленок *P. fluorescens* (Dagorn et al., 2013). Если говорить об антибактериальных соединениях нашего организма, то стоит упомянуть недавно показанную способность β -дефензина-2 увеличивать вирулентность клеток *P. fluorescens* (Madi et al., 2013). Таким образом, несмотря на то, что *P. fluorescens* и *P. putida* традиционно считаются относительно безопасным ризосферным микроорганизмами по сравнению с *P. aeruginosa*, по-видимому, ряд молекул в организме человека способны взаимодействовать с ними, что говорит об универсальности механизмов взаимодействия между микроорганизмами-колонизаторами кожи и организмом человека. Поэтому необходимо исследовать влияние активных соединений, и, в частности, антибиотиков, на рост микроорганизмов, близких к широко распространенным и известным патогенам, например, таким как *Pseudomonas chlororaphis*.

P. chlororaphis – это ризосферный сапротрофный микроорганизм, родственник условно-патогенным штаммам псевдомонад, таким как *P. aeruginosa* и *P. fluorescens*, обитающим в том числе на коже человека (Mishra et al., 2009; Hesse et al., 2018). Опубликованы работы, посвященные генетике и регуляторным процессам в биопленках *P. chlororaphis*. К примеру, показана важность работы системы синтеза феназинов (Wang et al., 2016; Yu et al., 2018), регуляторной системы GacS/GacA (Li et al., 2015) и ацилгомосеринлактон-зависимой системы QS (Peng et al., 2018) для формирования биопленок. Однако, работ, посвященных воздействию активных соединений на рост биопленок *P. chlororaphis* обнаружено не было. Только Шепелевич с соавторами провели скрининг устойчивости культур *P. chlororaphis* к ряду антибиотиков и биоцидов с целью использовать в дальнейшем неэффективные из них как

гербициды, не подавляющие рост ризосферных *P. chlororaphis* (Шепелевич с соавт., 2012), однако, они не исследовали их воздействие на биопленки *P. chlororaphis*. Это делает данную работу оригинальной и актуальной.

1.2.3.2. *Micrococcus luteus*. *M. luteus* – это грамположительные неподвижные строго аэробные кокки, образующие тетрады и принадлежащие к филуму Actinobacteria (Hanafy et al., 2016). Сапротрофы, являются частью нормальной микробиоты кожи человека (Kloos et al., 1974, Daeschlein et al., 2012), локализуются преимущественно в роговом слое (Lange-Asschenfeldt et al., 2011). Также, *M. luteus* встречается в воде и почве (Mauclaire, Egli, 2010). Интерес к *M. luteus* проявлялся в конце 20 века, когда он был выделен с кожи человека. Описаны случаи бактеримии, вызываемой *M. luteus*, однако эти случаи были зафиксированы у людей с проблемами со здоровьем: при карциноме (Albertson et al., 1978) и при почечной недостаточности (Peces et al., 1997). В первом случае бактериемия развилась после хирургической операции, а во втором – вследствие заражения катетера *M. luteus* проникал в ослабленный организм после внешнего хирургического вмешательства. Позднее был описан случай эндокардита, вызванного *M. luteus* у пожилой женщины с ослабленным иммунитетом, перенесшей операцию по удалению рака груди и химиотерапию, принимавшей уколы препаратов (Miltiadous, Elisaf, 2011). Miltiadous, Elisaf утверждают в своей работе, что на момент ее создания в литературе они обнаружили всего 17 случаев эндокардита, вызванного *M. luteus*. Это свидетельствует об относительной безопасности *M. luteus* для здорового человека, но, тем не менее, некоторые исследователи считают его потенциальным условным патогеном (Mauclaire, Egli, 2010). В 2010 году был секвенирован геном *M. luteus* (Young et al., 2010). Результаты секвенирования показали, что *M. luteus* является представителем группы свободноживущих бактерий с наименьшим размером генома (около 2.5 млн. пар оснований). Это налагает целый ряд метаболических ограничений на микроорганизм, к примеру, неспособность расти на среде с глюкозой как единственным источнике углерода. Авторы полагают, что подобное сокращение генома могло быть адаптацией к экологической нише *M. luteus* на коже человека.

Биопленки *M. luteus* также исследованы слабо, по-видимому, низкий интерес исследователей можно объяснить относительной нейтральностью *M. luteus* и его безопасностью для здорового человека. К примеру, проводились исследования по детекции формирования биопленок *M. luteus* в системе микрофлюидики с помощью определения уровня pH среды (Matsuura et al., 2013), где *M. luteus* был взят в качестве модельного объекта. Была показана высокая активность кумаринов против культур *M. luteus* (Emmadi et al., 2014), однако, авторы не представили данных по их антибиопленочной активности. Интересная работа по сравнению роста культур и биопленок *M. luteus* в условиях нормальной гравитации и микрогравитации

МКС была проведена Mauclaire, Egli, 2010, в которой авторы продемонстрировали, что *M. luteus* в условиях микрогравитации лучше растет в планктонной культуре и хуже образует биопленки по сравнению с земными условиями, синтезирует меньше матрикса (коллоидных полисахаридов и белков), а поверхность его клеток становится более гидрофобной в условиях МКС.

Как и другие кожные микроорганизмы, *M. luteus* может подвергаться действию антибиотиков, принимаемых человеком, однако работ, посвященных устойчивости *M. luteus* к антибиотикам, мало. Есть данные об активности против *M. luteus* некоторых хинолоновых антибиотиков, которые блокируют активность ДНК-гиразы (Zweerink, Edison, 1986). Имеются данные об обусловленной плазмидой рMEC2 устойчивости к макролидным антибиотикам *M. luteus*, выделенного с кожи человека (Liebl et al., 2002). Плазида кодирует фактор устойчивости пептидной природы, имеющий 50-54% сходства с таковыми у условно патогенных грамположительных бактерий с высоким содержанием Г-Ц пар *Corynebacterium* и *Cutibacterium* (в старой номенклатуре *Propionibacterium*), из-за чего авторы предполагают возможную роль непатогенного *M. luteus* в горизонтальном переносе генов устойчивости к антибиотикам. Данных о взаимодействии *M. luteus* с регуляторными или иными молекулами организма человека на момент написания работы найдено не было.

M. luteus может представлять интерес для исследователей как потенциальный источник биотоплива в виде биологически синтезируемых алкенов, поскольку обладает соответствующим набором генов метаболизма аминокислот и жирных кислот (Young et al., 2010; Surger et al., 2018). Малый интерес к *M. luteus* с медицинской точки зрения также может быть неоправданным, поскольку в настоящее время продемонстрирована кератинолитическая активность *M. luteus*, выделенного из отходов птицефабрик (Laba et al., 2015). Это логично сочетается с фактом обитания *M. luteus* в роговом слое кожи, что позволяет предполагать его потенциальную роль на коже в процессах формирования ороговевших участков. Также, клетки *M. luteus* могут служить липосомоподобными капсулами для хлоргексидина, защищающими его от разложения внутри нейтрофилов (Wendel et al., 2015). *M. luteus* в этой системе служит «контейнером» для доставки хлоргексидина в нейтрофилы и сохранения его там в течение некоторого времени. После разрушения клеток *M. luteus* хлоргексидин служит дополнительным инструментом борьбы нейтрофилов против патогенов, таких как *Fusobacterium necrophorum*.

1.2.3.3. *Kytococcus schroeteri*. Род *Kytococcus* был выделен из рода *Micrococcus* в 1995 году. От *M. luteus* род *Kytococcus*, кроме филогенетических различий, отличается набором менахинонов (MX 7, 8, 9 и 10, у *M. luteus* – MX8 и MX8-H₂), составу пептидных мостиков в пептидогликане, набором полярных липидов и процентным соотношением Г-Ц-пар в геноме (*Kytococcus* – 68-69%, *M. luteus* – 70-76%, Stakebrandt et al., 1995; Becker et al., 2002). Род

состоит из трех видов – *K. schroeteri*, *K. sedentarius*, *K. aerolatus*, а название рода буквально переводится как «кожные кокки» (Chan et al., 2012). *K. shroeteri* был выделен в 2002 году из крови пациента, больного эндокардитом (Becker et al., 2002) и назван в честь немецкого микробиолога и миколога Йозефа Шрётера. *K. shroeteri* обитает на коже человека, однако, зарегистрировано много клинических случаев эндокардита после вживления искусственного клапана или шунта в сердце (Aepinus et al., 2008; Yousri et al., 2010; Schaumburg et al., 2013). Отмечается устойчивость *K. shroeteri* к антибиотикам бета-лактамной природы (Aepinus et al., 2008; Schaumburg et al., 2013). Описаны клинические случаи заражения и последующих инфекций и осложнений, вызванных *K. schroeteri*, у пациентов с плечевыми имплантатами (Chan et al., 2012), а также случаи бактериемий у пациентов, больных лейкемией (пневмония (Blennow et al., 2012; Amaraneni et al., 2015), язвы и корковые папулы на коже (Nagler et al., 2011)). Образование папул и язв на коже вследствие китоккокковой инфекции представляется логичным, поскольку *K. schroeteri* близок к *M. luteus*, а последний может обладать кератинолитической активностью. Как и в случае *M. luteus*, как правило, подобные проблемы возникают у людей с ослабленной иммунной системой: перенесших операцию по вживлению имплантата или же прошедших курс химиотерапии против рака.

Данных о сигнальном взаимодействии *K. schroeteri* и организма человека (в частности, кожи) на момент подготовки настоящей работы обнаружено не было. Также, не было обнаружено работ, посвященных биопленкам *K. schroeteri* и воздействию на них активных соединений, что делает данную работу актуальной.

1.2.3.4. *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* или золотистый стафилококк – это грамположительные неподвижные каталазо-положительные факультативно анаэробные (Masalha et al., 2001) кокки, способные осуществлять нитратное и нитритное дыхание (Balasubramanian et al., 2017). Если синегнойная палочка *P. aeruginosa* считается наиболее распространенным возбудителем госпитальных и прочих инфекций среди грамотрицательных бактерий, то *S. aureus* может считаться если не самым главным, то как минимум одним из главных грамположительных патогенов человека и возбудителей нозокомиальных инфекций (Green et al., 2012). По этой причине, а также по причине быстрого роста, относительной простоты в обращении и все же относительно низкой опасности для человека (по сравнению с другими патогенами вроде *Bacillus anthracis*), *S. aureus* является одним из модельных объектов для изучения грамположительных бактерий и их биопленок. Золотистый стафилококк является причиной от 10 до 30 случаев бактериемий на 100000 жителей в развитых странах в год (Tong et al., 2015). Инфекции, вызываемые *S. aureus*, могут поражать разные органы и области организма человека: дыхательную систему, искусственные имплантаты, катетеры (Tong et al., 2015), кишечник (Thippeswamy et al., 2011). К примеру, колонизация и образование биопленок

S. aureus на поверхности венозных катетеров и катетеров для гемодиализа приводит к заражению крови, что в сочетании с высокой устойчивостью клеток в составе биопленки к антибактериальным соединениям осложняет процесс лечения (Tran et al., 2012).

Несмотря на очевидную опасность для здоровья человека, у части здорового населения (до 30% взрослых и до 70% детей) *S. aureus* является компонентом нормальной микробиоты кожи, предпочитающим увлажненные участки и слизистые, в основном – кожу вокруг ноздрей и слизистую носа (Balasubramanian et al., 2017). Также, *S. aureus* у здоровых людей может колонизировать кожу подмышечных впадин, паха, рук, груди и живота (Otto, 2010). Если говорить о нишах, занимаемых *S. aureus* на коже человека, то это, как правило, уже упомянутые слизистые, полости потовых желез (Otto, 2010) и волосяных фолликулов (Ten Broeke-Smits et al., 2010). Микроорганизмы на коже формируют биопленки в своих микронишах, и *S. aureus* не исключение (Ten Broeke-Smits et al., 2010; Jahns et al., 2012; Khorvash et al., 2012; Matard et al., 2013). В случае некоторых заболеваний кожи, таких как псориаз, розацеа (Totte et al., 2016), атопический дерматит (Hong et al., 2011) наблюдается обильный рост *S. aureus* и образование биопленок (Allen et al., 2014). Например, в случае атопического дерматита биопленки *S. aureus* развиваются в протоках потовых желез, что приводит к их закупорке и дальнейшим осложнениям (Allen et al., 2014). Неоднократно показано образование биопленок *S. aureus* на поверхности кожных ран, что приводит к воспалению, осложнениям и замедлению заживления (Estes, 2011).

Биопленкам *S. aureus* в настоящее время посвящено и посвящается много работ по описанным выше причинам. Подробно исследован состав матрикса биопленок *S. aureus*, состоящий из полисахаридов, белков и внеклеточной ДНК (Lister, Horswill, 2014). Исследована система QS *S. aureus*, в которой главную роль играет аутоиндукторный пептид, состоящий из тиолактонного кольца и N-концевого линейного участка; рецептором для пептида является мембранная гистидинкиназа ArgC, фосфорилирующая в свою очередь регуляторный белок ArgA (Kim et al., 2017). Довольно подробно исследованы сигнальные пути, работающие в процессе образования биопленок *S. aureus* и в которых задействованы сигма-фактор В, вспомогательный регулятор стафилококков SarA, регулятор MgrA и другие молекулы (Arciola et al., 2012). Исследовались рост биопленок *S. aureus* и их структура (van de Belt et al., 2001; Archer et al., 2011).

Поскольку золотистый стафилококк является причиной госпитальных инфекций и целого ряда других заболеваний, а также является обитателем кожи человека, он подвергается действию антибиотиков, что нередко приводит к возникновению устойчивости к ним. Большую опасность представляет собой метициллинрезистентный *S. aureus* (meticillin-resistant *S. aureus*, MRSA), устойчивый к бета-лактамам благодаря наличию лактамаз (Green et al.,

2012). Годовое количество случаев инфекций, вызываемых MRSA, в США составляло в середине нулевых порядка ста тысяч, а смертность – более 18 тысяч, что ставило MRSA на первое место среди всех возбудителей инфекций, выше СПИДа и туберкулеза (Green et al., 2012). Известно о случаях устойчивости *S. aureus* к другим антибиотикам: левофлоксацину, хлорамфениколу, цефокситину, ципрофлоксацину, гентамицину, тетрациклину и сульфаметоксазол-триметоприму, ванкомицину и доксициклину (Akanbi et al., 2017). Одним из механизмов устойчивости являются выкачивающие помпы множественной устойчивости (multidrug-resistance efflux pumps), такие как Nor-помпы, Sdr, TetA и Tet38 (тетрациклин-выкачивающие помпы), LmrS, Qac и другие (Andersen et al., 2015). На *S. aureus* показано стимулирующее вирулентность и рост биопленок действие субингибиторных концентраций антибиотиков. Так, бета-лактамы увеличивают гемолитическую активность *S. aureus* через усиление экспрессии двухкомпонентной системы SaeRS (Kuroda et al., 2007), регулирующей синтез фибронектин-связывающего белка, нуклеаз, коагулаз и гемолизина (Kuroda et al., 2007). У некоторых штаммов MRSA цефтаролин (цефалоспориин 5-го поколения) в субингибиторных концентрациях стимулирует рост биопленок, в частности, за счет увеличения экспрессии генов *agrA* (фактор транскрипции, регулирующий вирулентность, система QS) и *icaA* (синтез поли-N-ацетилглюкозамина (ПНАГ) или полисахаридного межклеточного адгезина), но корреляция между экспрессией данных генов и стимуляцией роста биопленок наблюдается не во всех случаях (Lazaro-Diez et al., 2016). Также, экспрессию генов *agr* у некоторых штаммов MRSA в субингибиторных концентрациях повышают подавляющие синтез белка клиндамицин и тетрациклин, что ведет к увеличению вирулентности и к осложнению MRSA-инфекций (Joo et al., 2010). Клиндамицин в субингибиторных концентрациях также увеличивает экспрессию целого ряда генов, регулирующих формирование биопленок. Это гены фибронектин-связывающих белков (Fnb), фенол-растворимые модулины (psm), гидролазы муреина (AtlA) и других (Schilcher et al., 2016). Эффект стимуляции роста биопленок некоторых штаммов MRSA также показан для ванкомицина и азитромицина в субингибиторных концентрациях (Majidpour et al., 2017). Однако, у других штаммов MRSA азитромицин в субингибиторных концентрациях подавляет синтез α -гемолизина и рост биопленок в целом (Gui et al., 2014), причем антибиопленочный эффект может быть усилен добавками, такими как, к примеру, акриловый полимер DuraSite® (Wu et al., 2010). Подобные противоречивые сведения говорят о сложности процессов образования биопленок и требуют более глубоких исследований воздействия антибиотиков на *S. aureus* и MRSA в частности.

Как и в случае *P. aeruginosa*, по-видимому, важную роль в устойчивости биопленок к антибиотикам и взаимодействию с ними у *S. aureus* играют системы QS. Помимо уже описанной выше *agr*-системы QS, у *S. aureus* существует также система QS RAP/TRAP, которая

воздействует на оперон *agr*, который в том числе регулирует синтез клеточных стенок (Brackman et al., 2016). При подавлении действия системы RAR/TRAP, к примеру, при помощи гамамелитанина (2,5-ди-О-галлоил-D-гамамелозы), взаимодействующим с рецептором TraP, опосредованно увеличивается синтез клеточных стенок и, следовательно, снижается количество внеклеточной ДНК, которая является важным фактором устойчивости к ряду антибиотиков, что приводит в итоге к увеличению чувствительности биопленок *S. aureus* к ряду антибиотиков, например, к ванкомицину (Brackman et al., 2016). Недавно найденное соединение савирин (*S. aureus* virulence inhibitor) или 3-(4-пропан-2-илфенил)-сульфонил-1H-триазоло-(1,5-а)-хиназолин-5-он существенно подавляет вирулентность *S. aureus* и облегчает борьбу иммунной системы против него посредством ингибирования *agr*-системы QS (Sully et al., 2014).

Некоторое количество исследований посвящено влиянию компонентов косметики на биопленки *S. aureus*. Например, экстракт незрелых плодов грецкого ореха (*Juglans regia*), применяемый в изготовлении красок для волос, подавляет способность к адгезии и образование биопленок *S. aureus* (Quave et al., 2008). Экстракт из листьев каштана посевного (*Castanea sativa*), содержащий пентациклические тритерпены, подавляет формирование биопленок *S. aureus* путем нарушения работы *agr*-системы QS. Природный сурфактант монолаурат глицерина, используемый в косметике, также ингибирует рост биопленок *S. aureus* (Schlievert, Peterson, 2012; Hess et al., 2015). Эвгенол (4-аллил-2-метоксифенол), компонент гвоздичного масла, используемый в косметике, в субингибиторных концентрациях подавляет рост биопленок *S. aureus* и экспрессию генов, отвечающих за рост биопленок, а также препятствует колонизации слизистых *S. aureus in vivo* (Yadav et al., 2015). При минимальной ингибирующей концентрации и выше эвгенол ускоряет разрушение зрелых биопленок, вызывает деформацию клеток, способствует разрушению клеточных мембран и выходу клеточного содержимого наружу (Yadav et al., 2015). Сочетание эвгенола с карвакролом (компонент органо) обладает синергидным эффектом (Yadav et al., 2015). Карвакрол сам по себе обладает антимикробным и антибиопленочным действием на *S. aureus* (Knowles et al., 2005). Причем в бинарных биопленках с *S. enterica* серовар *typhimurium* на начальных этапах роста биопленки карвакрол эффективнее подавляет *S. aureus*, а на стадии зрелой бинарной биопленки – *S. enterica* ser. *typhimurium*; ключевую защитную роль играют внеклеточные полисахариды матрикса *S. aureus* (Knowles et al., 2005). Масло из коры циннамона, в состав которого входят фенольные соединения, обладает антибактериальной активностью против *S. aureus* и ряда других микроорганизмов (Nabavi et al., 2015). Масло ветивера (*Chrysopogon zizanioides*), широко применяемое в парфюмерии, оказывает антибактериальное и антибиопленочное действие на *S. aureus* (Burger et al., 2017). В результате исследований в рамках настоящей диссертации показано, что косметическое средство Термальная вода Уриаж™ и компонент

косметических препаратов олигосахарид PS291® или Тефлоза® оказывают значительное антибиопленочное действие на *S. aureus* без токсического эффекта на клетки бактерий: по-видимому, данные соединения нарушают адгезию клеток к поверхности и друг к другу (Gannesen et al., 2018).

Tween 80, широко используемый как в лабораторных исследованиях, так и в составе косметических средств в качестве эмульгатора, стимулирует рост биопленок и планктонных культур *S. aureus*, вероятно, за счет своих поверхностно-активных свойств делая мембраны клеток более проницаемыми, а питательные вещества и ионы – более доступными для бактерий (Nielsen et al., 2016). По результатам других исследователей 0.01% Tween 80 в среде ингибирует рост *S. aureus* и *P. aeruginosa* (Toutain-Kidd et al., 2009), что требует, по-видимому, более глубокого исследования данного вопроса. Тем не менее, вероятно, эффект Tween 80 может быть штаммоспецифичным. Бицид триклозан (компонент косметических средств) в субингибиторных концентрациях стимулирует проявление особого фенотипа у *S. aureus* – фенотипа малых колоний (small colonies variants, SCV, Forbes et al., 2015). Триклозан-обусловленный фенотип SCV отличается низким ростом биопленок, пониженной вирулентностью и пигментацией колоний, устойчивостью к триклозану и увеличенной чувствительностью к антибиотикам: тетрациклину, канамицину, ампициллину и др. (Forbes et al., 2015). Компоненты косметических средств могут выступать не только как ингибиторы роста биопленок *S. aureus* и его сигнальных систем, но и как модификаторы метаболизма без выраженного антибактериального действия. Так, к примеру, экстракт корня солодки подавляет синтез *S. aureus* диацетила – основного фактора, обуславливающего неприятный запах пота (Nara et al., 2014). Экстракт корня солодки частично подавляет мембранную лактатдегидрогеназу (ЛДГ), нарушая синтез пирувата, участвующего в последующих реакциях синтеза ацетоина и диацетила. α -токоферил-L-аскорбат-2-O-фосфатдизфир-натриевая соль или ЕРС-1К наравне с экстрактом корня солодки частично подавляет активность ЛДГ, но помимо этого она частично нарушает работу фумаратдегидрогеназного комплекса и малонил-КОА-синтазы (Nara et al., 2014).

Взаимодействие эндогенных регуляторных факторов человека и *S. aureus* исследованов ряде работ. Поскольку, как и предыдущие микроорганизмы, *S. aureus* обитает на коже человека, он постоянно подвергается воздействию разнообразных активных соединений. Рассмотрим те из них, которые не обладают прямым антимикробным назначением, поскольку, к примеру, дефензины и кателицидины оказывают прямой антимикробный эффект на *S. aureus* (Brown et al., 2013). Уже в конце прошлого века было показано, что колонизация *S. aureus* слизистой оболочки ноздрей коррелирует с уровнем эстрогена у женщин: чем выше кариопикнотический индекс (а, следовательно, и уровень эстрогена), тем выше процент носителей *S. aureus* среди

женщин (Winkler et al., 1990). Позднее было показано, что использование гормональных контрацептивов, состоящих из эстрогенов и прогестинов, также повышает процент носительства *S. aureus* на слизистой носа у женщин (Zanger et al., 2012), что подтверждает идею о положительном влиянии эстрогенов на колонизацию слизистых *S. aureus*. Так, к примеру, эпинефрин стимулирует рост *S. aureus* в модельной системе инфицированной кожной раны у свиньи (Stratford et al., 2002). Катехоламины (эпинефрин, норэпинефрин) замещают недостаток лигандов и переносчиков железа у мутантных штаммов *S. aureus*, лишенных стафилоферрина – стафилококкового сидерофора (Beasley et al., 2011). Альфа-меланоцитстимулирующий гормон оказывает антимикробное и антибиопленочное действие на *S. aureus*, в том числе на MRSA, в системе *in vitro* (Madhuri et al., 2009). Вещество Р (нейропептид, выделяемый нервными окончаниями в коже, Severini et al., 2002) повышает синтез энтеротоксина стафилококка С2 и способность *S. aureus* к адгезии к кератиноцитам; мишенью для вещества Р у *S. aureus* является фактор элонгации EF-Tu (N'Diaye et al., 2016). Ранее были получены данные об отсутствии антибактериальной активности вещества Р и нейропептида Y в отношении *S. aureus* (Hansen et al., 2006; Karim et al., 2008) хотя данные пептиды, а также кальцитонин-ген-связанный пептид обладают антибактериальным действием на ряд других микроорганизмов, таких как *P. aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* (Karim et al., 2008). Кортикостероиды оказывают подавляющее действие на рост *S. aureus*. Так, сочетание антибиотика мупироцина и бутирата гидрокортизона эффективно снижает количество *S. aureus* на пораженных экземой или атопическим дерматитом участках кожи (Gong et al., 2006). *In vitro* ряд синтетических кортикостероидов (флютиказон, мометазон, будесонид) оказывают антимикробное и антибиопленочное воздействие на *S. aureus* (Goggin et al., 2013).

В результате исследований в рамках настоящей диссертации показано, что натрийуретические пептиды человека оказывают значительное влияние на рост биопленок *S. aureus* и *S. epidermidis* (Ганнесен с соавт., 2018). Эффект натрийуретических пептидов на микроорганизмы зависит от условий культивирования: при 37°C рост моновидовых биопленок *S. epidermidis* стимулируется, а *S. aureus* – ингибируется, что выражается в изменении толщины и биомассы биопленок. При 33°C эффект натрийуретических пептидов на *S. epidermidis* меняется на противоположный. В бинарной биопленке при 37°C натрийуретические пептиды способны увеличивать конкурентную способность *S. epidermidis* в отношении *S. aureus*. Эффект натрийуретических пептидов проявляется в первую очередь для биопленок и в меньшей степени для планктонных культур, что позволяет говорить о натрийуретических пептидах как о молекулах, регулирующих взаимоотношения организма человека и кожной микробиоты (Ганнесен с соавт., 2018).

1.2.3.5. *Staphylococcus epidermidis*. *S. epidermidis* – это еще один представитель рода *Staphylococcus*, один из наиболее часто встречающихся на коже человека микроорганизмов, колонизирующий в основном увлажненные и сальные участки кожи – подмышки, голову, слизистые (Otto, 2009). *S. epidermidis* теснейшим образом связан с человеком и его кожей. Это, как считается в настоящее время, первый микроорганизм, с которым сталкивается плод, еще будучи в утробе, что доказано обильным присутствием *S. epidermidis* в амниотической жидкости и меконии (Bresco et al., 2017). Также, *S. epidermidis* – один из первых микроорганизмов, колонизирующих кожу новорожденного (Bresco et al., 2017). *S. epidermidis* входит в группу коагулазо-негативных стафилококков, которые отличаются от коагулазо-позитивных стафилококков, к которым принадлежит *S. aureus*, отсутствием коагулаз (Otto, 2009). *S. epidermidis* обладает рядом полезных свойств для кожи человека. К примеру, *S. epidermidis* выделяет соединения, которые увеличивают способность кератиноцитов противостоять инфекциям *S. aureus*, стрептококков группы А (благодаря усилению синтеза β -дефензинов). Механизм стимуляции синтеза β -дефензинов заключается в том, что липопептиды *S. epidermidis* взаимодействуют с TLR2-рецепторами, которые запускают каскад реакций (Lai et al., 2010). Также, показано, что *S. epidermidis* на коже выделяет 6-N-гидроксиаминопурин – соединение, подавляющее рост опухолей, образующихся в результате воздействия ультрафиолетового излучения (Nakatsuji et al., 2018). *S. epidermidis* выделяет ряд соединений, обладающих противомикробным эффектом. Показано, что *S. epidermidis* может подавлять метаболическую активность и экспрессию ряда генов у *S. aureus*, если микроорганизмы растут в бинарной биопленке (Vandecandelaere et al., 2017), что говорит о потенциальной антибактериальной активности *S. epidermidis*. Дельта-лизин E229DL, выделяемый *S. epidermidis*, обладает сравнительно малой токсичностью для человека, но хорошо действует против *S. aureus* (Al-Mahrous et al., 2010). Пептид 487, синтезируемый *S. epidermidis*, и кодируемый геном *hlp*, гомологичен гемолизинам, но менее токсичен и обладает антимикробной активностью (Al-Mahrous et al., 2011). *S. epidermidis* продуцирует ряд лантибиотиков (Per5, эпиланцин K7 и эпицидин 280), которые подавляют рост MRSA и ряда коагулазо-негативных стафилококков, ассоциированных с заболеваниями человека (Christensen, Bruggemann, 2014). Антимикробная активность *S. epidermidis* проявляется также тем, что он способен выделять в ходе метаболизма короткоцепочечные жирные кислоты, в особенности, сукцинат, который эффективно подавляет рост *Cutibacterium acnes* и снижает воспаление, вызываемое *C. acnes* в язвочках на коже *in vivo* (Wang et al., 2014), что позволяет рассматривать *S. epidermidis* как потенциальный кожный пробиотик. Также, *S. epidermidis* образует глицерин, который поддерживает нужный уровень увлажненности кожи, слабнокислый уровень pH и улучшает текстуру кожи (Nodake et al., 2015). Помимо этого, супероксиддисмутаза *S.*

epidermidis обладают защитным действием против активных форм кислорода, что также благоприятствует коже (Nodake et al., 2015). *S. epidermidis* также стимулирует синтез NO в эпителии кожи – соединение, усиливающее сопротивляемость кожи инфекциям (Carey et al., 2016). Стимуляция происходит за счет некоего малого соединения непептидной природы, выделяемого клетками стафилококков. Аналогичный эффект, но более сильный, оказывает и *S. aureus* (Carey et al., 2016).

Однако, несмотря на ряд полезных свойств, *S. epidermidis* считается условным патогеном, вызывающим ряд заболеваний и госпитальных инфекций, хотя и не таким опасным, как *S. aureus* (Otto et al., 2009). Чаще всего заболевания, вызываемые *S. epidermidis*, случаются в случае заражения искусственных имплантатов вследствие недостаточной стерильности операций. *S. epidermidis* образует биопленки на поверхности искусственных имплантатов, что приводит к обрастаниям и инфекциям венозных катетеров, костных имплантатов, искусственных клапанов сердца (Schommer et al., 2011), и образование биопленок является первой из двух главных причин опасности *S. epidermidis* (Saffari et al., 2016). От 50 до 70% всех инфекций искусственных имплантатов центральной нервной системы вызываются *S. epidermidis* (Schaeffer et al., 2015), и некоторые исследователи называют *S. epidermidis* одним из ключевых возбудителей подобных инфекций (Wang et al., 2010). В целом же до 20% всех случаев заражения искусственных имплантатов приходится на *S. epidermidis*, причем *S. epidermidis* служит причиной до 50% инфекций имплантов, развивающихся с задержкой во времени (Bresco et al., 2017). Если говорить о коже, то *S. epidermidis* также может обильно расти на пораженных атопическим дерматитом участках кожи: частота его появления равна примерно 30-40%, тогда как в остальных случаях атопического дерматита преобладает *S. aureus* (Hon et al., 2016). Опасность *S. epidermidis* заключается в образовании биопленок, которые, как и в случае других микроорганизмов, описанных ранее, устойчивы к антимикробным соединениям и серьезно затрудняют лечение. В процессе формирования биопленок *S. epidermidis*, в частности, на поверхности имплантатов, ключевую роль играют полисахаридный внеклеточный адгезин (как и у *S. aureus*) и внеклеточные белки Embp и Aap – адгезины, ответственные за прикрепление клеток к поверхности и друг к другу (Schommer et al., 2011). Также, на начальных этапах адгезии важную роль играют белок Bhp (Bar homologue protein) и автолизин-адгезин AltE (Salgueiro et al., 2017). В составе биопленок *S. epidermidis* также более устойчив к действию иммунной системы человека: биопленки *S. epidermidis* вызывают меньший по интенсивности синтез интерлейкина 1 β , меньшую активацию фактора NF- κ B и меньшую активность макрофагов по сравнению со штаммами *S. epidermidis*, не способными образовывать полноценные биопленки (Schommer et al., 2011). *S. epidermidis* обладает сходным по потенциалу с таковы у *S. aureus* арсеналом факторов вирулентности. Факторами вирулентности *S.*

epidermidis являются, как и в случае *S. aureus*, ряд соединений разного назначения. Это внеклеточные адгезины (полисахариды, белки, прикрепляющиеся к эластинам и фибронектину), токсины (провоспалительные цитолизины), внеклеточные ферменты протеазы и липазы, ферменты лизиса антимикробных пептидов и прочие (Otto, 2012). Также, *S. epidermidis* образует поли- γ -глутаминовую кислоту – фактор вирулентности, подавляющий синтез антимикробных пептидов и фагоцитоз (Kleinschmidt et al., 2015). Синтез многих факторов вирулентности, как показывают клинические исследования, ассоциирован именно с ростом *S. epidermidis* в форме биопленок при имплантат-ассоциированных инфекциях. К примеру, фенол-растворимые модулины, синтезируемые *S. epidermidis* в составе биопленок на имплантатах, могут вызывать лизис нейтрофилов, что также осложняет течение заболевания (Cheung et al., 2010). Липотейхоевая кислота *S. epidermidis* стимулирует выделение фактора некроза опухолей и интерлейкина 1 – соединений, индуцирующих гемодинамический шок и повреждение тканей при бактериемиях и сепсисах (Wakabayashi et al., 1991).

Следствием заражения имплантатов биопленками *S. epidermidis* может быть бактериемия, трудно поддающаяся лечению. Если говорить о воздействии антибиотиков на *S. epidermidis*, то по некоторым подсчетам вплоть до 80% штаммов *S. epidermidis*, образующих биопленки на имплантируемых устройствах, являются мультирезистентными (Kleinschmidt et al., 2015). Пониженная чувствительность *S. epidermidis* к антибиотикам, все чаще встречающаяся в клинической практике, является второй главной причиной опасности *S. epidermidis* для здоровья человека (Saffari et al., 2016). Один из распространенных мультирезистентных генотипов – *S. epidermidis* ST2, изолированный из кровотока больных с сепсисом, из коленных имплантов, ткани межпозвоночных дисков (Widerstrom et al., 2012), а также трахейных трубок (Saffari et al., 2016). По результатам анализа, генотип ST2 – это метициллин-резистентные *S. epidermidis* (устойчивость обуславливается наличием пенициллин-связывающих белков), устойчивые также к оксациллину, хлорамфениколу, ципрофлоксацину, клиндамицину, эритромицину, мупироцину, гентамицину и триметропим-сульфаметоксазолу (Iogio et al., 2012). Особую опасность представляют собой ST-штаммы (не только ST2, но и другие), которые приобретают т.н. гетероустойчивость к ванкомицину – антибиотику, широко используемому в терапии инфекций, вызываемых MRSA и мультирезистентными *S. epidermidis* (MRSE, van Hal, Fowler, 2013). Гетероустойчивость к антибиотику – это явление, при котором клетки микроорганизма из одной субпопуляции проявляют разную устойчивость к антибиотику (El-Halfawy, Valvano, 2015). Ванкомицин-гетерорезистентные MRSE в настоящее время считаются одними из главных возбудителей инфекций кровотока, особенно опасных для недоношенных новорожденных в реанимации (Chong et al., 2016). Имеются данные о существовании азитромицин-устойчивых штаммов *S. epidermidis*, причем, как показывают исследования,

комбинация азитромицина с другими антибиотиками подавляет рост бактерий, но не влияет на сформированные биопленки (Presterl et al., 2009).

Показано, что субингибиторные концентрации ряда антибиотиков способны стимулировать рост биопленок *S. epidermidis*. Тигециклин и цiproфлоксацин увеличивают экспрессию генов *icaA*, *altE*, *sigB* (регуляторный сигма-фактор В), кодирующих факторы биопленочного фенотипа (Szczyka et al., 2017). Эритромицин, тетрациклин и синтетический стрептограмин в субингибиторных концентрациях увеличивают экспрессию оперона *ica* и образование биопленок *S. epidermidis* (Rachid et al., 2000). Ванкомицин в субингибиторных концентрациях ослабляет рост биопленок *S. epidermidis*, однако, при этом в биопленках в десятки раз возрастает концентрация внеклеточной ДНК в матриксе, что может быть причиной устойчивости биопленок *S. epidermidis* к ванкомицину, поскольку внеклеточная ДНК является молекулярной ловушкой для антибиотика (Doroshenko et al., 2014). Азитромицин в субингибиторных концентрациях также может стимулировать рост биопленок *S. epidermidis* у штаммов, обладающих опероном *icaABCD* и не штаммов-мутантов по нему (Wang et al., 2010), однако, у диких по оперону *icaABCD* штаммов стимуляция происходит эффективнее (Wang et al., 2010), что говорит о нескольких ключевых процессах, являющихся «мишенями» антибиотика в клетках. В работе Eroshenko et al. показана ингибиторный эффект N-ацетилглюкозамина на рост биопленок *S. epidermidis* (Eroshenko et al., 2017): субингибиторные концентрации этого вещества стимулируют рост. Интересно, что мутантный штамм, не способный синтезировать полисахаридный внеклеточный адгезин, более устойчив к действию N-ацетилглюкозамина, поскольку данное соединение обладает муколитическим действием (Eroshenko et al., 2017).

Говоря о косметологических аспектах *S. epidermidis*, стоит отметить, что данный микроорганизм является продуцентом диацетила наравне с *S. aureus*, вносящим свой вклад в неприятный запах пота (Hara et al., 2014). И, аналогично *S. aureus* синтез диацетила эффективно подавляют соединения экстракта корня солодки и ЕРС-1Кб уже упомянутые выше (см. раздел 1.2.3.4., Hara et al., 2014). Показано, что экстракты ряда растений сухих лесов Каатинги в Бразилии обладают антимикробным и антибиопленочным эффектом на *S. epidermidis* (Trentin et al., 2011). Алкалоид берберин, выделяемый из китайского коптиса (*Coptidis rhizoma*) и барбариса (*Berberis vulgaris*) и потенциально эффективный в качестве компонента косметики (Lee et al., 2018), обладает антимикробным и антибиопленочным эффектом на *S. epidermidis* (Wang et al., 2009). Также показано, что берберин нарушает адгезию клеток *S. epidermidis* к титановым поверхностям, что делает его потенциальным агентом для обработки имплантатов, т.к. берберин безопасен для человека в низких концентрациях (Wang et al., 2009a). Экстракт болотной мяты (*Mentha pulegium*), состоящий преимущественно из

пиперитона, пиперитенона, α -терпинеола и пулегона – веществ, применяющихся в парфюмерии, обладает сильным антимикробным эффектом на *S. epidermidis* и *S. aureus* (Mahboubi, Naghi, 2008). Эфирное масло орегано (душица обыкновенная - *Origanum vulgare*), включающее в себя карваклол и тимол – соединения, применяющиеся в парфюмерии, обладает также сильным антибактериальным и антибиопленочным эффектом на *S. epidermidis* и *S. aureus*, однако, биопленки в несколько раз более устойчивы к ингибиторному воздействию, нежели планктонные клетки (Nostro et al., 2007). Масло орегано эффективно как против метициллин-чувствительных штаммов, так и против метициллин-устойчивых (Nostro et al., 2004). Антибиопленочный эффект на *S. epidermidis* оказывает Tween 80 (Toutain-Kidd et al., 2009). Хитозан низкой вязкости, используемый в косметологии, обладает антимикробным и антибиопленочным эффектом на *S. epidermidis*. Аналогично *S. aureus*, устойчивый к метициллину *S. epidermidis*, чувствителен к эфирному маслу ветивера (Burger et al., 2017).

Взаимодействию *S. epidermidis* и регуляторных систем организма человека посвящен ряд работ, однако, их меньше, чем в случае *S. aureus*. Аналогично, рассмотрим только соединения, которые ранее не считались антибактериальными. Кальцитонин-ген-связанный пептид (КДПГ) увеличивает адгезию клеток *S. epidermidis* к кератиноцитам, а также увеличивает способность *S. epidermidis* стимулировать синтез интерлейкина 8. Эффект КДПГ исчезает при блокировке механочувствительных ионных каналов хлоридом гадолиния (N'Diaye et al., 2016). Шаперон DnaK является рецептором КДПГ у *S. epidermidis* (N'Diaye et al., 2016a). Рост биопленок *S. epidermidis* стимулируется веществом P, и подобно *S. aureus*, мембранная форма фактора элонгации EF-Tu у *S. epidermidis* является рецептором вещества P (N'Diaye et al., 2016). При этом, вещество P обладает широким спектром действия: влияние вещества P исследовано для грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (N'Diaye et al., 2016). Инотропные гормоны катехоламиновой природы стимулируют рост биопленок *S. epidermidis* и стимулируют синтез экзополисахаридов матрикса (Lyte et al., 2003).

1.2.3.6. *Cutibacterium acnes*. *C. acnes*, ранее относившийся к роду *Propionibacterium* (Scholz, Kilian, 2016) – обычный представитель кожной микробиоты человека. Для некоторых участков кожи это единственный микроорганизм, который можно с нее высеять., *C. acnes* коэволюционировал с человеком, и его присутствие на коже может быть результатом этого процесса (Christensen, Bruggemann, 2014). Положительный эффект *C. acnes* на организм человека к примеру, показан на примере борьбы с раком груди (лабораторная модель на мышах.): *C. acnes* в сочетании с мелатонином стимулирует некроз опухоли, подавляет избыточный ангиогенез и стимулирует Th1-цитокин-опосредованный противоопухолевый ответ (Talib, Saleh, 2015). *C. acnes* – это грамположительные неподвижные, факультативно анаэробные коринеморфные палочковидные анаэробные бактерии (Aubin et al., 2014),

предпочитающие жирные и увлажненные участки кожи (лоб, шея, спина, Grice et al. 2009; Aubin et al., 2014; SanMiguel, Grice, 2015; Feuerstein et al., 2017). Благодаря липазам *C. acnes* может использовать в качестве субстрата секрет сальных желез кожи и выделяется из полостей сальных желез и волосяных фолликулов (Lee et al., 1982). Род *Propionibacterium* недавно был разделен на три рода – *Acidipropionibacterium*, *Cutibacterium*, *Pseudoropionibacterium*, по ряду критериев - соотношение Г-Ц-пар в геноме, строение пептидных мостиков пептидогликана и так далее (Scholz, Kilian, 2016). В настоящее время *C. acnes* считается условным патогеном человека, ассоциированным с целым рядом заболеваний. В первую очередь это инфекции разнообразных имплантатов (плечевых имплантатов, Achermann et al., 2014; сердечных имплантатов (Okuda et al., 2018)), контактных линз (Perry, Lambert, 2011) и акне (Achermann et al., 2014). Особенно часто биопленочные инфекции были фиксированы при вживлении плечевых имплантатов (Achermann et al., 2014), поскольку на плечевых участках кожи присутствует больше *C. acnes*. Опасность инфекций внутренних имплантатов, вызываемых *C. acnes* в том, что они проявляются спустя значительное количество времени после операции, вплоть до нескольких лет (Achermann et al., 2014), что связано с медленным ростом этого микроорганизма.

В настоящее время многие исследователи считают *C. acnes* ассоциированным с акне микроорганизмом (Fitz-Gibbon et al., 2013; Achermann et al., 2014; Peterrson et al., 2018). По результатам (Fitz-Gibbon et al., 2013) исследований последовательности генов рибосомальной РНК, а также выделения *C. acnes* с кожи человека, *C. acnes* был разделен на несколько риботипов, часть из которых является т.н. акнеическими, а часть – неакнеическими, поскольку *C. acnes* присутствует как на здоровой коже, так и на коже с акне и внутри акнеических пустул (Fitz-Gibbon et al., 2013). В связи с этим некоторые исследователи считают недостаточно доказанной связь между акне и *C. acnes* (Khorvash et al., 2012; Totte et al., 2016). Тем не менее, есть все основания полагать, что *C. acnes* является одной из причин, приводящему к развитию акне. К примеру, *C. acnes* может модулировать деление кератиноцитов и усиливать локальное воспаление, что способствует образованию акне. Также, благодаря своей способности потреблять жиры, *C. acnes* вовлечен в процессы липогенеза в коже и образования секрета сальных желез (Dessinioti, Katsambas, 2016). *C. acnes* взаимодействует с иммунной системой человека: с TOLL-подобными рецепторами, антимикробными пептидами, рецепторами протеаз и межклеточными металлопротеиназами; а также стимулирует синтез ряда провоспалительных цитокинов у белых кровяных клеток, кератиноцитов и себоцитов (Dessinioti, Katsambas, 2016). Показано, что в язвочках акне у кератиноцитов повышается уровень экспрессии рецепторов TLR-2 и TLR-4 (Achermann et al., 2014). Есть гипотеза, что, стимуляцией синтеза интерлейкина 1α *C. acnes* способствует образованию комедонов (Dessinioti, Katsambas, 2016). Кроме того, *C.*

acnes стимулирует синтез β -дефензинов и провоспалительных цитокинов в себоцитах, модулируя рост и дифференцировку себоцитов, а также воспалительный процесс в очагах акне (Nagy et al., 2006). Показано, что *C. acnes* стимулирует синтез нейропептида кортиколиберина в эпидермисе, модулируя на дифференцировку кератиноцитов и образование комедонов (Isard et al., 2009). В комедонах и воспаленных язвочках акне *C. acnes* формирует биопленки (Ten Broeke-Smits et al., 2010; Khorvash et al., 2012; Jahns et al., 2012; Matard et al., 2013; Jahns, Alexeyev. 2014), которые могут быть одной из причин акне и осложнений, связанных с ним. Закупорка пор на коже и образование ЧЕГО? благоприятствуют развитию биопленок *C. acnes* (гиперпролиферация кератиноцитов, избыток кожного жирового секрета, Williams et al., 2012).

В настоящее время биопленки *C. acnes* интенсивно исследуются, но по-прежнему остаются малоизученным объектом. Известно, что это медленно растущий микроорганизм, и на формирование биопленок в лабораторных условиях требуется от двух (Chiba et al., 2015) до 7 дней и более (Tyner, Patel, 2016). Имеются сведения о составе матрикса биопленок *C. acnes* (Jahns et al., 2016, Okuda et al., 2018): он содержит в себе ДНК, протеины и полисахариды. Однако, работа (Okuda et al., 2018) вызывает ряд вопросов с точки зрения методологии получения матрикса. Обе работы (2 ссылки ДАЙ) будут подробно рассмотрены в главе «обсуждение». Биопленки *C. acnes* рассматриваются сейчас как одна из причин устойчивости *C. acnes* в ходе терапии акне антибиотиками (Dessinioti, Katsambas, 2016).

Штаммы *C. acnes* изолированные с кожи у пациентов с акне часто устойчивы как минимум к одному из антибиотиков (Dessinioti, Katsambas, 2016). В частности клинические штаммы от пациентов с акне устойчивы к макролидам, стрептограминам и линкозамидам в работе (Ross et al., 2001), при этом устойчивость к эритромицину часто сопряжена с устойчивостью к клиндамицину (Ross et al., 2001; Coates et al., 2002). Также, сообщается об устойчивым к тетрациклинам и доксициклину штаммах (Coates et al., 2002, Sardana et al., 2016). Устойчивость к макролидам, стрептограминам и линкозамидам обусловлена мутацией в гене 23S-pPHK, а к тетрациклинам – мутацией в гене 16s-pPHK (Dessinioti, Katsambas, 2016). В целом у *C. acnes* устойчивость к антибиотикам обусловлена чаще всего разными хромосомными мутациями (Dessinioti, Katsambas, 2016).

Ряд работ посвящен роли *C. acnes* в развитии *acne vulgaris* и исследованиям различных косметических соединений, ингибирующих его рост или снижающих вирулентность. Показано, что количество *C. acnes* на коже лица увеличивается у людей, которые используют увлажняющую косметику (крема, эмульсии), при этом количество клеток *S. epidermidis* не изменяется (Lee et al., 2018a). Имеются данные о подавляющем воздействии экстрактов коры коричневого дерева на рост ряда кожных микроорганизмов, в том числе *C. acnes* и *S. epidermidis* (Nabavi et al., 2015), о противовоспалительном и ингибиторном для *C. acnes* действии

комплекса из бакучиола (меротерпен, выделяемый из *Psoralea corylifolia*), экстракта гинкго билоба и маннитола (Trompezinski et al., 2016). Также, установлено, что предшественник витамина С – аскорбилфосфат магния – подавляет процессы пероксидного окисления липидов *C. acnes* (Lee et al., 2016). Конъюгат хитозана и кофейной кислоты обладают антибактериальным действием на устойчивые к антибиотикам штаммы *C. acnes* и *P. aeruginosa* и усиливает действие антибиотиков на эти штаммы (Kim et al., 2017a). Полиненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты, в частности, линолевая и докозагексаеновая кислоты, входящие в состав эфирных косметических масел (Rabasco Alvarez, Gonzalez Rodriguez, 2000), обладают антибактериальным действием на *C. acnes* и *S. aureus* (Desbois, Lawlor, 2013), что делает их перспективными для борьбы с инфекциями, вызываемыми данными микроорганизмами. Лауриновая кислота, одна из свободных жирных кислот, компонент кожного сала, обладает антибактериальным действием на *C. acnes*, заключающемся в нарушении целостности мембран клеток; разработана методика липосомной доставки лауриновой кислоты в очаги акне (Yang et al., 2009). ЭДТА, использующийся в ряде случаев в качестве компонента косметики, усиливает антибактериальный эффект других соединений на *C. acnes* и другие микроорганизмы, возможно, как пермеабиллизатор мембран (Pannu et al., 2011). Но крайне мало работ посвящается биопленкам *C. acnes*, а исследований воздействия косметики на рост биопленок *C. acnes* практически не проводилось. Учитывая факт развития биопленок *C. acnes* внутри полостей сальных желез (Jahns et al., 2012), данный аспект представляется весьма важным и интересным. Есть много работ, где изучается влияние растительных экстрактов на рост культур и биопленок *C. acnes*. Например, эфирное масло мирта обыкновенного (*Myrtus communis*), используемое в косметических средствах (Ben Hsouna et al., 2014) оказывает антибактериальный и антибиопленочный эффект на *C. acnes*, что делает это масло потенциальным агентом против акне (Feuillolay et al., 2015). Экстракт розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis*) обладает многофакторным действием: во-первых, он подавляет рост биопленок *C. acnes* и ингибирует адгезию клеток; во-вторых, экстракт розмарина снижает синтез фактора некроза опухоли и провоспалительных интерлейкинов в эукариотических клетках (Tsai et al., 2013). Интересная работа, посвященная воздействию N-ацетилцистеина на рост культур и биопленок *C. acnes* и *S. epidermidis* была проведена Eroshenko et al. (Eroshenko et al., 2017). Авторы показали, что N-ацетилцистеин, разрушающий дисульфидные мостики между полисахаридными молекулами, значительно подавляет рост биопленок *C. acnes*.

Данных о воздействии регуляторных молекул человека, не считавшихся ранее антибактериальными, на *C. acnes* в настоящее время немного. Показано, что эпинефрин и норэпинефрин могут как подавлять, так и стимулировать рост *C. acnes* в зависимости от

штамма (Boyanova, 2017). При этом норэпинефрин стимулирует распад биопленок *S. acnes* внутри атеросклеротических бляшек в артериях, а также обильное выделение микроорганизмом протеаз, липаз и трансферрина, что потенциально может усложнять течение заболевания (Boyanova et al., 2017).

В результате исследований в рамках настоящей диссертации было установлено, что термальная вода Уриаж™ и олигосахарид PS291® обладают сильным антибиопленочным действием на акнеические штаммы *S. acnes*, при этом не оказывая значительного цитотоксического воздействия на клетки бактерий. Предположительно, механизм действия соединений заключается в нарушении процесса адгезии клеток к поверхности (Gannesen et al., 2018).

1.4. Бинарные биопленки некоторых микроорганизмов кожи человека

Поскольку в природе микроорганизмы существуют преимущественно в виде мультивидовых биопленок, таких как, зубные бляшки (Николаев, Плакунов, 2007) или анаммокс-сообщество в реакторах очистки сточных вод (Ножевникова с соавт., 2015), актуален переход от изучения моновидовых культур и биопленок к мультивидовым. Однако, до сих пор в научной литературе и лабораторной практике доминируют моновидовые модели, хотя с недавнего времени интерес к исследованиям мультивидовых биопленок микроорганизмов и взаимодействиям членов данных сообществ друг с другом неуклонно растет. Мы считаем особенно важным изучение влияния разнообразных активных соединений на биопленки, состоящие из нескольких видов микроорганизмов. Простейшей мультивидовой системой является бинарная биопленка. Анализ литературы показывает, что микроорганизмы в составе бинарных экспериментально сконструированных биопленок не являются инертными и активно влияют друг на друга. К примеру, работа Журиной с соавт., посвященная реконструированным биопленкам микроорганизмов пластовых вод нефтяных месторождений, показывает, что в присутствии галофила на среде с концентрацией хлорида натрия, летальной для штамма-галотолеранта галотолерантный микроорганизм выживает и потребляет нефтепродукты эффективнее, нежели без галофила (Журина с соавт., 2008). Механизм защиты заключается в потреблении галотолерантным микроорганизмом *Dietzia* sp. осмопротекторов эктоина и глутамата, выделяемых галофилом *Chromohalobacter* sp., которые концентрированы в матриксе биопленки и не диффундируют в среду (Журина с соавт., 2008). Присутствие *Enterococcus faecalis* в бинарной биопленке с *P. aeruginosa* стимулирует у последней синтез полисахаридов матрикса Psl и Pel, которые увеличивают толщину биопленок, что, вероятно, способствует возникновению осложнений при инфекциях и лучшей защите микроорганизмов внутри биопленки, т.к. эти микроорганизмы часто выделяются вместе при отборе проб у пациентов (Lee et al., 2017). Экспрессия большого пула генов изменяется у *Streptococcus mutans* и

Aggregatibacter actinomycetemcomitans в бинарной биопленке по сравнению с моновидовыми: у *S. mutans* увеличивается уровень экспрессии альтернативного сигма-фактора SigX, регулирующего синтез бактериоцинов и клеточную компетентность (Szafranski et al., 2017), тогда как у *A. actinomycetemcomitans* увеличивается синтез ряда ферментов, в том числе пероксидазы хинола, ферментов метаболизма нуклеотидов и некоторых других (Szafranski et al., 2017). Оба микроорганизма – компоненты зубных бляшек, *S. mutans* является модельным микроорганизмом для изучения кариеса (Szafranski et al., 2017). Аналогичное усиление экспрессии SigX у *S. mutans* происходит в бинарных биопленках с *C. albicans*, при этом у него *S. mutans* подавляется синтез матрикса, хотя количество клеток и биомасса бинарных биопленок увеличиваются (Sztajer et al., 2014). Присутствие *Listeria monocytogenes* в бинарной биопленке с *P. putida* увеличивает устойчивость последней к антисептику хлориду бензалкония, при этом адаптации к хлориду бензалкония не наблюдалось ни у одного микроорганизма в этой работе (Giaouris et al., 2013). *S. mutans* стимулирует адгезию клеток и рост *Streptococcus sanguinis* в составе бинарной биопленке по сравнению с моновидовыми; оба микроорганизма являются кариогенными агентами зубных бляшек (Shafiei et al., 2016). При этом никотин стимулирует рост и синтез полисахаридов матрикса *S. mutans* в бинарной биопленке с *S. sanguinis* (Li et al., 2014), что может быть одной из причин повышенного риска развития кариеса у курильщиков. Показано, что *E. coli* в условиях недостатка питательных веществ активно колонизирует биопленки *Ralstonia insidiosa* – грамотрицательного микроорганизма, обитающего преимущественно в разнообразных водных системах (станции водозабора и др.) и обладающего способностью образовывать развитые биопленки, которые защищают *E. coli* от воздействия неблагоприятных факторов (Liu et al., 2015).

В бинарных биопленках микроорганизмов коживажно отметить наиболее изученное взаимодействие стафилококков и грибов рода *Candida*. Показано положительное воздействие дрожжей *Candida albicans* на *S. aureus* в составе бинарных биопленок. *S. aureus* растет лучше в присутствии *C. albicans* в разных типах бинарных пленок, тогда как *C. albicans* может при этом расти хуже, если клетки *S. aureus* предварительно были адгезированы на поверхности, т.е. имеет место конкуренция на стадии адгезии (Budzyńska et al., 2017). Отмечается важность внеклеточной ДНК, участвующей в организации трехмерной структуры бинарных биопленок (Kean et al., 2017). Простагландин E2, выделяемый *C. albicans* стимулирует рост *S. aureus* (Krause et al., 2015). *C. albicans* не только улучшает рост *S. aureus* в бинарных биопленках, но также защищает его от действия биоцидов, таких как, ванкомицин (Kong et al., 2016) и миконазол (Kean et al., 2017). β -1,3-глюкан, являющийся компонентом клеточных стенок *C. albicans*, обладает стимулирующим действием на *S. aureus* и увеличивает его устойчивость к ванкомицину в бинарных биопленках (Kong et al., 2016). Фарнезол, выделяемый в процессе

метаболизма *C. albicans* и вызывающий окислительный стресс, может, по-видимому, стимулировать патогенные свойства *S. aureus* (Kong et al., 2017).

Ряд работ посвящен исследованию бинарных биопленок *S. epidermidis* с грибами рода *Candida*. Tan et al. со ссылками на некоторые работы утверждают, что комбинация грибов рода *Candida* и бактерий в биопленке является наиболее распространенной мультивидовой системой, встречающейся на коже (Tan et al., 2017), что, однако, является дискуссионным утверждением. Анализ структуры бинарных биопленок *C. albicans* и *S. epidermidis* показал, что в зрелых биопленках *C. albicans* образует преимущественно гифы, к которым обильно прикрепляются кластеры клеток *S. epidermidis* (Chen et al., 2015). Показано, что матрикс биопленок *S. epidermidis* защищает клетки *C. albicans* от действия фунгицида флюконазола (Adam et al., 2002). Матрикс *C. albicans*, в свою очередь, защищает клетки *S. epidermidis* от действия ванкомицина (Adam et al., 2002). В целом *S. epidermidis*, как и *S. aureus*, растет лучше в бинарных с *C. albicans* биопленках, нежели в моновидовых, аналогично и *C. albicans*. Основными предпосылками существования этого симбиоза являются экспрессия генов внеклеточного адгезина *icaA*, фибронектин-связывающего белка *fbp* и поверхностного белка *aap* (Wang et al., 2015). Aap – это белок-адгезин, образующий на поверхности клетки палочковидные фимбрии, участвующий в адгезии клеток к поверхности клеток эпителия и друг к другу и обеспечивающий один из механизмов адгезии, независимых от полисахаридного межклеточного адгезина (Schaeffer et al., 2015). Другим фактором, обуславливающим увеличенный по сравнению с моновидовыми биопленками роста бинарных биопленок *C. albicans* и *S. epidermidis*, является внеклеточная ДНК из клеток *S. epidermidis* (Pammi et al., 2013). В бинарной биопленке меняется экспрессия генов *S. epidermidis*: увеличивается для 2.7% генов и снижается для 6%, в том числе ген оперона-репрессора автолиза клеток *lgr*. Экспрессия *lgrA* и *lgrB* снижается в 27 и 36 раз соответственно (Pammi et al., 2013). Для подавления роста бинарных биопленок *C. albicans* и *S. epidermidis* эффективен карбоксиметилхитозан, подавляющий обрастание силиконовых пластинок в 5 раз. Таким образом, данное соединение является перспективным агентом для обработки голосовых протезов против обрастания (Tan et al., 2016).

Работа Tyner, Patel – единственная статья, посвященная бинарным биопленкам *S. aureus* и *C. acnes* на момент написания настоящей работы. В ней показано, что биопленки *C. acnes* при 37°C позволяли дольше сохранять жизнеспособность клеток *S. aureus* в анаэробных условиях, при этом количество КОЕ *C. acnes* в присутствии *S. aureus* не изменялось (Tyner, Patel., 2016). Работа Eroshenko et al. – это единственная статья на момент написания диссертации, посвященная частично бинарным биопленкам *S. epidermidis* и *C. acnes*, в которой показано, что N-ацетилцистеин подавляет рост моновидовых и бинарных биопленок *C. acnes* и *S. epidermidis*,

причем *S. acnes* более чувствителен к действию препарата, нежели *S. epidermidis*. Авторы полагают, что таким образом N-ацетилцистеин может регулировать состав микробиоты на коже, поскольку при длительном употреблении препарата может изменяться баланс микроорганизмов. Интересно, что при низкой концентрации (приблизительно 1/20 МИК) N-ацетилцистеина стимулирует рост бинарной биопленки, что, по-видимому, обусловлено стимуляцией роста *S. epidermidis* (Eroshenko et al., 2017). Однако, антибактериальный эффект N-ацетилцистеина остается предметом дискуссий, поскольку Yin et al. продемонстрировали стимулирующий эффект соединения на рост биопленок *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, и *K. pneumoniae* (Yin et al., 2018). Возможно, здесь имеет место штаммовая специфичность. В бинарных биопленках *S. aureus* и *S. epidermidis* оба микроорганизма меняют уровень экспрессии ряда генов, и метаболическая активность *S. aureus* уменьшалась в присутствии *S. epidermidis*, при этом у *S. epidermidis* повышалась экспрессия генов устойчивости к ряду антибиотиков (Vandecandelaere et al., 2017). В ходе работы в рамках настоящей диссертации показано, что взаимодействие *S. aureus* и *S. epidermidis* в бинарной биопленке, по-видимому, зависит от штамма, поскольку *S. aureus* MFP03 обладает значительным конкурентным преимуществом перед *S. epidermidis* MFP04 (Ганнесен с соавт., 2018) и в планктонной культуре, и в биопленке. Оба штамма выделены с кожи здоровых добровольцев (Mijouin et al., 2013). При этом натрийуретические пептиды А- и С-типов изменяют баланс микроорганизмов: доля *S. epidermidis* в бинарной биопленке возрастает относительно контроля без добавления натрийуретических пептидов (Ганнесен с соавт., 2018).

В биопленках стафилококков с грамотрицательными микроорганизмами ситуация иная. К примеру, Makovcova et al. сообщают о подавлении роста *S. aureus* в бинарных биопленках с *E. coli* и *Salmonella enterica* по сравнению с моновидовыми биопленками, тогда как оба грамотрицательных микроорганизма росли лучше в присутствии *S. aureus* (Makovcova et al., 2017). Также, бинарные биопленки *S. aureus* и *Salmonella sp.* менее устойчивы к дезинфицирующим средствам (перуксусная кислота, бромиду цетримония), нежели в моновидовых биопленках (при этом в бинарной биопленке у обоих микроорганизмов усиливалась способность к адгезии на поверхности из полипропилена В (Iñiguez-Moreno et al., 2018)). В случае бинарных биопленок *P. aeruginosa* и *S. aureus in vitro*, моделирующих инфекционное заражение *in vivo* (эти две культуры часто выделяются одновременно при отборе проб у больных кистозным фиброзом, отитом, Yadav et al., 2017), *S. aureus* значительно подавляется *P. aeruginosa*: на 100 клеток *P. aeruginosa* приходится лишь одна клетка *S. aureus* (Miller et al., 2017). можно объяснить синтезом *P. aeruginosa* феназинов, обладающих антимикробной активностью в том числе на *S. aureus* и *S. epidermidis* (Borrero et al., 2014). При этом, у *S. aureus* изменяется экспрессия около 5% генома: увеличивается вирулентность и

понижается метаболическая активность, в то время как у *P. aeruginosa* изменяется экспрессия лишь около 0.3% генов (Miller et al., 2017). Исследования *in vivo* и *in vitro* показывают, что в системах *in vitro* наблюдается некоторое подавление роста MRSA в присутствии *P. aeruginosa*, но при этом в *in vivo* модели отита у крыс подобного подавления не происходит (Yadav et al., 2017). При этом, у обеих бактерий в бинарных биопленках экспрессируются иные гены по сравнению с моновидовыми биопленками: гены вирулентности, взаимодействия с иммунной системой, взаимодействия с нервной системой хозяина, воспалительных факторов и др. (Yadav et al., 2017). Однако, псевдомонады не только подавляют рост *S. aureus*, но и защищают его от антибиотиков. Показано, что полисахарид Psl *P. aeruginosa* играет важную роль в защите от антибиотиков не только самих *P. aeruginosa*, но и микроорганизмов, не способных его синтезировать, но внедряющихся в биопленку *P. aeruginosa* или приобретающих гены синтеза Psl: *S. aureus* в бинарной биопленке с *P. aeruginosa* менее чувствителен к тобрамицину (Billings et al., 2013). Есть данные о том, что синтезируемые *P. aeruginosa* внеклеточные соединения способны защищать *S. aureus* от действия антибиотиков в биопленках и в планктонных культурах. Так, *S. aureus* более устойчив к гентамицину в присутствии *P. aeruginosa*, возможно, благодаря синтезу *P. aeruginosa* аминогликозид-модифицирующих ферментов, которые защищают обе бактерии (DeLeon et al., 2014). Также, *P. aeruginosa* синтезирует 4-гидрокси-2-гептилхиолин-N-оксид – соединение, блокирующее дыхание у *S. aureus* и, таким образом, защищающее его от тобрамицина (DeLeon et al., 2014).

Наличие и вид второго микроорганизма в бинарной биопленке влияет на взаимодействие *S. aureus* в составе бинарных биопленок с фагами: разные микроорганизмы (молочнокислые бактерии, *Enterococcus faecium*) по-разному влияли на выход фаговых частиц после их посева на бинарную биопленку (Gonzalez et al., 2017). Интересно, что в бинарной биопленке *S. aureus* с *Lactobacillus plantarum* после обработки фагом количество CFU *L. plantarum* возрастало в несколько раз по сравнению с необработанным контролем, что свидетельствует о регуляторной роли фагов в мультивидовых сообществах микроорганизмов. Показано, что *S. aureus* подавляет рост *Aspergillus fumigatus* в бинарной биопленке, разрушает пространственную организацию гиф и замедляет их рост в системе *in vitro* (Ramírez Granillo et al., 2015). Фаги из семейства Myoviridae активны против моновидовых и бинарных биопленок *S. aureus* и *S. epidermidis* (Gutiérrez et al., 2015).

Ряд работ посвящен бинарным биопленкам *M. luteus* с другими микроорганизмами. К примеру, *Sphingomonas natatoria* – пресноводный грамтрицательный микроорганизм, (Min, Ricard, 2009), образует плотные биопленки на стекле, если до этого оно было покрыто слоем клеток *M. luteus*, в их отсутствие биопленки *S. natatoria* тонкие и прозрачные. Если нарушить способность клеток *S. natatoria* к коагрегации, то адгезия и рост бинарных биопленок

нарушится (Min, Ricard, 2009). Потенциально благоприятным сочетанием для формирования бинарных биопленок является сочетание *M. luteus* и *C. albicans*, выделенные с поверхности голосовых протезов (Kania et al., 2010): клетки *M. luteus* хорошо адгезируются на поверхности клеток *C. albicans*. Аналогично протекает коагрегация клеток *M. luteus* и *Brevundimonas lenta*, выделенных из обрастаний душевых леек (Vornhagen et al., 2013). Есть данные о том, что *M. luteus*, выделенный с венозных язв на ногах, погибает в присутствии *P. aeruginosa* или *S. aureus*, выделенных оттуда же, но выживает в присутствии *Streptococcus oralis* (Malic et al., 2011). *S. oralis* же в свою очередь также погибает в присутствии *P. aeruginosa*, но в бинарной биопленке с *S. aureus* оба микроорганизма растут существенно лучше, чем в моновидовых (Malic et al., 2011). Это еще раз показывает конкурентные преимущества *P. aeruginosa* над многими микроорганизмами, что объясняет доминирование синегнойной палочки в ряде случаев инфекций.

1.5. Матрикс биопленок

Внеклеточный матрикс является неотъемлемой чертой биопленок. Он функционирует как щит, защищающий бактерии от хищников, участвует в формировании градиентов кислорода и сигнальных молекул (McDouglad et al., 2012). Также матрикс служит защитой от антибиотиков и иммунной системы (Huang et al., 2011).

1.5.1. Организация и компоненты матрикса биопленок

Внеклеточный матрикс состоит из полисахаридов, белков и внеклеточных нуклеиновых кислот (Dogsa et al., 2013). На сегодняшний день в составе внеклеточного матрикса выделяют следующие функциональные компоненты: структурный, сорбционный, поверхностно-активный, каталитически-активный, информационный, редокс-активный и питательный (Marvasi et al., 2010).

1.5.1.1. Структурный компонент. Структурный компонент матрикса состоит из нейтральных полисахаридов и формирует каркас внеклеточного матрикса и синтезируются многими бактериями, например *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* (Morikawa et al., 2006; Ryder et al., 2007). Лучшее всего состав матрикса изучен на примере *B. subtilis* (Vijayabaskar et al., 2011, Chai et al., 2012), являющимся одним из модельных объектов в исследованиях роста биопленок. *B. subtilis* синтезирует нейтральные полисахариды при периодическом культивировании на богатой питательной среде (Shih et al., 2010). Наиболее изученными нейтральными полисахаридами *B. subtilis* являются леваны I и II типов, являющиеся β -2,6-D-полифруктозанами (Marvasi et al., 2010) с наличием в случайном порядке β -2-1 связей. Помимо каркасной роли, леваны участвуют в образовании капсул у псевдомонад, которая защищает их от бактериофагов, а также способствуют образованию агрегатов почвы в ризосфере (Marvasi et al., 2010). За

полимеризацию левана у *B. subtilis* отвечает ферменты сахараза (внутриклеточный) и левансахараза, кодируемый геном *sacB* (Shimotsu., Henner, 1986, Dogsa et al., 2013). Оба фермента являются β -фруктофуранозидазами. Ген *sacB* входит в состав оперона *sacB-yveB-yveA* (Pereira et al., 2001). Наличие сахарозы в среде стимулирует синтез левансахаразы (Shimotsu., Henner, 1986). Сахароза стимулирует анти-терминатор SacY, разрешающий экспрессию *sacB* (Dogsa et al., 2013).

Ген *yhxB* кодирует белок, похожий на фосфоглюкомутазу (Lazarevic et al., 2005), ответственный за синтез неизвестного олигосахарида на поверхности клеток *B. subtilis* (Marvasi et al., 2010). Если в целом говорить о внеклеточных полисахаридах *B. subtilis*, их гены синтеза расположены в локусе *epsA-O* (Dogsa et al., 2013), и их мономерами являются помимо фруктоза галактоза, глюкоза и N-ацетилглюкозамин (Chai et al., 2012).

Также необходимо упомянуть амилоидные фимбрии, состоящие из белка TasA, которые формируют межклеточные мостики у *B. subtilis* (Dogsa et al., 2013). Фимбрии TasA являются вторым мажорным компонентом матрикса *B. subtilis* (Morikawa et al., 2006). Фимбрии из белка TasA присоединены к клеточной стенке при помощи белка TapA (Romero et al., 2010). Оба белка кодируются опероном *tapA-sipW-tasA* (Vlamakis et al., 2013). Также, у *B. subtilis* обнаружен белок BslA (ранее называвшийся YuaB), состоящий из Ig-подобной части и необычного сверхгидрофобного кэпа. Он формирует на поверхности биопленок тонкий эластичный слой, определяющий гидрофобность и несмачиваемость матрикса (Hobley et al., 2013).

1.5.1.2. Сорбционный компонент. Сорбционный компонент матрикса представлен полимерами, осуществляющих сорбцию заряженных молекул (Marvasi et al., 2010). Хорошо изученным представителем является поли- γ -глутамат (ПГА), состоящий из D- (50-80%) и L- (20-50%) глутамата и являющийся нетоксичным биodeградируемым анионным полимером (Inbaraj et al., 2008). ПГА связывает катионы Mg^{2+} и Ca^{2+} , формирует соляные мостики между поверхностью раздела фаз и поверхностью клетки и является важным, но не жизненно необходимым для формирования биопленок фактором (Marvasi et al., 2010). Синтез ПГА есть не у всех штаммов *B. subtilis* (Morikawa et al., 2006). Кроме *B. subtilis*, ПГА синтезируется у *B. amyloliquefaciens* (Liu et al., 2010) – бактерии, образующей биопленки на поверхности фруктов. Интересен факт синтеза *B. amyloliquefaciens* внеклеточной слизи (Liu et al., 2010), покрывающей колонии и состоящей из ПГА. Синтез ПГА у *B. amyloliquefaciens* связан с экспрессией гена *ywsC* (Liu et al., 2010) и *ywtB* (Liu et al., 2011). Регуляторный фактор *pbrA*, продукт которого (ДНК-связывающий белок PbrA) является активатором оперонов *epsA-O* (синтез полисахаридов матрикса) и *yqxM-sipW-tasA* (синтез белка TasA – основы амилоидных фимбрий, участвующих в межклеточных контактах внутри биопленки, Liu et al., 2011, Dogsa et al., 2013), необходимых для формирования биопленки, не влияет на синтез ПГА (Liu et al., 2011). Более того,

подавление экспрессии *pbrA* стимулирует синтез ПГА (из-за смещения баланса лимонной кислоты и глюкозы – предшественников синтеза TasA И ПГА – в сторону последнего (Liu et al., 2011)).

1.5.1.3. Поверхностно-активный компонент. Поверхностно-активный компонент матрикса представляет собой биосурфактанты (Marvasi et al., 2010). Биосурфактанты - это амфифильные поверхностно-активные вторичные метаболиты: от низкомолекулярных гликолипидов, софоролипидов, рамнолипидов, липопептидов до высокомолекулярных белков, липополисахаридов и липопротеинов (Janek et al., 2012). У *B. subtilis* наиболее изученными поверхностно-активными веществами матрикса являются липопептиды (Marvasi et al., 2010). По структуре они делятся на три группы: сурфактин-подобные, итурин-подобные и плипастатин(фенгицин)-подобные (Xu et al., 2013). Синтез липопептидов идет вне рибосом, при помощи большого комплекса ферментов (Lin et al., 1999). Липопептиды играют роль триггерных молекул в сигнальных каскадах, регулирующих образование биопленок. У *B. subtilis* фактор системы кворум-сенсинга ComX (ген *cornX*) активирует синтез сурфактина, что ведет к активации синтеза матрикса (механизм пока неизвестен, Lopez et al., 2009). Также, сурфактин играет важную роль в роении (swarming) и сборе клеток в группы на плотной среде (Debois et al., 2008).

У *B. amyloliquefaciens* SQR9 липопептид бацилломицин D стимулирует транскрипцию гена *kinC*, кодирующего мембранную протеинкиназу KinC, регулирующую экспрессию генов образования биопленки (Xu et al., 2013). Помимо регуляторной функции, бацилломицин D подавляет рост фитопатогена *Fusarium oxysporum* в ризосфере растений огурца (Сао et al., 2011). Итуриновые и фенгициновые липопептиды, в отличие от сурфактина, проявляют ярко выраженные антигрибные свойства (Xu et al., 2013), однако, их функции в образовании биопленок у бацилл еще предстоит выяснить.

1.5.1.4. Каталитически активный компонент. Каталитически активный компонент матрикса представлен ферментами, модифицирующими полисахариды матрикса, белки матрикса и другие компоненты (Marvasi et al., 2010). Системы транспорта полипептидов у грамотрицательных бактерий представлены системами T1SS-T9SS, Sec и Tra (см. гл. «Клеточные факторы»), у грамположительных это системы транспорта полипептидов адгезии (Chagnot et al., 2013), Sec (secretion), FEA (flagella export apparatus), Tra (transfer), FPE (imbrilin-protein exporter) и системы транспорта ферментов (Marvasi et al., 2010), Tat (twin-arginine translocation pathway), ABC и Sec-SRP (signal recognition particle).

Ферменты, модифицирующие полисахариды – это уже упомянутая левансахараза *B. subtilis*, а также пектатлиазы, ксиланазы и амилазы (Tjalsma et al., 2004). Внеклеточные протеазы могут расщеплять внеклеточный белок в случае недостатка азота (Marvasi et al., 2010),

и дефектные по внеклеточным протеазам штаммы *B. subtilis* не могут образовывать биопленки (Tjalsma et al., 2004). Внеклеточные нуклеазы играют важную роль, поскольку внеклеточные нуклеиновые кислоты обнаружены у многих бактерий. У *Vibrio cholerae* обнаружены две внеклеточные нуклеазы: Dns и Xds (Seper et al., 2011). Они регулируют количество внеклеточной ДНК и мутации в их генах ведут к увеличению объема биопленки *V. cholerae*. Dns преимущественно работает на ранних стадиях развития биопленки, тогда как Xds – на стадии созревания (накопление аутоиндукторов и блокирование экспрессии *dns*, Seper et al., 2011). Также, Dns и Xds участвуют в формировании древоподобных структур в биопленках *V. cholerae*. Регуляция гена *dns* осуществляется факторами NapR (репрессор) и *vps* (корегулятор, Blokesch, Schoolnik, 2008). Экспрессия VPS заставляет Dns резать внеклеточную ДНК на более мелкие фрагменты, что ускоряет деградацию ДНК (Seper et al., 2011).

1.5.1.5. Редокс-активный компонент. Редокс-активный компонент матрикса представлен молекулами-переносчиками электронов. У *Geobacter* редокс-активный компонент представлен внеклеточными цитохромами с-типа и полимерами, имеющими локальные редокс-активные зоны (Babauta et al., 2012, Snider et al., 2012), которые формируют цепи переноса электронов. У *P. aeruginosa* редокс-активные пигменты феназиновой природы способны выступать в роли антибиотиков и факторов вирулентности для эукариотических клеток (Lopez et al., 2010). Феназины способны нейтрализовать широкий спектр оксидантов с высоким редокс-потенциалом (такие, как Fe(III)), перенося на них электроны (Wang et al., 2011). Пиоцианин – пигмент *P. aeruginosa*, также обладает редокс-активностью, нарушающей кальциевый гомеостаз эукариотических клеток при патогенезе (Sarkisova et al., 2005). Благодаря этому усиливаются каркасные связи в полисахаридном матриксе через кальциевые мостики.

1.5.1.6. Питательный компонент. Питательным компонентом матрикса может быть любое вещество, принадлежащее к другим его компонентам. Отдельно стоит сказать о мембранных везикулах (Flemming et al., 2007), по размерам сходных с вирусами. Они встречаются в биопленках грамотрицательных бактерий, являясь производными внешней мембраны (Schooling, Beveridge, 2006). Будучи способными содержать в себе белки, липиды, ДНК и прочие соединения (Tashiro et al., 2013), они могут выполнять в том числе питательную функцию.

1.5.1.7. Внеклеточная ДНК. Стоит отдельно упомянуть о внеклеточной ДНК, присутствующей в матриксе биопленок. Внеклеточная ДНК (eДНК) образуется в результате лизиса клеток в биопленке (Archer et al., 2011), и является важным компонентом матрикса (de Kievit, 2009). Выделяется несколько функций внеклеточной ДНК: участие в адгезии клеток; источник генетического материала для горизонтального переноса генов; источник питания для

живых клеток; ионный буфер; фактор выхода клеток из состава биопленки; фактор, способствующий образованию биопленок (Okshevsky, Meyer, 2013).

Об активной секреции ДНК на данный момент известно мало. Есть сведения, что у *Neisseria gonorrhoeae* существует активная секреция внеклеточной ДНК в биопленках, которая регулируется так же, как система регуляции пилей IV типа (Salgado-Pabon et al., 2010). Существует гипотеза, что основным источником внеклеточной ДНК в биопленках является лизис клеток, который может запускаться в том числе и фагами (Okshevsky, Meyer, 2013). У стрептококков, возможно, триггером лизиса клеток является выделяемый пероксид водорода (Zheng et al., 2011). Самый часто описываемый механизм появления внеклеточной ДНК – это автолиз бактериальных клеток, сходный с программируемой смертью клеток у эукариот (Okshevsky, Meyer, 2013). Автолиз клеток осуществляется автолизинами – ферментами, расщепляющими клеточную стенку и находящимися под контролем систем кворум-сенсинга (Okshevsky, Meyer, 2013). У *S. epidermidis* большая часть внеклеточной ДНК высвобождается благодаря автолизину AtlE (ген *atlE*, контролируется системой кворум сенсинга *agr*, Dai et al., 2012). Помимо этого, ген *cidA* (гидролаза муреина) также участвует в автолизе клеток (Mann et al., 2009). У *S. aureus* внеклеточная ДНК высвобождается благодаря автолизину A (AtlA), и бета-лактамы антибиотики в субингибиторных концентрациях увеличивают его экспрессию, а, как следствие, ДНК-опосредованную агрегацию клеток (Kaplan et al., 2012). У *Enterococcus faecalis* автолиз происходит в минорной субпопуляции клеток с участием желатиназы (Thomas et al., 2009). В этой «жертвенной» популяции нет синтеза белка, противодействующего желатиназе и, таким образом, нет защиты от автолиза. Также, у *E. faecalis* в автолизе принимает участие автолизин AtlA (Thomas et al., 2009). Автолиз клеток у *E. faecalis* связан с экспрессией фактора кворум-сенсинга σ_{54} (Vijayalakshmi, Hancock, 2012).

Гипотеза об участии внеклеточной ДНК в адгезии клеток основана на явлении адсорбции еДНК на поверхности клеток в виде петель, выступающих над поверхностью клетки на расстояние вплоть до 300 нм (Das et al., 2011). Это достаточное расстояние для преодоления слабых отталкивающих взаимодействий. Существует гипотеза о взаимодействии подобных петель внеклеточной ДНК с нанорельефом поверхности (Mitik-Dineva et al., 2008). В случае расстояний порядка нескольких нм для внеклеточной ДНК установлен факт взаимодействия электрон-донорных и электрон-акцепторных групп внеклеточной ДНК и поверхности (Das et al., 2011). Внеклеточная ДНК влияет на гидрофобность клеток, что по-разному сказывается на их способности адгезироваться на поверхность (все зависит от гидрофобности поверхности, Okshevsky, Meyer, 2013). Некоторые работы показывают увеличение адгезии клеток на гидрофобные поверхности благодаря тому, что внеклеточная ДНК увеличивает гидрофобность клеток (Das et al., 2011). Участие внеклеточной ДНК в адгезии клеток на абиотические

поверхности показан для *S. epidermidis* (стекло, полистирен, Qin et al., 2007), *Acidovorax temperans* (стекло, Heijstra et al., 2009). У *S. epidermidis* внеклеточная ДНК и белок, связывающий внеклеточный матрикс (Embr) являются ключевыми агентами альтернативного пути формирования биопленок, не зависящего от полисахаридного внеклеточного адгезина (Doroshenko et al., 2014). У *L. monocytogenes* внеклеточная ДНК важна на начальной стадии адгезии. Обработка клеточной ДНК культуры, не выделяющей внеклеточной ДНК, не возвращает способности адгезироваться (Harmsen et al., 2010).

Важность внеклеточной ДНК как структурной составляющей матрикса биопленок была показана в опытах по обработке ДНКазой биопленок *E. coli* и последующей их обработкой ДНК (подавление и стимуляция роста соответственно, Liu et al., 2008). У *Caulobacter crescentus* подвижные клетки, выходящие из биопленки, на одном полюсе имеют стержень для прикрепления к субстрату. Внеклеточная ДНК, связанная со стержнем, эффективно предупреждает адгезию клетки к уже существующим биопленкам (Berne et al., 2010). Количество ДНК в матриксе зависит от вида и штамма бактерии (Okshevsky, Meyer, 2013). Документально подтверждено значение внеклеточной ДНК на ранних стадиях роста биопленок (Seper et al., 2011), что, вероятно, объясняется выделением ДНК именно в начале процесса образования биопленок. Однако, на *Streptococcus pneumoniae* показано обратное (выделение ДНК на стационарной фазе роста в периодическом культивировании, Moscoso, Claverys, 2004). Поэтому, при важности внеклеточной ДНК для формирования биопленок, нет корреляции между ростом биопленок и количеством в них внеклеточной ДНК. Предполагается, что внеклеточная ДНК связывается с молекулами матрикса благодаря неспецифическим электрическим взаимодействиям и, возможно, этому способствуют дивалентные катионы (Okshevsky, Meyer, 2013). У *Mycococcus xantos* мутанты, не образующие экзополисахариды, не сохраняют внеклеточную ДНК (Hu et al., 2012). У *N. meningitidis* обнаружены два ДНК-связывающих белка, экспрессируемых на поверхности клетки: антиген NhbA и α -пептид IgA-протеазы (Arenas et al., 2013). Удаление этих белков протеазой (аутотранспортёр NaIP) приводит к ослаблению роста биопленок. Также показано взаимодействие внеклеточной ДНК с двуслойными мембранными везикулами в биопленках грамотрицательных бактерий (Schooling et al., 2009). Показана связь системы токсин-антитоксин HipA *E. coli* с внеклеточной ДНК: мутанты по гену *hipA* образовывали меньше биопленок, с меньшим содержанием внеклеточной ДНК и меньшей чувствительностью к ДНКазам (Zhao et al., 2013). Механизм явления пока не выяснен. Внеклеточная ДНК связывает пили IV типа у *P. aeruginosa*, что связано с образованием кэпа (место высвобождения подвижных клеток) на верхушке грибовидных биопленок (Barken et al., 2008). Небелковые молекулы тоже могут связываться с внеклеточной ДНК. У *P. aeruginosa* пиоцианин (акцептор

электронов с НАДН во время недостатка кислорода) связывает внеклеточную ДНК, что, вероятно, стимулирует межклеточные взаимодействия (Das et al., 2013).

Внеклеточная ДНК участвует в горизонтальном переносе генов в биопленках. На сегодняшний день установлено, что внутри биопленок горизонтальный перенос генов происходит с большей эффективностью чем ... (Roberts et al., 2006). Как фактор выхода внеклеточной ДНК в матрикс рассматривается компетентность клеток. Это продемонстрировано на *S. pneumoniae*, у которого гидролаза муреина CbpD (choline binding protein D) является ключевым индуктором компетентности, и мутанты по *cbpD* практически не выделяют внеклеточную ДНК (Okshevsky, Meyer, 2013). На *S. mutans* продемонстрирована важность генов компетентности *comA*, *comB*, *comC*, *comD* и *comE* в формировании биопленок (Li et al., 2002). В многовидовых биопленках выход еДНК и компетентность регулируется антагонизмом видов (Okshevsky, Meyer, 2013). Однако, горизонтальный перенос генов – не единственная причина выхода внеклеточной ДНК. Это доказано на *S. pneumoniae*, у которого внеклеточная ДНК присутствовала в матриксе в течение долгого времени после исчезновения компетенции клеток (Okshevsky, Meyer, 2013).

Помимо этого внеклеточная ДНК выполняет защитную функцию, связывая молекулы антимикробных соединений и препятствуя, таким образом, их проникновению в клетки. Так, внеклеточная ДНК связывает ванкомицин, что защищает биопленки *S. epidermidis* от воздействия субингибиторных концентраций антибиотика (Doroshenko et al., 2014). Причем афинность внеклеточной ДНК к ванкомицину в сто раз выше, нежели у его внутриклеточной мишени – пептида D-Ala-D-Ala (Doroshenko et al., 2014). В целом же, ДНК, образуя отрицательно заряженные полиионы, действует подобно молекулярной ловушке для положительно заряженных антимикробных молекул, таких как антибиотики аминогликозидной и пептидной природы (Das et al., 2013).

Таким образом, внеклеточная ДНК выполняет информационную, питательную, структурную, регуляторную, защитную и адгезивную роли, поэтому ее можно включить в состав разных компонентов матрикса.

1.5.2. Матрикс биопленок некоторых кожных микроорганизмов

Рассмотрим в этом разделе состав матрикса микроорганизмов, использованных в настоящей работе.

1.5.2.1. *Pseudomonas*. Матрикс биопленок *Pseudomonas* изучен достаточно детально, и написаны подробные работы, описывающие его. Особенно детально исследован матрикс *P. aeruginosa*. Основные компоненты – это полисахариды, полисахарид-содержащие соединения, внеклеточная ДНК и белки (Mann, Wozniak, 2012). Основные полисахариды по Mann, Wozniak, 2012 (при наличии, приводятся свидетельства присутствия полимеров у других псевдомонад):

1) альгинат (L-гулуруоновая кислота, D-маннуруоновая кислота, соединенные β -1,4-связью) – один из главных полимеров матрикса *P. aeruginosa*, сохраняющий воду и удерживающий питательные вещества в биопленке. Имеется у *P. fluorescens* (Maleki et al., 2015), *P. chlororaphis* (Chen et al., 2015a) и *P. putida* (Chang et al., 2007);

2) леван (разветвленный β -полифруктан), служащий запасом питательных веществ на случай голодания. Имеется у *P. chlororaphis* (Visnapuu et al. 2011), *P. fluorescens* (Mann, Wozniak., 2012);

3) Psl (полимер D-маннозы, L-рамнозы и D-глюкозы) – полимер в двух формах: растворимой, относительно низкомолекулярной, и высокомолекулярной, связанной с клетками. Функция – адгезия клеток друг к другу и к поверхности, и, возможно, передача сигнала. Присутствует у *P. fluorescens*.

4) Pel (полимер, богатый N-ацетилглюкозамином и N-ацетилгалактозамином, Marmont et al., 2017), вовлеченный в процесс коагрегации клеток друг с другом и с компонентами матрикса, захват молекул антибиотиков (функции, схожие с таковой у внеклеточной ДНК). Оперон *pel* частично представлен у *P. fluorescens*, *P. putida*;

5) Целлюлоза – играет некую роль в образовании биопленок на поверхности раздела фаз «жидкость-воздух», имеется у *P. fluorescens*.

Белковым компонентом матрикса псевдомонад являются разнообразные адгезины (Large adhesion protein (Lap), отвечающий за необратимую адгезию клеток к поверхности, Mann, Wozniak, 2012), пили (особенно IV типа), внеклеточные лектины (LecA, LecB, обладающие цитотоксическим действием на эукариотические клетки) и внеклеточные ферменты (Mann, Wozniak, 2012). Рамнолипиды – соединения, состоящие из молекул моносахаров и жирных кислот и обладающие функциями ПАВ, антибактериальной и фунгицидной активностью, составляют важную часть секрета псевдомонад (в том числе *P. chlororaphis* (Gunther et al., 2005)). Вероятно, благодаря рамнолипидам псевдомонады могут использовать в качестве источника энергии высокомолекулярные гидрофобные соединения (Mann, Wozniak, 2012). О внеклеточной ДНК и ее функциях см. раздел 1.5.1.7.

Помимо базовых соединений, матрикс псевдомонад содержит газы, воду, метаболиты и сигнальные молекулы (Mann, Wozniak, 2012). Поскольку матрикс биопленок псевдомонад исследован достаточно глубоко, читатель может обратиться к источникам, описывающим его состав и функции более подробно: к примеру, к монографии Ramos et al., 2015.

1.5.2.2. *Staphylococcus*. Основные компоненты матрикса биопленок *S. aureus* и *S. epidermidis* – это полисахариды, протеины, внеклеточная ДНК (Schilcher et al., 2016). Главным полисахаридным компонентом матрикса биопленок у обоих стафилококков является ПНАГ, который также называют поверхностным полисахаридным адгезином. Он является основным

элементом матрикса, отвечающим за адгезию и коадгезию клеток, защиту от воздействия иммунной системы и организацию трехмерной структуры биопленок у *S. aureus* и *S. epidermidis* (Izano et al., 2008; Gökçen et al., 2013). Оперон, кодирующий синтез ПНАГ у стафилококков - *icaADBC* (Gökçen et al., 2013). Ген *icaB* отвечает за деацетилирование ПНАГ (около 16% мономеров), в результате чего остающиеся остатки глюкозамина, несущие положительный заряд, делают ПНАГ более положительно заряженным, что важно для электростатических взаимодействий с поверхностями, а также для защиты от действия иммунной системы путем отталкивания положительно заряженных антимикробных пептидов (Gökçen et al., 2013). Аналоги ПНАГ синтезируются и у ряда других бактерий, в том числе *P. fluorescens*, у которых он выполняет функцию адгезии клеток к поверхностям и друг к другу, защиту от детергентов и антибиотиков (Izano et al., 2008).

Вторым важным компонентом матрикса биопленок стафилококков является внеклеточная ДНК. Интересно, что ПНАГ и внеклеточная ДНК по-разному участвуют в формировании матрикса биопленок *S. epidermidis* и *S. aureus*: у *S. aureus* внеклеточная ДНК является главным компонентом матрикса, а ПНАГ – минорным, тогда как у *S. epidermidis* – наоборот (Izano et al., 2008). Это было показано при помощи обработки биопленок дисперсином В и ДНКазой I: дисперсин В (фермент, расщепляющий ПНАГ) разрушал биопленки *S. epidermidis*, но не разрушал биопленки *S. aureus*; ДНКазы I же разрушала биопленки *S. aureus*, но не разрушала биопленки *S. epidermidis* (Izano et al., 2008). При этом, у *S. epidermidis* наблюдается некоторая обратная корреляция: у штаммов, активно синтезирующих ПНАГ, в матриксе мало внеклеточной ДНК, а у штаммов с малой продуктивностью ПНАГ внеклеточной ДНК много (Camproscia et al., 2011). Таким образом, внеклеточная ДНК является ключевым компонентом матрикса, задействованным в альтернативном, ПНАГ-независимом формировании биопленок стафилококков, поскольку ПНАГ-дефицитные штаммы не теряют способности образовывать биопленки (Izano et al., 2008; Camproscia et al., 2011; Schilcher et al., 2016).

Тейхоевые и липотейхоевые кислоты на поверхности клеток являются еще одним компонентом матрикса биопленок *S. epidermidis* (Otto, 2012) и *S. aureus* (Weidenmaier et al., 2001; Ahn et al., 2018). Тейхоевые кислоты связаны ковалентными связями с пептидогликаном клеточной стенки, тогда как липотейхоевые кислоты не имеют ковалентной связи с молекулами клеточной стенки (Otto, 2012). Тейхоевые кислоты *S. epidermidis* состоят из полиглицеролфосфатной цепи, замещенной по второму атому глицерола α -глюкозой, α -глюкозамином, D-аланином, α -6-D-аланилглюкозой (Otto, 2012). Тейхоевые кислоты *S. aureus* состоят из рибитолфосфатной или глицеролфосфатной цепи (липотейхоевые кислоты), замещенной остатками N-ацетилглюкозамина и D-аланина (Gross et al., 2001). Липотейхоевые кислоты закрепляются на поверхности клетки гликолипидным якорем:

дигексозилдиацилглицеролом или дигексозилтриацилглицеролом (Ahn et al., 2018). Тейхоевые кислоты участвуют в процессах адгезии клеток к поверхности и друг к другу. Мутантные штаммы стафилококков, не имеющие тейхоевых кислот в достаточном количестве, обладают повышенной гидрофобностью, что ведет к ослаблению формирования биопленок (Fedtke et al., 2007). Тейхоевые кислоты участвуют в адгезии клеток стафилококков к фибронектину, и в развитии воспалительных процессов (Otto, 2012) через взаимодействие с рецептором TLR2 (Ahn et al., 2018).

Матрикс стафилококков содержит белки. Biofilm attachment protein (Bap) – это белок *S. aureus*, ассоциированный с клеточной стенкой и состоящий из нескольких повторяющихся доменов (Taglialegna et al., 2016). Bap участвует в адгезии клеток к поверхности и друг к другу на начальных стадиях формирования биопленки и вместе с внеклеточной ДНК является компонентом ПНАГ-независимого пути образования биопленок (Taglialegna et al., 2016). Bap встречается и у *S. epidermidis*, который помимо Bap имеет его гомолог Bhp (Bap homologue protein), вносящий свой вклад в формирование биопленок, но считающийся менее важным для образования биопленок (Otto, 2012; Taglialegna et al., 2016). Embp (extracellular matrix binding protein) – крупный (460 кДа) поверхностный белок, вовлеченный в процесс начальной адгезии клеток, а также адгезии клеток к фибронектину у *S. epidermidis* (Otto, 2012). Молекулы Embp образуют палочковидные структуры на поверхности клеток (Buttner et al., 2015). У *S. aureus* есть гомолог Embp – Ebh со схожими функциями и параметрами, в том числе также участвующий в адгезии к фибронектину (Buttner et al., 2015). Если Embp у *S. epidermidis* отвечает преимущественно за адгезию и коадгезию клеток на начальном этапе развития биопленок, то accumulation-associated protein (Aap) помимо функции начальной адгезии и коадгезии играет роль и на более поздних этапах развития биопленки (Otto, 2012; Buttner et al., 2015). Aap в биопленке проходит обработку протеазами для получения активной формы, существует преимущественно в прикрепленном С-концом к клеточной стенке состоянии и формирует 120-нм фимбрии, которые пронизывают биопленку и связывают клетки друг с другом, а также с поверхностью (Otto, 2012; Buttner et al., 2015). Aap считается ключевой молекулой в процессе ПНАГ-независимого формирования биопленок у *S. epidermidis* (Buttner et al., 2015). Помимо этого, в образование биопленок у *S. epidermidis* вовлечен поверхностный белок SesC (*Staphylococcus epidermidis* surface protein), а у *S. aureus* – поверхностные белки SasC и SasG (*Staphylococcus aureus* surface protein), фактор адгезии В (ClfB) SdrC (serine aspartate repeat protein) и фибронектин-связывающие белки FnBPA и FnBPB (Speziale et al., 2014). Последние относятся к так называемым MSCRAMM (microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules – компонентам клеточных стенок, распознающим адгезивные

молекулы матрикса) – факторам вирулентности, отвечающим за прикрепление к белкам соединительной ткани (фибронектину, коллагену, Kang et al., 2013; Speziale et al., 2014).

1.5.2.3. *Cutibacterium acnes*. Исследованию матрикса биопленок *C. acnes* на момент написания данной работы было посвящено две опубликованные статьи: Jahns et al., 2016 и Okuda et al., 2018. Подробно они будут рассмотрены в разделе «Обсуждение». Здесь стоит отметить лишь то, что на сегодняшний день известно, что матрикс *C. acnes* состоит из полисахаридов, белков и углеводов, и одним из углеводов матрикса *C. acnes* является ПНАГ (Okuda et al., 2018).

1.5.2.4. *Micrococcus luteus* и *Kytococcus schroeteri*. На момент написания работы найдена лишь одна статья, посвященная исследованию внеклеточного матрикса *M. luteus*. Это статья Mauclaire, Egli, 2009, в которой авторы показали, что матрикс биопленок *M. luteus* состоит преимущественно из полисахаридов и белков. В литературе других исследований матрикса *M. luteus* на сегодняшний день найдено не было. Статей, посвященных исследованию матрикса *K. schroeteri* на момент написания настоящей работы нами не найдено. На основе известных данных касательно других микроорганизмов можно предположить, что матрикс *K. schroeteri* состоит также из белков, углеводов и внеклеточной ДНК. Таким образом, работа в данном направлении перспективна и актуальна. Возможно, что, будучи актиномицетами, оба микроорганизма синтезируют ПНАГ подобно *C. acnes*. Есть некоторые данные о белке Rpf, секретлируемом *M. luteus*, который влияет на межклеточные контакты *M. luteus* и *Mycobacterium smegmatis* (Никитушкин с соавт., 2011). Rpf (фактор оживления или resuscitation-promoting factor) – это секретлируемый *M. luteus* в среду белок, который стимулирует выход клеток из неактивного состояния и их пролиферацию у целого ряда бактерий (Su et al., 2015), что делает применение культуральной жидкости *M. luteus* перспективной в ряде процессов, к примеру, для стимуляции роста бактерий, разлагающие бифенильные соединения (Su et al., 2015). Однако, нет данных о том, какую роль может играть Rpf в процессе роста биопленки *M. luteus*.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Микроорганизмы и культивирование

2.1.1.1. *Pseudomonas chlororaphis*. Действие азитромицина исследовали на чистых культурах граммотрицательных сапротрофных микроорганизмов *P. chlororaphis* (штаммы 66 и 449), а также модифицированных штаммов и мутантах последнего, полученных в лаборатории регуляции экспрессии генов микроорганизмов Института молекулярной генетики РАН. Основные характеристики этих организмов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Свойства штаммов псевдомонад, использованных в работе с азитромицином.

Штаммы бактерий	Характеристика штамма	Источник
<i>P. chlororaphis</i> 449	Прототроф, синтезирует АГЛ	Коллекция института молекулярной генетики РАН (10-Липасова с соавт., 2009) (11-Веселова, 2008)
<i>P. chlororaphis</i> 66	Прототроф, синтезирует АГЛ	
<i>P. chlororaphis</i> 449, мутант 2	Мутация в гене <i>rpoS</i> , синтезирует АГЛ	
<i>P. chlororaphis</i> 449, мутант 3	Мутация в гене <i>gacS</i> , синтез АГЛ снижен	
<i>P. chlororaphis</i> 449, мутант 4	Мутация в гене <i>phzB</i> , синтезирует АГЛ	
<i>P. chlororaphis</i> 449, мутант 5	Мутация в гене <i>phzA</i> , синтезирует АГЛ	
<i>P. chlororaphis</i> 449/pME6000, штамм 6е	Содержит векторную плазмиду pME6000, Tc-г, синтезирует АГЛ	
<i>P. chlororaphis</i> 449/pME6863, штамм 7е	Содержит плазмиду pME6863, включающую клонированный ген <i>aiiA</i> , Tc-г, синтез АГЛ отсутствует	

P. chlororaphis сохраняли на полужидкой (0.3% агара) среде LB в столбиках под вазелиновым маслом при 4-6°C. В случае мутантов 2, 3, 4 и 5 в среду при хранении вносили стерильный раствор канамицина (конечная концентрация 100 мкг/мл), а в случае штаммов 6е и 7е использовали стерильный раствор тетрациклина (до конечной концентрации 40 мкг/мл). Бактерии выращивали на жидкой среде LB при 29-30°C на качалке (150 об./мин) в течение 20-24 ч. Эти культуры использовали как инокулят в опытах с биопленками.

Получение биопленок и изучение их чувствительности к ингибиторам осуществляли, как описано в работе Мартьянова и соавторов, 2015.

2.1.1.2. Комменсалы кожи человека. В работе с никлозамидом были использованы штаммы-симбионты человека *M. luteus* C01, *K. schroeterii* H01, а также штаммы *S. aureus* MFP03 и 209P, которые были выделены с кожи людей и идентифицированы методом определения последовательности 16s-рРНК (кроме *S. aureus* 209P, Журина с соавт., 2017, Hillion et al., 2013). Штамм *S. aureus* 209P был взят из коллекции лаборатории нефтяной микробиологии ИНМИ им. С.Н. Виноградского ФИЦ Биотехнологии РАН. В качестве

инокулята в опытах с биопленками использовали 24 ч культуры выращенные в жидкой среде LB на качалке 150 об/мин при 30°C.

В работе с компонентами косметики и натрийуретическими пептидами человека использовали штаммы *S. aureus* MFP03, *S. epidermidis* MFP04 и *Cutibacterium acnes*. *S. aureus* MFP03 и *S. eidermidis* MFP04 выделены с кожи здоровых добровольцев. Определены фенотипические, метаболические характеристики штаммов стафилококков и проведён анализ их протеомов по методике MALDI-Biotyper, а также анализ последовательности гена 16S рРНК (Hillion et al., 2013). Для экспериментов предварительно выращивали культуры из биомассы, хранившейся при -80°C. Небольшой фрагмент биомассы помещали в 3 мл лизогенного бульона (lysogenic broth - LB) и инкубировали при 37°C на шейкере в течение 24 ч. Для исследования биопленок при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа, на 96-луночных планшетах, а также динамики роста и адгезии к растворителям *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 культивировали в триптон-соевом бульоне (tryptic soy broth - TSB) фирмы Biorad Diagnostics с добавлением 0,25% глюкозы, либо в жидкой обогащенной клостридиальной среде (reinforced clostridial medium – RCM).

Штаммы *C. acnes* RT5 (ATCC HM-514) и RT4 (ATCC HM-516) получены из Американской коллекции типовых культур ATCC, Вирджиния, США. Это штаммы с акнеическим фенотипом, различающиеся по риботипу (Fitz-Gibbon et al., 2013): *C. acnes* RT5 имеет риботип 5 (RT5), а *C. acnes* RT4 – риботип 4. Культуры подготавливали сходным с *S. aureus* MFP03 образом: образцы биомассы, хранившейся при -80°C, рассеивали на чашки Петри с агаризованной сердечно-мозговой вытяжкой (Brain Heart infusion, BHI) фирмы BD. Чашки помещали в систему BD GasPak™, поддерживающую анаэробные условия, и выдерживали при 37°C в течение 72 ч. Затем биомассу нескольких колоний помещали в стерильные конические пробирки для центрифугирования фирмы Falcon, доверху заполненные жидкой средой RCM. Культуры выращивали при 37°C в течение 72 ч. Во всех экспериментах культуры *C. acnes* выращивали на среде RCM. Затем подготавливали посевной материал - клетки отмывали дважды стерильным физиологическим раствором хлорида натрия (ФР) и доводили им же суспензию клеток до конечной оптической плотности равной 1, при длине волны 580 нм.

Исследование матрикса биопленок *C. acnes* производили с использованием штамма HL043PA2. Подготовку посевного материала осуществляли по вышеописанной методике.

2.1.2. Исследуемые соединения

2.1.2.1. Азитромицин. В работе с псевдомонадами использовали азитромицин ЗАО «Фармацевтическое предприятие «Оболенское» (Оболенск, Россия). Это полусинтетический антибиотик, относящийся к классу азалидов и содержащий 15-членное лактонное кольцо. Получают азитромицин путем включения атома азота между 9 и 10 атомами углерода 14-

членного лактонного кольца макролидов (Maazono et al., 2011). Азитромицин ингибирует синтез белка, связываясь с 50S-субъединицей рибосом (Kohler et al., 2007). Данное вещество является широко применяемым средством против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также «нетипичных» возбудителей инфекций (Gillis, Iglewski, 2004). Азитромицин обладает некоторым антибиопленочным эффектом: подавляет рост биопленок *P. gingivalis* (Maazono et al., 2011) и *P. aeruginosa* (Gillis, Iglewski, 2004). Исходный раствор азитромицина готовили в 96% этаноле и хранили при -20°C не более месяца. Для приготовления растворов азитромицина с разными концентрациями исходный раствор азитромицина разбавляли стерильной дистиллированной водой, а полученные растворы вносили в пробирки со средой LB. В специальной серии экспериментов было установлено, что этанол в количествах, вносимых в среду для культивирования, не оказывает воздействия на рост планктонных культур и биопленок.

2.1.2.2. Никлозамид. В качестве перспективного антибиопленочного агента использовали никлозамид (НПП "Экохимтех"). Никлозамид (2',5-дихлоро-4'-нитросалициланилид). Выпускается под названиями фенасал, мансонил, линтекс, йомезан, фенадек, феналидон. Структурная формула представлена на рисунке 1. Никлозамид слабо растворим в воде, поэтому его исходный раствор (5 мг/мл) готовили в диметилсульфоксиде (ДМСО) (99.99%, АО «ЭКОС-1», Россия; ООО «Паритекс», Россия), а далее разбавляли до нужной концентрации стерильной питательной средой LB (Sigma). Предварительные эксперименты показали, что ДМСО не оказывает воздействия на исследуемые культуры (биопленки и планктонные клетки) в концентрациях, вносимых в среду для культивирования.

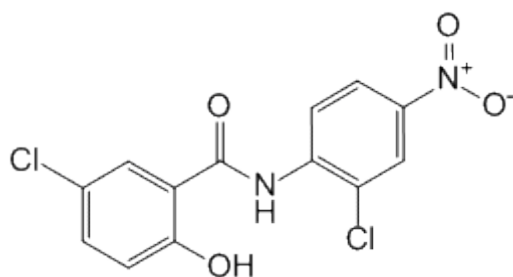


Рис. 1. Структурная формула никлозамида (https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1313.htm).

2.1.2.3. PS291®. В качестве тестируемого компонента косметики использовали олигосахарид PS291® (PS291®). PS291® использовали в виде фабричного стерильного насыщенного раствора в смеси воды и пропандиола. Раствор PS291® хранили при 4°C. Образец раствора добавляли в среду после стерилизации среды непосредственно перед посевом. Исследовали эффект олигосахаридов при его концентрации 4% (эта концентрация чаще всего применяют при создании косметических средств).

2.1.2.4. Термальная вода. Термальная вода Uriage™ (ТВУ) - это природный изотонический минеральный раствор с $\text{pH} \approx 7.0$, содержащий порядка 11 г/л солей. Минеральный состав: сульфаты (2,86 г/л), хлориды (3,5 г/л), бикарбонаты (0,39 г/л). Элементный состав: натрий (3,5 г/л), кальций (0,6 г/л), магний (0,125 г/л), калий (0,0455 г/л), кремний (0,042 г/л), цинк (0,16 мг/л), марганец (0,154 мг/л), медь (0,075 мг/л) и железо (0,015 мг/л) (<https://www.uriage.com/FR/fr/produits/eau-thermale-d-uriage>). Термальная вода выпускается в металлических аэрозольных баллонах объемом до 300 мл и хранится при комнатной температуре. Она не содержит клеток микроорганизмов, поэтому не нуждается в предварительной стерилизации. В экспериментах термальную воду добавляли после стерилизации среды непосредственно перед засевом культур. Исследовали концентрацию ТВУ в среде 50% от объема. В качестве контроля разбавления в ряд образцов добавляли аналогичный объем стерильного физиологического раствора (ФР) с $\text{pH} = 7.0$.

2.1.2.5. Натрийуретические пептиды. Исследовали два натрийуретических пептида человека (НУП): пептид А-типа - ANP (Alfa Aesar, США) с молекулярной массой 3080.47 г/моль и пептид С-типа - CNP (PolyPeptide, Швеция) с молекулярной массой 2.1961 г/моль. Вначале готовили стоковые растворы пептидов: в заводскую склянку с пептидом добавляли стерильную воду MilliQ (MQ). Молярная концентрация стокового раствора ANP составляла $1,623 \times 10^{-4}$ М, стокового раствора CNP – $4,554 \times 10^{-4}$ М. Стоковые растворы разделяли на аликвоты в 500-мкл пробирках Eppendorf и хранили при -20°C . Основываясь на литературных данных, относительно физиологической концентрации пептидов в организме человека (Edwards et al., 1988; Stingo et al., 1992), а также концентраций НУП, используемых в работе с эукариотическими клетками (Klinger et al., 2013), исследовали три концентрации каждого пептида: 1×10^{-6} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-8} М, а также смесь пептидов при концентрации каждого 10^{-6} М. В питательную среду непосредственно перед засевом культуры добавляли стоковый раствор пептида либо стоковый раствор, разведенный в 10 и 100 раз (для получения концентраций 1×10^{-7} М и 1×10^{-8} М соответственно).

2.2. Методы

2.2.1. Исследование влияния азитромицина на рост биопленок *P. chlororaphis* 449

2.2.1.1. Влияние теплового шока на рост биопленок *P. chlororaphis* 449 в присутствии азитромицина. Чувствительность планктонной культуры и биопленок *P. chlororaphis* 449 к тепловому стрессу характеризовали отношением прироста биомассы в присутствии или в отсутствие азитромицина при изучаемых температурах к его приросту при оптимальной температуре (29°C). Метод расчета представлен на рис. 2 на примере планктонной культуры *P. chlororaphis* 449 без антибиотика. Культуру преинкубировали в течение 6 ч – времени, необходимого для проявления «биопленочного» фенотипа и формирования матрикса

(Стрелкова с соавт., 2012). Оптическая плотность (ОП) суспензии планктонных клеток в данном примере через 6 ч достигала величины 0.6. После переноса культуры на изучаемые температуры инкубацию продолжали еще 24 ч. Прирост плотности суспензии планктонных клеток при 29⁰С составил: 2.6 – 0.6 = 2.0 ед. ОП. Эту величину принимали за 100%. Аналогично рассчитывали прирост культуры при других температурах, например, при 37⁰С. В данном случае он составил: 1.6 – 0.6 = 1.0 ед. ОП. Таким образом, относительный прирост при этой температуре равен: $1.0/2.0 \times 100 = 50\%$ (см. рис 2). Подобным образом рассчитывали относительный прирост биопленок.

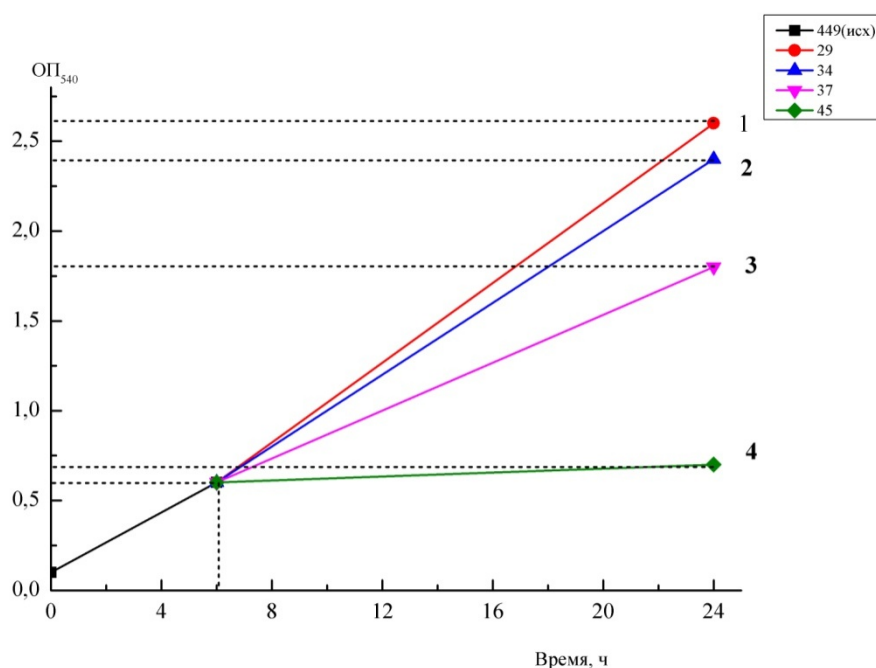


Рис. 2. Демонстрационный график, показывающий способ определения чувствительности планктонной культуры *P. chlororaphis* 449 к тепловому шоку: 29⁰С (1); 34⁰С (2); 37⁰С (3); 45⁰С (4).

2.2.1.2. Эпифлуоресцентная микроскопия биопленок *P. chlororaphis* 449. Для исследований методами фазово-контрастной микроскопии (ФКМ) и эпифлуоресцентной микроскопии (ЭФМ) использовали микроскоп Axio Imager, D1 Carl Zeiss, объектив x40. Биопленки формировали на предметных стеклах. С этой целью стандартные стекла разрезали стеклорезом вдоль на три части и очищали выдерживанием сутки в хромовой смеси. Отмытые стекла стерилизовали в пробирках с 5 мл среды LB (1 ати), куда затем вносили 50 мкл инокулята. После выращивания культуры в течение 24 ч суспензию планктонных клеток сливали, стекла подсушивали, и биопленки фиксировали осторожным нагреванием в пламени горелки. Для ФКМ окрашивание проводили красителем 1,9-диметилметиленовым синим

(ДММС) (Peeters et al., 2008) с некоторыми изменениями. Для получения раствора красителя 16 мг ДММС (двойная соль с хлоридом цинка) растворяли в 5 мл 96% этанола. Отдельно готовили раствор 0.2 г формиата натрия (безводного) и 0.2 мл 99% муравьиной кислоты в 95 мл дистиллированной воды (рН 3.3). После смешивания раствор хранили без доступа света. Он устойчив при комнатной температуре в течение нескольких месяцев. Для ЭФМ использовали краситель DAPI (Журина с соавт., 2013), а также флуоресцентный краситель FilmTracer™ SYPRO Ruby biofilm matrix stain (согласно фирменной методике: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp10318.pdf>).

2.2.1.3. Выращивание биопленок на тефлоновых кубиках. В работе с псевдомонадами использовали метод, разработанный в нашей лаборатории (Стрелкова с соавт., 2012, Плакунов и соавт., 2016). В химически чистые пробирки типа Balch помещали по 21 химически чистых тефлоновых кубика стандартного размера 4x4 мм («ЗАО «Фторопластовые технологии») после чего добавляли по 3 мл жидкой среды LB и стерилизовали. Суточные культуры штаммов *P. chlororaphis* перед посевом разбавляли стерильной жидкой средой LB для достижения стандартной оптической плотности порядка 0,7 при $\lambda = 540$ нм. В пробирки с кубиками вносили по 60 мкл разбавленного посевного материала. Пробирки инкубировали в течение суток или заданное время (в опытах с тепловым воздействием на качалке или в стационарных условиях (опыты с воздействием температуры) при температуре 29°C. По прошествии срока инкубации измеряли оптическую плотность планктонных культур нефелометрическим методом ($\lambda = 540$ нм). Затем кубики с биопленками отмывали 2 раза водопроводной водой от остатков планктонной культуры и окрашивали универсальным красителем кристаллическим фиолетовым (КФ) в течение 15 мин или красителем, специфичным к кислым полисахаридам, - 1,9-диметилметиленовым синим (ДММС) в течение 30 минут. После окрашивания образцы отмывали от красителя водопроводной водой до полного обесцвечивания жидкости. После промывки краситель, связанный с биопленками, экстрагировали в 3 мл этилового спирта (в случае окраски КФ) или 3 мл специального декомплексирующего раствора (в случае ДММС). Количество биопленок определяли колориметрическим методом относительно холостого (без засева) образца. В случае КФ $\lambda = 590$ нм, в случае ДММС - $\lambda = 670$ нм.

Состав декомплексирующего раствора для ДММС (г/л): ацетат натрия – 4,1; гуанидин солянокислый – 191,06; пропанол (изопропанол) – 40 мл; вода дистиллированная; рН = 7,8.

2.2.2. Исследование влияния никлозамида на рост штаммов-комменсалов кожи человека

2.2.2.1. Идентификация микроорганизмов. Выделение ДНК кожных изолятов С01 и Н01 проводили с помощью набора Diatom DNA Prep 200 (Изоген, РФ) по инструкциям производителя. Амплификацию проводили из 20 нг геномной ДНК, с помощью полимеразы

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, USA) (использовался фирменный готовый рабочий раствор, содержащий все необходимые компоненты). Для амплификации гена 16S rRNA использовали праймеры 515-F: GTGCCAGCMGCCGCGGTAA (Turner et al., 1999) и 907-R: CCGTCAATTCMTTTRAGTTT (Lane, 1991). ПЦР-реакцию проводили при следующих условиях: 95 °С 3 мин; 95 °С 15 сек, 58,8 °С 25 сек, 72 °С 30 сек — 35 циклов; 72 °С 5 мин'. Затем ПЦР-смесь очищали на гранулах Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Секвенирование полученных фрагментов осуществляли в центре «ЦКП геном» (genome-centre.ru) на приборе 3730xl DNA Analyzer (ThermoFisher).

Выделение ДНК проводилось сотрудниками лаборатории эволюционной геномики Института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского: к.б.н., с.н.с. Штратниковой В.Ю. и к.б.н., с.н.с. Логачевой М.Д.

2.2.2.2. Определение жизнеспособности клеток в составе биопленок. Жизнеспособность клеток определяли методом окрашивания биопленок, выращенных на стекловолоконных фильтрах в присутствии исследуемых соединений 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ, Плакунов и соавт., 2016). МТТ – это метаболизируемый краситель, служащий акцептором электронов от НАДН в НАДН-дегидрогеназных реакциях в клетке (Berrige, Tan, 1993). Восстанавливаясь, МТТ превращается в нерастворимый в воде формазан, количество которого служит маркером метаболической активности. Фильтры с биопленками помещали в лунки иммунологического планшета, после чего добавляли 2 мл 0.1% или 0.2% (в зависимости от микроорганизма, см. далее) МТТ в стерильной среде LB и выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Затем фильтры отмывали дистиллированной водой для удаления остатков МТТ и экстрагировали формазан 2 мл ДМСО. Измеряли оптическую плотность экстрактов при длине волны 595 нм.

2.2.3. Исследование влияния компонентов косметики на рост комменсалов кожи человека

2.2.3.1. Исследование динамики роста культур в присутствии компонентов косметики. Для определения влияния компонентов косметики и натрийуретических пептидов на рост микроорганизмов-комменсалов кожи человека исследовали динамику их роста в присутствии исследуемых соединений. Эксперименты проводили в системе Bioscreen C (Finland) в 100-луночных иммунологических планшетах Honeycomb (Grow Curves, USA) и в системе SAFAS (Монако) в 96-луночных планшетах (NUNC). В лунки вносили необходимую для конкретного микроорганизма среду и исследуемые соединения в нужных концентрациях. Перед посевом клетки из посевной культуры осаждали центрифугированием при комнатной температуре, скорости 7500 об./мин в течение 10 мин и отмывали дважды физиологическим раствором NaCl (ФР) с pH 7.0. Суспензию отмытых клеток доводили до $ОП_{580} = 1.0$, после чего добавляли в

лунки с расчетом, чтобы конечная оптическая плотность составляла 0.08. Часть лунок служила положительным контролем (без добавления исследуемых соединений), а часть - оставляли незасеянными в качестве холостых контролей. *S. aureus* MFP03 выращивали аэробно при 37°C и среднем темпе качания в течение 24 ч с интервалом измерения 15 мин. *C. acnes* выращивали анаэробно при 37°C. Для достижения анаэробных условий планшеты с *C. acnes* выдерживали в системе GasPak® в течение 2 ч при комнатной температуре, после чего вынимали их из пакета и немедленно изолировали щели между крышкой и планшетом парафиновой пленкой ParaFilm (Bemis NA, США). После этого планшеты устанавливали в гнезда прибора и инкубировали 72 ч с интервалом измерения 15 мин. По истечении срока инкубации результаты опытов анализировали в пакете Microsoft EXCEL для выявления эффектов натрийуретических пептидов. Эксперименты проводили минимум в трех повторностях.

2.2.3.2. Выращивание биопленок на иммунологических планшетах. Биопленки *C. acnes* и *S. aureus* культивировали в 96-луночных полистиреновых плоскодонных иммунологических планшетах фирмы NUNC. Опыты проводили по классической методике (O'Toole, 2011) с изменениями. Вкратце: в лунки планшета добавляли по 200 мкл смеси питательной среды и растворов исследуемых соединений. После этого вносили посевной материал (предварительная культура) ОП₅₈₀ порядка 1.7±0.2. В случае *S. aureus* MFP03 соотношение объема вносимого посевного материала и среды в лунке было 1:40 (25 мкл посевного материала), в случае *C. acnes* – 1:6. После этого планшеты инкубировали при 37°C: *S. aureus* на качалке в течение 24 ч, *C. acnes* – статически в течение 72 ч в системе GasPak™. После инкубации планктонные культуры удаляли, планшеты трижды промывали ФР рН 7.0 для удаления остатков планктонной культуры. Затем планшеты высушивали при 60°C 5-10 мин, после чего биопленки фиксировали 96% этанолом 15 мин. После фиксации спирт удаляли, планшеты высушивали и окрашивали 0.1% раствором кристаллического фиолетового (КФ) в течение 15 мин. После окраски планшеты промывали водой до полного удаления растворенного красителя и экстрагировали связанный с биопленками КФ 96% этанолом в течение часа. Далее на спектрофотометре BioRad измеряли оптические плотности экстрактов при $\lambda=595$ нм.

2.2.3.3. Исследование свойств поверхности клеток. Для определения влияния исследуемых соединений на свойства поверхности клеток использовали метод микробной адгезии к растворителям (Bellon-Fontaine et al., 1996; N'Diaye et al., 2016). Кратко: моновидовые бактериальные культуры, выращенные в присутствии тестируемых веществ, осаждали, отмывали стерильным ФР и ресуспендировали в ФР до конечной ОП₄₀₀ = 0.8. Далее суспензии клеток смешивали с полярными (хлороформ и этилацетат) и неполярными (декан и гексадекан) органическими растворителями, после чего анализировали ОП₄₀₀ водной фазы. Сравнением сродства клеток к тем или иным растворителям оценивали изменение гидрофобности и заряда

поверхности клеток: изменение оптической плотности водной суспензии клеток в присутствии того или иного растворителя с определенными физико-химическими свойствами позволяло судить о сродстве клеток к этому растворителю, заряде и свойствах их поверхности. Изменение сродства клеток к растворителю в присутствии активных соединений свидетельствовало об изменении свойств поверхности клеток. Эксперименты проводили независимо не менее 5 раз.

2.2.3.4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия моновидовых биопленок выращенных в присутствии компонентов косметики. Моновидовые биопленки исследуемых микроорганизмов выращивали в 24-луночных планшетах Sensoplate (Geiner bio-one, Germany) с плоским стеклянным дном. Использовали два способа получения биопленок: первый основан на методике Coyene et al., 2007 с изменениями. Подготовленный посевной материал осаждали центрифугированием при 7500 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре, клетки промывали дважды ФР. Суспензию отмытых клеток доводили до $ОП_{580} = 1$ добавлением ФР. В лунки вносили по 300 мкл суспензии клеток и выдерживали 2 ч при комнатной температуре (за это время происходит адгезия клеток к поверхности). *S. acnes* выдерживали в системе GasPak® в анаэробной атмосфере. По прохождении двух часов суспензию клеток удаляли из лунок, лунки промывали дважды ФР для устранения планктонных клеток, после чего в лунки вносили 1 мл среды, содержащей требуемую концентрацию исследуемого соединения. Второй способ применяли для *S. aureus*: в лунки добавляли среду с исследуемым соединением, после чего вносили суспензию клеток и культивировали на качалке без этапа предварительной адгезии. Таким образом исследовали формирование микроколоний в условиях равновесия с планктонной культурой.

Биопленки *S. aureus* выращивали в течение 24 ч, *S. acnes* – 72 ч. Во всех случаях, где необходимо было поддерживать анаэробную атмосферу, использовали систему GasPak®. По истечении срока выращивания биопленки всех штаммов отмывали дважды стерильным ФР и окрашивали зеленым флуоресцирующим красителем SYTO9 Green. После окраски образцы фиксировали ProLong® Diamond Antifade Mountant (Molecular Probes™) и исследовали в инвертированном конфокальном лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 (Zeiss, Germany) при помощи программы Zen® 2009. Математическую обработку изображений и вычисление показателей проводили с помощью пакета ImageJ. Анализировали среднюю толщину биопленок (мкм) и объем биомассы на единицу площади (мкм³/мкм²). Эксперименты проводили не менее, чем в четырех независимых повторностях.

При исследовании влияния компонентов косметики их эффекты изучали при концентрациях, аналогичных таковым в экспериментах с окраской биопленок кристаллическим фиолетовым.

2.2.3.5. Исследование влияния компонентов косметики на бинарные биопленки *S. aureus* MFP03, *S. epidermidis* MFP04 и *C. acnes*. В случае бинарных систем стафилококков опыты проводили в стеклянных пробирках. Кратко: в стеклянные пробирки с винтовыми крышками добавляли по 6 мл среды TSB с 0.25% глюкозы с добавлениями 50% TBY (контроль – 50% ФР) или 4% PS291®, вносили по 100 мкл суспензии клеток каждого микроорганизма. Параллельно производили посев моновидовых культур. Биопленки выращивали в течении 24 ч на качалке. По истечении срока инкубации один образец из каждого варианта использовали для определения числа КОЕ, а второй – для измерения метаболической активности клеток.

В случае бинарных систем *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5 биопленки выращивали в 12-луночных полистиреновых планшетах (Thermo Scientific) на стекловолоконных фильтрах в жидкой среде RCM. Кратко: на дно каждой лунки помещали стерильный фильтр и добавляли 3 мл среды с добавкой 50% TBY (контроль – 50% ФР) или 4% PS291®. Параллельно производили посев моновидовых культур каждого микроорганизма. Все варианты дублировали. Биопленки выращивали в течении 72 ч при 33°C в анаэробных условиях (GasPak®). По истечении срока инкубации производили манипуляции, описанные выше.

2.2.4. Исследование влияния натрийуретических пептидов на биопленки комменсалов кожи человека

2.2.4.1. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия моновидовых биопленок выращенных в присутствии НУП. Биопленки выращивали по описанной выше методике с этапом первичной адгезии. Для выяснения возможного влияния микроокружения на эффект НУП, исследовали рост моновидовых биопленок *S. aureus*, *S. epidermidis* и *C. acnes* в разных условиях, описанных в табл. 2.

Таблица 2. Условия культивирования биопленок микроорганизмов кожи в присутствии НУП.

Штамм	<i>S. aureus</i> MFP03				<i>C. acnes</i> RT4, RT5	
	<i>S. epidermidis</i> MFP04					
Условия	37°C, аэробная атмосфера, среда TSB	33°C, аэробная атмосфера, среда TSB	33°C, анаэробная атмосфера, среда TSB	33°C, анаэробная атмосфера, среда RCM	37°C, анаэробная атмосфера, среда RCM	33°C, анаэробная атмосфера, среда RCM

В случае стафилококков также проводили эксперименты по исследованию формирования микроколоний в равновесии с планктонной культурой при 37°C и 33°C в аэробной атмосфере.

Эксперименты проводили не менее чем в трёх независимых повторностях.

2.2.4.2. Исследование динамики роста культур в присутствии НУП. Эффекты НУП на рост культур исследовали по описанной выше методике в системе Bioscreen. Дополнительно исследовали влияние НУП на рост стафилококков при 33°C.

2.2.4.3. Исследование биопленок стафилококков, выращенных в присутствии НУП, при помощи КФ.

Выращенные на стенках и дне лунок планшетов биопленки обрабатывали по методике, описанной выше. Исследовали тотальную биомассу биопленок и изменения ее количества под воздействием НУП при разных температурах культивирования.

2.2.4.4. Исследование взаимоотношений микроорганизмов в бинарных биопленках *C. acnes*, *S. epidermidis* и *S. aureus*. Для определения влияния штаммов друг на друга (подавляющее рост, нейтральное или стимулирующее рост) биопленки выращивали на чашках Петри с агаризованной средой RCM (в случае вариантов с *C. acnes*) либо TSB (в случае бинарных биопленок стафилококков). В качестве носителя использовали стекловолоконные фильтры Whatman GF/F диаметром 21 мм. Стерилизованные автоклавированием стекловолоконные фильтры размещали на поверхности плотной среды. На центр фильтра наносили 25 мкл суспензии отмытых клеток каждого штамма в ФР (ОП₅₈₀ = 1). Каждый образец дублировали. Параллельно выращивали моновидовые биопленки каждого микроорганизма в качестве контроля. По истечении срока инкубации один фильтр с биопленкой использовали для определения жизнеспособности клеток в биопленке, второй – для определения количества колониеобразующих единиц (только для *S. aureus*). Эксперименты проводили не менее чем в трех статистических повторностях.

Время и температура инкубирования зависели от штаммов. Моновидовые биопленки *S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. acnes* и бинарные варианты выращивали в течение 72 ч в анаэробной атмосфере. Для исследования влияния НУП и компонентов косметики на бинарные биопленки использовали штаммы *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5, поэтому предварительно проверили их влияние друг на друга при 33°C в различных вариантах бинарных биопленок, представленных в табл. 3. После предформирования фильтры с биопленками помещали на чашки со свежей средой.

Таблица 3. Варианты исследованных бинарных биопленок *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03 на чашках Петри при 33°C.

Компонент	Предформируемая биопленка	Вторичный колонизатор
Вариант биопленки		

Одновременный рост	нет	нет
Предформированные в аэробных условиях биопленки <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> , выращенный в течение 24 часов	<i>C. acnes</i> RT5, посеянный на выросшую биопленку <i>S. aureus</i> . Инкубацию производили в течение 72 ч после посева
Предформированные в анаэробных условиях биопленки <i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> , выращенный в течение 24 ч в отсутствие кислорода	<i>C. acnes</i> RT5, посеянный на выросшую биопленку <i>S. aureus</i> . Инкубацию производили в течение 72 ч после посева
Предформированные биопленки <i>C. acnes</i>	<i>C. acnes</i> RT5, выращенный в течение 72 ч	<i>S. aureus</i> , посеянный на выросшую биопленку <i>C. acnes</i> RT5. Инкубацию производили в течение 24 ч после посева

Для сравнения одновременно с бинарными биопленками выращивали моновидовые биопленки с таким временным расчетом, чтобы время инкубации каждого штамма было одинаковым в моновидовой и бинарной биопленке. Например, в случае бинарных биопленок на основе предформированных биопленок *S. aureus* моновидовые пленки *S. aureus* выращивались в течение 96 ч (24 ч на предформирование, затем перенос на свежую среду, засев *C. acnes* и выращивание бинарных биопленок в течение еще 72 ч). Аналогично и с биопленками на основе предформированных *C. acnes*.

2.2.4.5. Определение числа КОЕ в бинарных биопленках *S. aureus* MFP03, *S. epidermidis* MFP04 и *C. acnes*. Из-за высокой склонности клеток *C. acnes* к агрегации, в случае с бинарными биопленками стафилококков и *C. acnes* использовали в качестве достоверно измеримого параметра количество клеток стафилококков. После посева культур на фильтры производили контрольный рассев 25 мкл посевного материала *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 для подсчета КОЕ. По истечении срока культивирования фильтры с моновидовыми биопленками стафилококков и бинарными биопленками помещали в стеклянную пробирку с 5 мл стерильного ФР. После при помощи стерильной стеклянной палочки производили первичную гомогенизацию фильтра. Затем суспензию стеклянных волокон и биопленок вортиксировали в течение 30 сек при высокой скорости вращения ротора. Стеклянные волокна фильтра выступали в качестве абразивного материала, дополнительно обеспечивавшего гомогенизацию биопленки. После этого производили серию разведений до 10^7 раз. Три самых высоких разведения (10^5 , 10^6 , 10^7 раз) рассевали на чашки Петри с триптон-соевым агаром (TSA, Sigma)

с добавлением 0,25% по массе глюкозы. Чашки инкубировали 48 ч при 37°C, после чего производили подсчет КОЕ и рассчитывали количество КОЕ в исходной суспензии. Результаты представляли в виде прироста логарифма числа КОЕ в биопленке по сравнению с числом КОЕ в инокулируемом объеме посевного материала.

2.2.4.6. Определение влияния натрийуретических пептидов на бинарные биопленки *C. acnes* RT5 и *S. aureus*. Биопленки выращивали в 12-луночных полистиреновых планшетах (Thermo Scientific) на стекловолоконных фильтрах в жидкой среде RCM аналогично экспериментам с компонентами косметических препаратов. Кратко: на дно каждой лунки помещали стерильный фильтр и 3 мл среды с добавлением нужного пептида. Исследовали ANP в концентрации 1×10^{-8} М и CNP – 1×10^{-7} М. Эксперименты проводили по протоколу, использованному в экспериментах с компонентами косметики.

2.2.4.7. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH) бинарных биопленок *C. acnes* RT5 и *S. aureus*. Биопленки исследуемых микроорганизмов выращивали в 24-луночных планшетах Sensoplate (Geiner bio-one, Germany) с плоским стеклянным дном. Исследовали три варианта биопленок, представленных в табл. 4.

Таблица 4. Варианты бинарных биопленок *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03, исследованных при помощи FISH.

Компонент Вариант биопленки	Предформируемая биопленка	Вторичный колонизатор
Одновременный рост	Нет.	Нет
Предформированные биопленки <i>S. aureus</i> MFP03	<i>S. aureus</i> MFP03, выращенный в течение 24 ч в присутствии пептидов	<i>C. acnes</i> RT5, посеянный на выросшую биопленку <i>S. aureus</i> MFP03. Инкубацию производили в течение 72 ч после посева в присутствии пептидов.
Предформированные биопленки <i>C. acnes</i> RT5	<i>C. acnes</i> RT5, выращенный в течение 72 ч в присутствии пептидов.	<i>S. aureus</i> MFP03, посеянный на выросшую биопленку <i>C. acnes</i> RT5. Инкубацию производили в течение 24 ч после посева в присутствии пептидов.

В случае с одновременно выращенными биопленками, а также первичными колонизаторами в предформированных вариантах использовали методику выращивания биопленок, аналогичную методике для моновидовых биопленок в экспериментах с КЛСМ. Для получения одновременно формируемых биопленок в лунки добавляли по 300 мкл суспензии клеток каждого микроорганизма. Одновременно формируемые биопленки выращивали в течение 72 ч. Все биопленки растили в анаэробных условиях при 33°C на среде RCM без перемешивания. В случае предформированных биопленок по истечении срока инкубации первичного колонизатора среду удаляли, дважды промывали предформированную биопленку ФР. После этого в лунки вносили свежую среду RCM с добавлением пептидов и засеивали вторичный колонизатор: вносили 40 мкл суспензии клеток второго микроорганизма.

FISH проводили по методике, описанной Nistico et al., 2014. Кратко: по окончании времени выращивания среду вместе с планктонными клетками удаляли, лунки промывали дважды ФР. Биопленки фиксировали 100% метанолом в течении 30 мин, метанол удаляли, образцы сушили при комнатной температуре в течение ночи. Фиксированные биопленки обрабатывали лизоцимом (0.1 мг/мл в буфере 0.1M трис-HCl pH 8.0 + 0.05M ЭДТА): в каждую лунку добавляли 200 мкл раствора лизоцима. В герметичный пакет из-под GasPak® помещали бумажное полотенце, смоченное водой для поддержания высокой влажности и во избежание пересыхания образцов. Закрытые планшеты помещали внутрь пакета и закрывали его. Инкубировали 3 ч при 37°C. После инкубации раствор лизоцима аккуратно удаляли пипетированием, после чего вносили 200 мкл раствора лизостафина 10 мкг/мл в буфере (трис-HCl pH 8.0, 0.01% додецилсульфат натрия, 20% формамид). Планшеты инкубировали в аналогичной системе в течение 10 мин при 37°C. Лизостафин аккуратно удаляли, лунки промывали дважды фосфатным буфером с pH 7.4. Затем пермеабелизировали мембраны клеток возрастающими концентрациями раствора этанола в фосфатном буфере: 50%, 80%, 100%, 3 мин на каждый раствор. После удаления этанола образцы тщательно высушивали при комнатной температуре.

Для гибридизации *S. acnes* RT5 использовали зонд 5'-GCCCAAGATTACACTTCCG-3', описанный Poppert et al., 2010 производства Eurogentec. На 5'-конце зонд был помечен флуоресцентным красителем Alexa Fluor 546. Образец зонда в заводской пробирке растворяли в 50 мкл стерильной MQ-воды и хранили при -20°C. В работе использовали гибридизационный буфер: в 2-мл пробирке Eppendorf смешивали 360 мкл 5M раствора NaCl, 40 мкл 1M раствора трис-HCl pH 8.0, 600 мкл формамида (30% по объему). Раствор доводили до объема 2 мл MQ-водой, после чего вносили 2 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия. Пробирки оборачивали алюминиевой фольгой для минимизации попадания света. Непосредственно перед гибридизацией в 2 мл буфера вносили 1,5 мкл раствора зонда, чтобы конечная концентрация

составляла порядка 50 нг/мкл. В лунки вносили по 200 мкл гибридизационной смеси. Закрытые планшеты с пробами помещали в герметичные пакеты GasPak® с влажными бумажными полотенцами, использовавшимися при обработке лизоцимом и лизостафином, пакеты закрывали и немедленно оборачивали фольгой для защиты от света. Гибридизацию производили при 46°C в течение часа. Пока шла гибридизация, готовили промывочный буфер: в коническую центрифужную пробирку Corning на 50 мл добавляли 1 мл 1М раствора трис-НСl pH 8.0, 1,02 мкл 5М NaCl, 500 мкл ЭДТА 0.5М. Затем доводили объем до 50 мл MQ-водой и добавляли 50 мкл 10% раствора додецилсульфата натрия. По окончании гибридизации жидкость аккуратно удаляли пипетированием, в лунки добавляли по 1 мл промывочного буфера и выдерживали в темноте при 48°C 15 мин. Затем жидкость убирала, лунки с биопленками промывали MQ-водой и высушивали при комнатной температуре. Биопленки покрывали 100 мкл фиксирующей жидкости ProLong™ Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher), содержащей DAPI, после чего планшеты, обернутые фольгой, выдерживали сутки при 4°C.

КЛСМ производили в синем и красном диапазонах флуоресценции, соответствующих эмиссии DAPI и AlexaFluor 546. DAPI использовали как индикатор тотальной биомассы *S. aureus* и *C. acnes*. Для каждого образца проводили сканирование не менее пяти раз в каждом цвете, а также в двухцветном формате. Определяя показатели тотальной биомассы и биомассы *C. acnes* с помощью плагина Comstat2 в пакете ImageJ, мы рассчитывали соотношение биомассы двух микроорганизмов и влияние на него натрийуретических пептидов. Эксперименты проводили в 3-х статистических повторностях.

2.2.4.8. Protein-BLAST-исследование гомологичных последовательностей белков.

Основываясь на данных (Rosay et al., 2015) об амидазе *P. aeruginosa* AmiC как рецепторе НУП CNP, провели поиск сходных с последовательностью AmiC *P. aeruginosa* последовательностей среди представителей таксонов *Propionibacteriaceae* и *Staphylococcaceae*. Затем произвели поиск гомологий амидазы *C. acnes* среди таксонов *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* и *Staphylococcaceae*. Процедуру Protein-BLAST проводили на базе сайта NCBI Национального института здоровья США (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.2.4.9. Исследование бинарных культур и биопленок *S. aureus* и *S. epidermidis*.

В стерильные стеклянные пробирки с винтовыми крышками помещали по 6 мл TSB с глюкозой и по 2 круглых стекловолоконных фильтра Whatman GF/F диаметром 21 мм (Sigma), предварительно стерилизованных автоклавированием при 1 ати. Фильтры размещали вдоль стенок пробирки так, чтобы они были на одном уровне по высоте, полностью покрыты средой и не соприкасались. Затем в пробирки добавляли в нужном количестве пептиды (контролем служили образцы без добавок). Подготовленный посевной материал разбавляли стерильным ФР

до $ОП_{580} = 0.5$ и вносили в пробирки в количестве 100 мкл. Исследовали параллельно моновидовые культуры и биопленки обоих микроорганизмов и бинарную систему. После посева исходную культуру сразу же рассеивали на чашки Петри с агаризованным TSB с глюкозой для подсчета КОЕ. По прошествии 24 ч инкубации при 37°C фильтры извлекали, споласкивали в стерильном ФР для удаления незакрепленных клеток. Для подсчета КОЕ в биопленках фильтры помещали в пробирку с 5 мл стерильного ФР, измельчали стеклянной палочкой, вортиксировали в течение 1 мин (для диспергирования биопленок) и производили рассев на чашки Петри для подсчета КОЕ. Другие фильтры с биопленкой после промывания использовали для измерения метаболической активности клеток. Параллельно измеряли оптическую плотность планктонной культуры при $\lambda=580$ нм и производили рассевы для подсчета КОЕ планктонной культуры каждого образца.

2.2.5. Исследование биохимического состава матрикса *C. acnes* RT5

2.2.5.1. Выращивание биопленок и подготовка биомассы *C. acnes* RT5 для выделения матрикса. Перед посевом подготовленную 3-дневную культуру дважды отмывали стерильным физиологическим раствором и им же доводили до оптической плотности $ОП_{580} = 0.5$. На чашки Петри с 25 мл агаризованной среды RCM помещали по два ацетат-целлюлозных фильтра (Sartorius), предварительно стерилизованных автоклавированием при 1 ати. На каждый фильтр наносили по 200 мкл подготовленной суспензии и распределяли носиком пипетки по фильтру. Чашки в количестве 14 штук инкубировали в анаэроостате GasPak® в течение 7 сут при 37°C. Выросшую биомассу собирали в коническую центрифужную пробирку Corning Falcon объемом 50 мл (конечный сырой объем составлял порядка 1,5 мл) и разжижали добавлением 1 мл MilliQ-воды (MQ) с последующим вортиксированием. Затем собирали разжиженную биомассу на дне пробирки центрифугированием на аппарате Sigma 3-16L при скорости 2000 об./м в течение 5 мин. Для отделения матрикса от клеток использовали механический способ: осажденную биомассу обрабатывали ультразвуком на установке Branson Digital Sonifier 250 (США) с экспоненциальным зондом диаметром 3/16 дюйма при 25% (120 мкм) амплитуде и частоте 20 кГц в течение 15 мин, либо на установке Sonyprep 150 Plus (Великобритания) с 3 мм экспоненциальным зондом при амплитуде 150 мкм и частоте 23 кГц в течение 10 мин.

2.2.5.2. Выделение матрикса *C. acnes* RT5. Отделение матрикса от клеток производили центрифугированием на сверхвысоких скоростях в градиенте хлорида цезия. В пробирке для ультрацентрифуги [Beckmann Coulter 355618 PC 26,3 мл или полиалломерных стаканах объемом 38 мл] последовательно наслаивали растворы CsCl (ω , %): 46, 28, 14, 7, после чего вносили суспензию (см табл. 5). Центрифугирование производили на ультрацентрифуге Beckmann coulter Optima X-100 в угловом роторе 70 Ti. При ускорении 170000 g в течение трех часов при комнатной температуре, или же на ультрацентрифуге Beckmann Avanti J-30I, в

бакетном роторе JS 24.38. при ускорении 100000 g в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем супернатант отделяли от осадка и дополнительно центрифугировали при 6000-8000 rpm в течение 15-20 мин для осаждения остатков биомассы клеток, которые в малом количестве возвращаются в суспензию при переливании. Определяли оптическую плотность образцов матрикса при 540 нм. Образцы матрикса хранили при -20°C.

Таблица 5. Характеристики растворов CsCl, использованных для создания градиента концентрации.

№ раствора CsCl	ω (CsCl), %	d_{20}^{20}
1	7	1,054
2	14	1,1163
3	28	1,2644
4	46	1,5158

2.2.5.3. Определение активности лактатдегидрогеназы клеток. проверку возможности загрязнения полученных образцов матрикса компонентами разрушенных клеток, производили при помощи набора для измерения активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Лактатдегидрогеназа является преимущественно внутриклеточным ферментом, в норме не секретирующимся (Chao et al., 1988; Lin et al., 2018), что делает её удобным индикатором разрушения клеток при наличии её активности в супернатанте. У *S. acnes* имеются ЛДГ (Counotte et al., 1980; Koniarová, 1993; Brzuszkiewicz et al., 2011), что обосновывает применение данной методики. Определение производили при помощи готового набора (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega). Метод основан на колориметрическом определении формазана, образующегося в ходе реакций превращения лактата в пируват, катализируемого ЛДГ: образующийся НАДН служит источником электронов для восстановления йодониттетразолиевого фиолетового в формазан. Активность ЛДГ определяли по фабричному протоколу (<https://france.promega.com>): оптическую плотность суспензии клеток при 490 нм доводили до уровня оптической плотности раствора матрикса, после чего проводили измерение активности ЛДГ.

2.2.5.4. Контроль степени разрушения клеток *S. acnes* в процессе выделения матрикса микроскопическим методом. Для подтверждения того, что клетки не разрушаются в ходе процедур получения матрикса, биомассу *S. acnes* подвергали воздействию лизоцима, лизостафина, лизирующего буфера (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega), ультразвука и их сочетаний. Контроль осуществляли применением вышеописанного готового

набора для определения активности ЛДГ, а также микроскопически: препараты фиксировали на стекле и окрашивали 0.1% кристаллическим фиолетовым, после чего исследовали в инвертированном микроскопе Zeiss Axio Observer A1. Условия:

- 1) интактные клетки – без обработки (контроль).
- 2) Клетки обрабатывали однократным литическим буфером (Promega) в течение 40 мин при комнатной температуре.
- 3) Клетки обрабатывали раствором лизоцима 0.01 мг/мл в однократном литическом буфере в течение 30 мин при 37°C.
- 4) Клетки обрабатывали раствором лизоцима 1 мг/мл в буфере (0.1 М Трис-НСl и 0.05 М ЭДТА) в течение 30 мин при 37°C, затем обрабатывали ультразвуком на установке Branson Digital Sonifier 250 с экспоненциальным зондом диаметром 3/16 дюйма при 50% (229 мкм) амплитуде и частоте 20 кГц в течение 15 мин.
- 5) Клетки обрабатывали раствором лизоцима 2 мг/мл в буфере (0.1 М Трис-НСl и 0.05 М ЭДТА) в течение 30 мин при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием при 7500 об./мин, лизоцим удаляли, пеллету ресуспендировали в пятикратном литическом буфере (Promega) и выдерживали в течение 40 мин при комнатной температуре. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком на установке Branson Digital Sonifier 250 с экспоненциальным зондом диаметром 3/16 дюйма при 50% (229 мкм) амплитуде и частоте 20 кГц в течение 15 мин.

2.2.5.5. Определение количества органического углерода в матриксе. Общее количество органического углерода в образцах матрикса определяли методом мокрого сжигания в смеси концентрированной серной кислоты (Sigma) и бихромата калия (Sigma) по методике Walkley, 1947 с изменениями. Кратко: 14,71 г бихромата калия растворяли в 150 мл MQ-воды, после чего в полученный раствор аккуратно вливали 100 мл 96% серной кислоты. К образцам матрикса объемом 1 мл, разбавленным в 10 раз, добавляли по 3 мл реактива, после чего выдерживали 90 мин на кипящей водяной бане. Параллельно с образцами производили сжигание глюкозы в серии калибровочных растворов (10-2000 мкг/мл глюкозы в дистиллированной воде). По истечении 90 мин образцы остужали и измеряли оптическую плотность при 590 нм. По калибровочной кривой рассчитывали количество органического углерода в образцах.

2.2.5.6. Определение количества редуцирующих сахаров в матриксе. Определяли количество редуцирующих сахаров (а, следовательно, полисахаридов) в препаратах матрикса антроновым методом (Dreywood, 1946). Механизм реакции заключается в образовании окрашенных соединений в результате конденсации фурфуролов, образующихся при воздействии серной кислоты на углеводы, с антроном. Кратко - вначале готовили антроновый реактив: 0.2 г антрона (Sigma) растворяли в 100 мл 96% серной кислоты (Sigma). Готовили

стандартный раствор глюкозы для построения калибровочной кривой: в 1 литре кипящей MQ-воды растворяли 2,5 г бензойной кислоты. Раствор охлаждали, после чего в 100 мл раствора количественно добавляли 1 г глюкозы. Раствор хранили при 4°C в темноте.

Перед анализом производили частичный гидролиз полисахаридов: к разбавленным в 50-80 раз образцам матрикса добавляли по 200 мкл 96% серной кислоты, после чего выдерживали в закрытых пробирках 4 ч на кипящей водяной бане. После гидролиза к образцам добавляли два объема антронового реактива и выдерживали на кипящей водяной бане 16 мин. Параллельно проводили реакцию с серией калибровочных растворов глюкозы концентрацией от 5 до 50 мкг/мл (с шагом 5 мкг/мл), сделанных на основе стандартного раствора. В качестве контроля использовали MQ-воду. После пробирки остужали и измеряли оптическую плотность при 625 нм против контроля. По калибровочной кривой определяли концентрацию редуцирующих сахаров в образцах. Также, для сравнения исследовали образцы без предварительного гидролиза.

2.2.5.7. Определение количества белков в матриксе. Использовали стандартный протокол определения белков по Бредфорду (Bradford, 1976). В качестве калибровки для обоих экспериментов использовали диапазон концентраций бычьего сывороточного альбумина (БСА, Sigma).

2.2.5.8. Определение количества ДНК в матриксе. ДНК в растворе матрикса определяли колориметрически по методу Дише (Dische, 1955). Метод основан на реакции дезоксирибозы с дифениламином в ледяной уксусной кислоте при нагревании, в ходе которой образуется оксилевулиновый альдегид, конденсирующийся с дифениламином с образованием окрашенного соединения. Кратко: вначале готовили раствор дифениламина: 1 г дифениламина (Sigma) растворяли в 100 мл ледяной уксусной кислоты (Emsure), после чего к раствору добавляли 2,75 мл 96% серной кислоты (Sigma). Затем готовили образцы и калибровочные растворы ДНК из молоков сельди (Sigma) от 50 до 500 мкг/мл с шагом 50 мкг/мл. В качестве контроля использовали MQ-воду. По калибровочной кривой определяли концентрацию ДНК в образцах.

2.2.5.9. Масс-спектрометрическое исследование белков матрикса биопленок *S. acnes* RT5 методом орбитальной ионной ловушки (Orbitrap). Исследования протеома матрикса производились на базе Лаборатории полимеров, биополимеров и поверхностей PBS UMR 6270 (Laboratoire de polymeres, biopolymeres, surfaces, PBS) Университета Руана (Руан, Франция). Непосредственная подготовка образцов к анализу производилась PhD Себастьяном Масье (Sébastien Massier), получение спектров, обработка данных и идентификация белков производилась PhD Жюли Ардуэн (Julie Hardouin).

Первичная подготовка образцов матрикса для масс-спектрометрического анализа заключалась в удалении хлорида цезия из раствора. Образцы помещали в диализные мешочки с

пропускной способностью 0.1-0.5 кДа (Spectrum Repligen, США), закрытые мешочки помещали в емкость с MQ-водой объемом 2 л. Диализ проводили в течение 20 часов, воду меняли трижды. Затем к образцам добавляли 4-кратный объем ацетона и инкубировали 10 минут при комнатной температуре для осаждения белков. Затем белки собирали путем центрифугирования при 15000 g в течение 30 минут при комнатной температуре. На всех этапах (образцы до диализа, после диализа, супернатант после осаждения белков) производили контроль концентрации белков по Бредфорду для оценки возможных потерь материала.

Непосредственная подготовка образцов к анализу заключалась в последовательном проведении следующих манипуляций. Белки ресуспендировали в 1 мл ацетона, переносили в пробирки Eppendorf и осаждали центрифугированием при 12000 об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем супернатант удаляли, образцы сушили в испарителе SpeedVac в течение 15 мин. При необходимости образцы хранили при -20°C. Перед анализом белки растворяли в 25 мкл буфера R2D2 следующего состава: мочевины 7 М, тиомочевина 2 М, три-*n*-бутилфосфин 5 мМ, дитиотреиол 20 мМ, 3-(4-гептил)фенил-3-гидроксипропилдиметиламмонийпропилсульфонат (C7BzO) 0.5%, 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропилсульфата гидрат (CHAPS) 2%. Затем белки расщепляли трипсином и отправляли на масс-спектрометрию.

Для тандемной масс-спектрометрии все эксперименты проводили на аппарате LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Scientific) в сочетании с Easy nLC II (Thermo scientific). 1 мкл образца инъецировали в накопительную колонку (C18 RepMap100, Thermo Scientific). Разделение выполняли с помощью аналитической иглы (NTCC-360/100-5-153, Nikkyo Technos, Япония). Подвижная фаза состояла из 0.1% раствора муравьиной кислоты в воде (буфер А) и 0.1% раствора муравьиной кислоты в 40% водном растворе триметиламина (буфер В). Пептиды элюировали со скоростью 300 нл/минуту с использованием трехступенчатого линейного градиента: от 2 к 40% буфера В в течение 75 мин, от 40 к 80% буфера В в течение 4 мин и 80% буфера В в течение 11 мин. Масс-спектрометр использовали в режиме положительной ионизации с капиллярным напряжением 1,5 кВ и температурой источника 275°C. Образцы анализировали с использованием метода CID (collision induced dissociation). Первое сканирование производили при помощи анализатора Orbitrap (разрешающая сила $R = 60000$) с отношением заряда к массе (m/z) 400-1800. Затем, 20 ионов с наиболее интенсивным сигналом отбирались для дальнейших экспериментов. Однозарядные частицы исключались из дальнейших экспериментов. Динамическое исключение уже фрагментированных ионов-предшественников производили в течение 30 сек, после чего процедуру повторяли (ширина полосы исключения ± 10 ppm). Фрагментация происходила в анализаторе линейной ионной ловушки, энергия столкновения составляла 35 эВ. Сырые данные импортировали в

программный пакет Progenesis LC-MS (Nonlinear Dynamics). Для сравнения один образец выбирали как контроль, а затем время удержания всех остальных образцов выравняли с учетом контроля. После выравнивания и нормализации производили статистический анализ методом однофакторного анализа дисперсии (one-way analysis of variance (ANOVA)).

2.2.5.10. SERS-исследование матрикса и клеток *C. acnes* RT5. Анализ матрикса и биомассы биопленок *C. acnes* RT5 производили на базе лаборатории биотехнологии в нефтегазовой промышленности кафедры физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «Российский государственный университет нефти и газа (национальный исследовательский университет) имени И.М. Губкина», в г. Москве. Непосредственная подготовка образцов для анализа осуществлялась к.б.н., н.с. Бочковой Е.А., получение и анализ SERS-спектров осуществлялись к.х.н., м.н.с. Д.С. Копицыным и аспирантом М.В. Горбачевским.

Исследовали интактную биомассу биопленок и клетки *C. acnes* после процедуры отделения матрикса. Биомассу биопленок и клетки после отделения матрикса трижды отмывали ацетоном и высушивали при комнатной температуре. Перед исследованием SERS высушенные образцы трижды промывали 0.9% раствором хлорида натрия: пеллету ресуспендировали и центрифугировали при 3000g в течение 10 мин при комнатной температуре. Образцы наносили на предметное стекло, покрывали суспензией наночастиц и высушивали при комнатной температуре.

Для экспериментов SERS использовали наночастицы золота. Синтез наночастиц золота производили по методике Bastus et al. с изменениями. После синтеза золотых затравок для наночастиц в охлажденную до 15°C пробирку вносили последовательно 40 мкл 25 мМ раствора HAuCl_4 и 40 мкл 60 мМ раствора цитрата натрия. Затем закрытую пробирку 30 мин выдерживали при 90°C на водяной бане, после чего постепенно охлаждали до 15°C. Процедуры повторяли трижды. Затем из пробирки извлекали 2 мл суспензии и добавляли 1,5 мл деионизированной воды. После третьего поколения наночастиц, к двум базовым предшественникам (тетрахлороаурат, цитрат натрия), на каждой стадии в рабочую смесь добавляли 60 мкл 25 мМ раствора гидроксида натрия. Синтез производили до получения наночастиц 12 поколения.

Полученные наночастицы характеризовали при помощи трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Для ТЭМ 5 мкл суспензии наночастиц помещали на сетку для ТЭМ (Ted Pella, Redding, CA, США) и высушивали при комнатной температуре. Изображения ТЭМ получали на микроскопе JEM-2100 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения СЭМ получали на микроскопе JIB-4501 (Jeol, Япония).

SERS-спектры получали на спектрометре BWS415 (BWTEC, Германия). Образцы помещали на XYZ-предметный столик, положение лазера контролировали через USB-микроскоп Микмед-2000R (Микромед, Россия). Для регистрации SERS-сигналов применяли разные субстраты на основе золотых наноматериалов.

Спектры SERS обрабатывались при помощи программного обеспечения GNU/Octave. Кратко: спектры импортировали из файлов данных, генерируемых спектрометром, очищали от шумов флуоресценции методом полиномиального сглаживания. Высокочастотные шумы убирали с использованием разработанных (см. далее) фильтров. Списки пиков экспортировали в Excel для визуализации и интерпретации. Фильтры разрабатывали с использованием функции пакета GNU/Octave “signal” со следующими спецификациями: полоса пропускания 0.1f, полоса затухания 0.15f, допустимое колебание менее 0,5 дБ, ослабление 30 дБ. Использовали фильтр Чебышева II рода, поскольку он имеет самый низкий порядок, что выгоднее для стабильности вычислений. Далее, из спектров образцов вычитали спектр наночастиц после нормализации.

2.2.6. Статистическая обработка данных

Все эксперименты проводили как минимум в трех независимых повторностях. Статистическую обработку данных производили методами как параметрической (метод главных компонент для анализа спектров SERS матрикса), так и непараметрической статистики в тех случаях, когда варьирование результатов не подчинялось закону нормального распределения. (непараметрический критерий Манна-Уитни, критерий знаков Уилкоксона). За значимые принимали различия при значении $p < 0.05$ (на рисунках отмечены звездочкой). Расчеты и построение графиков производили в программном пакете Microsoft Office Excel 2007 и OriginLab 8.6.

ГЛАВА 3. Результаты

3.1. Исследование влияния азитромицина на рост биопленок *P. chlororaphis*

Начальным этапом работы было изучение влияния антибиотика азитромицина на формирование биопленок *P. chlororaphis* 449 – штаммом, близким по свойствам к штаммам-комменсалам кожи человека, таким как *Pseudomonas fluorescens* (Mishra et al., 2009, Garrido-Sanz et al., 2016, Gallique et al., 2017).

3.1.1. Исследование влияния азитромицина на модифицированные штаммы *P. chlororaphis*

3.1.1.1. *P. chlororaphis* 449 Δ rpoS. У данного штамма инактивирован ген *rpoS*, кодирующий сигма S субъединицу РНКполимеразы, что приводит к подавлению синтеза феназиновых антибиотиков, но существенно не влияет на синтез четырех типов N-АГЛ (N-бутаноил-L-

гомосеринлактона, N-гексаноил-L-гомосеринлактона, N-(3-оксо-гексаноил)-L-гомосеринлактона, минорного АГЛ) и на способность бактерий перемещаться по поверхности плотной среды (swarming) (Липасова с соавт., 2009). На рис. 3 отображены эффекты азитромицина на рост биопленок и планктонных культур мутанта *P. chlororaphis* 449 Δ *rpoS* в сравнении с диким штаммом.

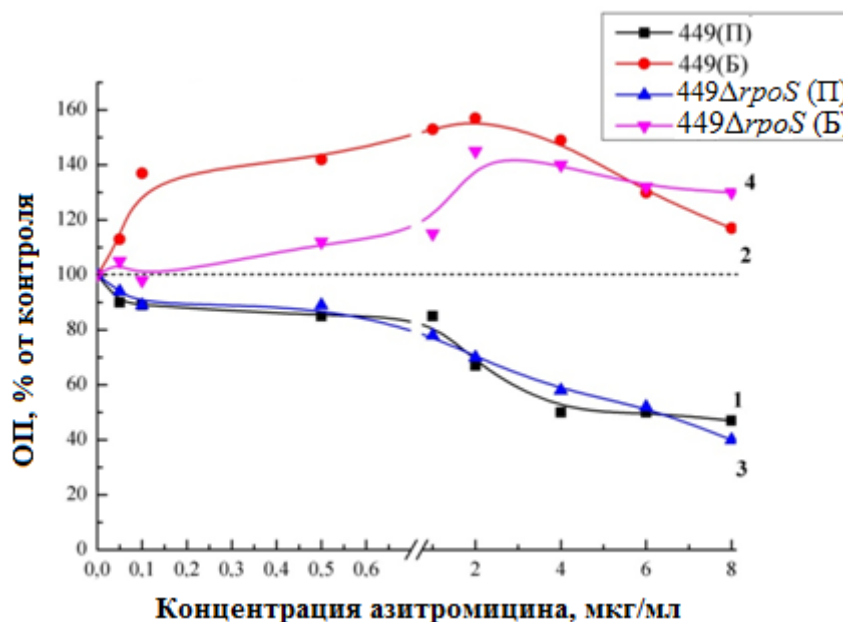


Рис. 3. Зависимость роста планктонной культуры (1, 3) и биопленки (2, 4) *P. chlororaphis* 449 (1, 2) и *P. chlororaphis* 449 Δ *rpoS* (3, 4) от концентрации азитромицина. Окрашивание биопленки КФ. Пунктирная прямая - уровень контроля без добавления антибиотика.

Рост планктонных культур дикого и мутантного штаммов практически одинаково чувствителен к действию азитромицина. Низкие концентрации азитромицина (0,05 – 1 мкг/мл), существенно не влияющие на рост планктонной культуры, заметно (в 1,4-1,6 раза) стимулируют рост биопленок обоих штаммов. Таким образом, мутация гена *rpoS* скольконибудь существенно не влияет качественно на характер действия азитромицина.

3.1.1.2. *P. chlororaphis* 449 Δ *gacS*. У данного штамма нарушена двухкомпонентная глобальная система GacA-GacS, которая регулирует синтез всех типов АГЛ, феназиновых антибиотиков, экзопротеаз, полигалактуроназы, пектинметилэстеразы и антагонистическую активность в отношении фитопатогенных грибов. Мутация в этом случае локализована в гене *gacS*, кодирующем сенсорную киназу GacS, из-за чего синтез АГЛ осуществляется лишь частично и с низкой скоростью по сравнению со штаммом дикого типа (Веселова, 2008). Эффекты азитромицина на рост штамма отображен на рис. 4.

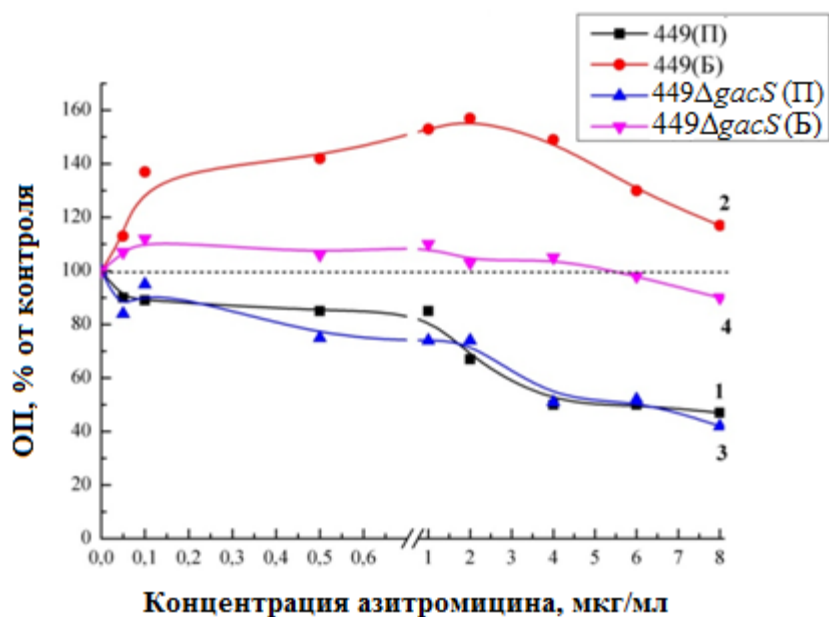


Рис. 4. Зависимость роста планктонной культуры (1, 3) и биопленки (2, 4) *P. chlororaphis* 449 (1, 2) и *P. chlororaphis* 449ΔgacS (3, 4) от концентрации азитромицина. Окрашивание биопленки КФ. Пунктирная прямая - уровень контроля без добавления антибиотика

Как следует из наших данных, представленных на рис. 3, планктонные культуры этих штаммов не различаются по чувствительности к азитромицину. Тенденция к стимуляции формирования биопленок низкими концентрациями азитромицина у модифицированного штамма хотя и сохраняется, но выражена она значительно слабее, чем у штамма дикого типа. Очевидно набор (или уровень) АГЛ (а также, возможно, некоторых других компонентов, зависящих от системы GacA-GacS) является необходимым фактором для проявления эффекта стимуляции.

3.1.1.3. Штаммы *P. chlororaphis* 449Δphz. Оба штамма получены с помощью транспозонного мутагенеза (с использованием mini-Tn5Km), в результате чего инактивированы гены фенозинового оперона: *phzB* (*P. chlororaphis* 449ΔphzB) и *phzA* (*P. chlororaphis* 449ΔphzA). В связи с отсутствием синтеза фенозинов колонии, образуемые данными штаммами, не имеют оранжевой окраски, характерной для дикого типа. Однако синтез всех АГЛ у них сохраняется (Веселова, 2008).

На рисунках 4 и 5 представлены результаты действия азитромицина на рост планктонных культур и биопленок *P. chlororaphis* 449ΔphzB (рис. 5) и *P. chlororaphis* 449ΔphzA (рис. 6).

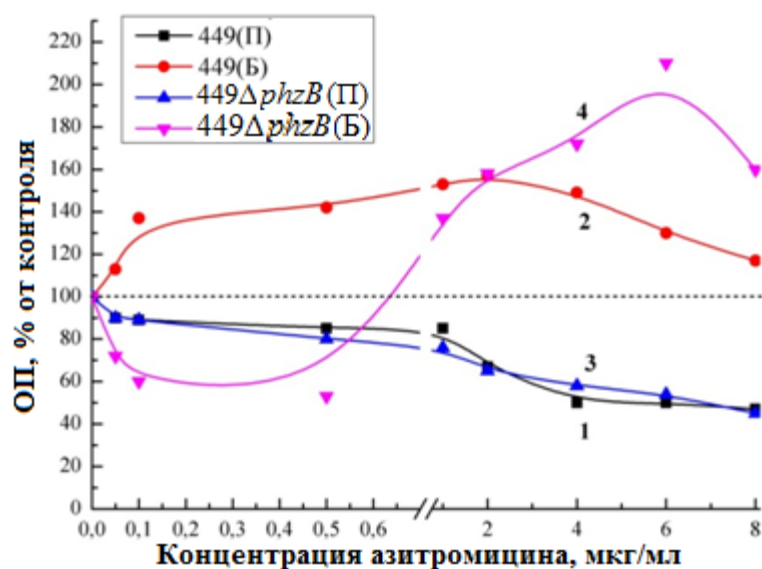


Рис. 5. Зависимость роста планктонной культуры (1, 3) и биопленки (2, 4) *P. chlororaphis* 449 (1, 2) и *P. chlororaphis* 449Δ*phzB* (3, 4) от концентрации азитромицина. Окрашивание биопленки КФ. Пунктирная прямая - уровень контроля без добавления антибиотика

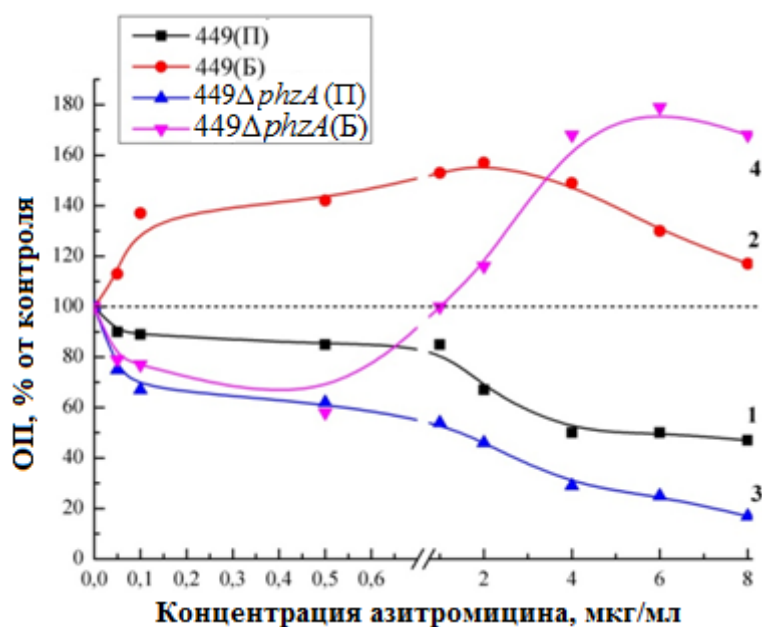


Рис. 6. Зависимость роста планктонной культуры (1, 3) и биопленки (2, 4) *P. chlororaphis* 449 (1, 2) и *P. chlororaphis* 449Δ*phzA* (3, 4) от концентрации азитромицина. Окрашивание биопленки КФ. Пунктирная прямая - уровень контроля без добавления антибиотика

Чувствительность к азитромицину планктонных культур обоих модифицированных штаммов близка к чувствительности планктонной культуры штамма дикого типа (у *P. chlororaphis* 449Δ*phzA* чувствительность несколько выше). Эффект стимуляции роста биопленок субингибиторными концентрациями антибиотика у обоих мутантов сохраняется, но проявляется при более высоких концентрациях (1-8 мкг/мл), а в области низких концентраций (0.05-1 мкг/мл) наблюдается заметное ингибирование этого процесса.

3.1.1.4. Штаммы *P. chlororaphis* 449pME6000 и *P. chlororaphis* 449pME6863. Штамм 449pME6863 содержит плазмиду pME6863, включающую клонированный ген N-ацилгомосеринлактазы AiiA, вызывающей деградацию всех типов АГЛ, продуцируемых этим штаммом, что приводит к резкому снижению синтеза феназинов и снижает способность клеток к свормингу. Для сравнения использовали мутант 449pME6000, несущий векторную плазмиду pME6000, не влияющую на синтез АГЛ и на перемещение клеток бактерий по поверхности плотной среды (Липасова с соавт., 2009).

На рисунках 7 и 8 представлены данные по влиянию азитромицина на рост планктонных культур и биопленок штаммов *P. chlororaphis* 449pME6000 и *P. chlororaphis* 449pME6863 соответственно.

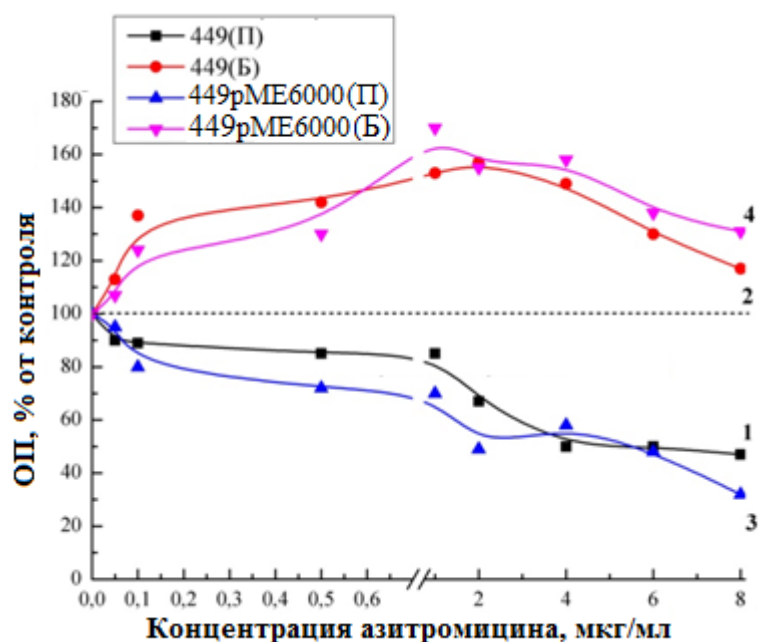


Рис. 7. Зависимость роста планктонной культуры (1, 3) и биопленки (2, 4) *P. chlororaphis* 449 (1, 2) и *P. chlororaphis* 449pME6000 (3, 4) от концентрации азитромицина. Окрашивание биопленки КФ.

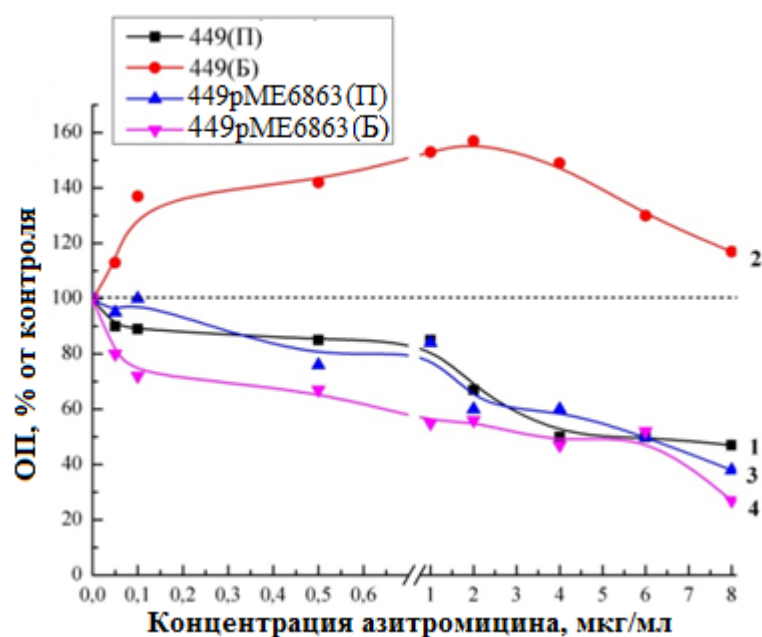


Рис. 8. Зависимость роста планктонной культуры (1, 3) и биопленки (2, 4) *P. chlororaphis* 449 (1, 2) и *P. chlororaphis* 449pME6863 (3, 4) от концентрации азитромицина. Окрашивание биопленки КФ. Пунктирная прямая - уровень контроля без добавления антибиотика

Показано, что введение плазмиды pME6000, не затрагивающей биосинтез АГЛ, существенно не влияет ни на чувствительность планктонной культуры мутанта, ни на стимулирующий эффект азитромицина.

У штамма, содержащего плазмиду pME6863, вызывающую деградацию АГЛ, полностью утрачивается эффект стимуляции формирования биопленки в присутствии низких концентраций азитромицина, а рост биопленки становится даже более чувствительным к действию этого антибиотика, чем рост планктонной культуры (рис. 8). Таким образом, можно сделать вывод (с учетом данных, полученных для штамма *P. chlororaphis* 449Δ*gacS* (рис. 4), что способность к синтезу АГЛ связана прямой корреляцией со стимулирующим действием низких концентраций азитромицина на формирование биопленок.

Как уже отмечалось в обзоре литературы, существуют убедительные данные о том, что азитромицин и другие макролидные антибиотики в субингибиторных концентрациях стимулируют синтез полисахаридов матрикса биопленок у некоторых бактерий (Wang et al., 2010). С другой стороны, работами нашей лаборатории показано, что полисахаридный матрикс играет важную роль в устойчивости биопленок не только в биоцидах, но и к стрессовым физико-химическим факторам среды: тепловому, кислотному и осмотическому шоку (Стрелкова с соавт., 2013). Если стимуляция азитромицином формирования биопленок у *P. chlororaphis* 449 связана с повышенным синтезом полисахаридного матрикса, то такие биопленки должны быть более устойчивым к шоковым воздействиям. С этой целью мы провели

исследование чувствительности биопленок *P. chlororaphis* 449 к тепловому шоку в присутствии стимулирующих концентраций азитромицина.

3.1.2. Влияние теплового шока на рост биопленок *P. chlororaphis* 449 в присутствии азитромицина

Проведенные эксперименты, представленные на рисунках 9 и 10, показали, что чувствительность планктонной культуры к тепловому шоку в присутствии азитромицина несколько повышается (рисунок 9).

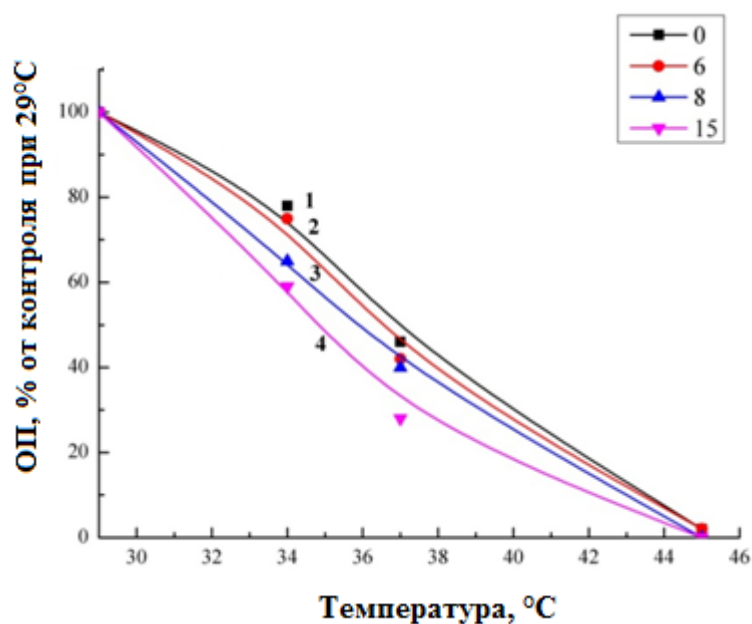


Рис. 9. Зависимость роста планктонной культуры *P. chlororaphis* 449 от температуры в присутствии азитромицина. Без антибиотика (1); в присутствии азитромицина: 6 мкг/мл (2); 8 мкг/мл (3); 15 мкг/мл (4).

Напротив, в присутствии азитромицина в концентрациях, стимулирующих рост биопленок (6-8 мкг/мл), чувствительность последних к тепловому шоку понижается (рис. 10). В этих опытах окрашивание биопленок производили специфичным к полисахаридам красителем ДММС.

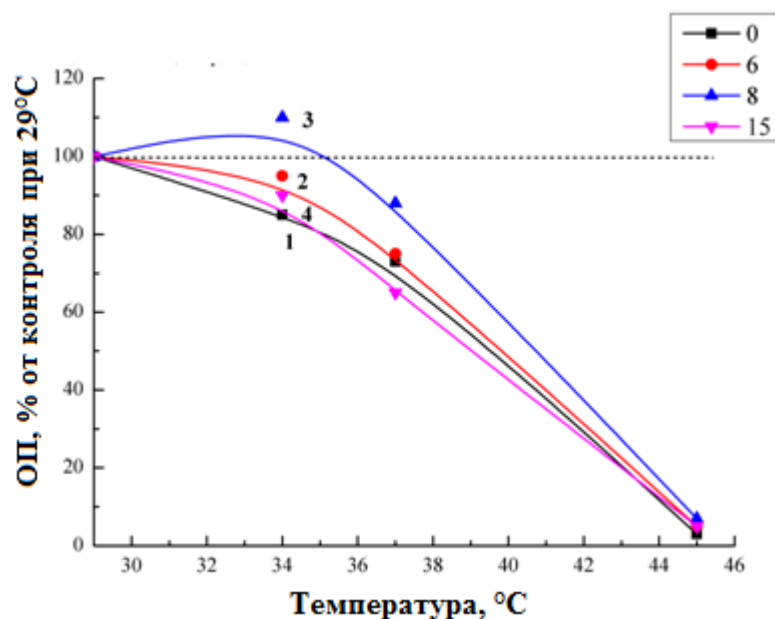


Рис. 10. Зависимость роста биопленок *P. chlororaphis* 449 от температуры в присутствии азитромицина. Без антибиотика (1); в присутствии азитромицина: 6 мкг/мл (2); 8 мкг/мл (3); 15 мкг/мл (4). Окрашивание биопленок ДММС.

Этот факт согласуется с высказанным нами предположением, что стимуляция роста биопленок в присутствии азитромицина сопровождается повышенным синтезом специфически окрашиваемого ДММС полисахаридного матрикса, который, согласно данным литературы, играет важную роль в устойчивости биопленок к биоцидам и стрессовым физико-химическим факторам (Стрелкова с соавт. 2013). Дополнительные свидетельства в пользу этого предположения будут приведены в четвертом разделе экспериментальной части работы, посвященном микроскопическим исследованиям.

3.1.3. Действие сверхнизких концентраций азитромицина на формирование биопленок у представителей рода *Pseudomonas*

При изучении действия на *P. chlororaphis* 449 широкого диапазона концентраций азитромицина была обнаружена необычная закономерность: в области низких концентраций антибиотика, не влияющих на рост планктонной культуры (0.001 – 0.01 мкг/мл) наблюдается заметное ингибирование роста биопленок (см. рис. 11).

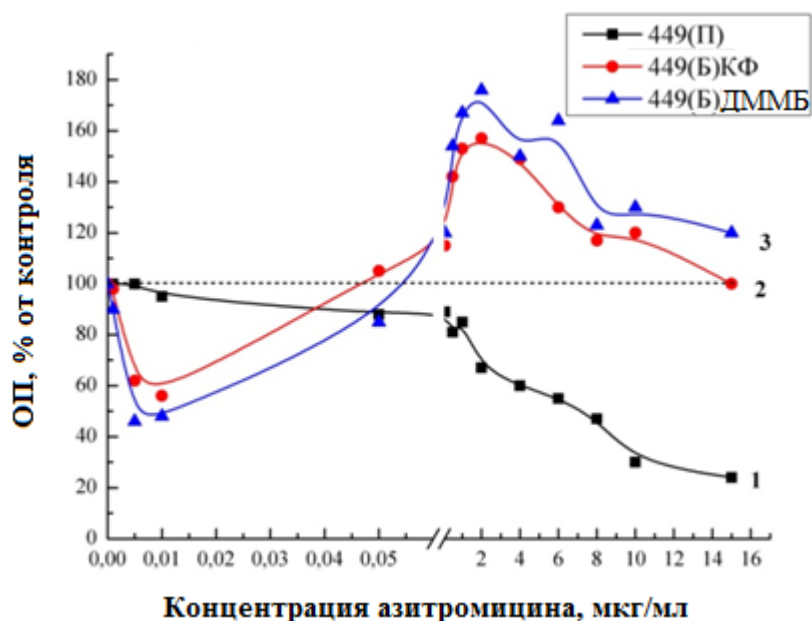


Рис. 11. Действие низких концентраций азитромицина на рост планктонной культуры (1) и биопленки (2, 3) *P. chlororaphis* 449. Биопленка окрашена КФ (2) или ДММС (3). Пунктирная прямая - уровень контроля без добавления антибиотика

Проверка этой закономерности на другом штамме *P. chlororaphis* 66 подтвердила ее воспроизводимость (рисунок 12).

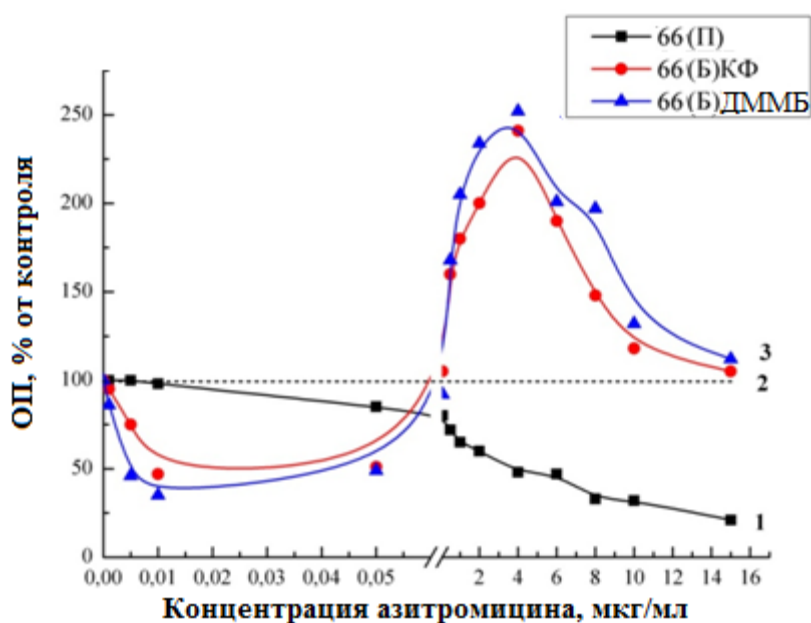


Рис. 12. Действие низких концентраций азитромицина на рост планктонной культуры (1) и биопленки (2, 3) *P. chlororaphis* 66. Биопленка окрашена КФ (2) или ДММС (3). Пунктирная прямая - уровень контроля без добавления антибиотика

Сходная ситуация описана в работе, в которой детально изучено ингибиторное действие антибиотиков-макролидов (эритромицина и азитромицина) на стационарные биопленки

Porphyromonas gingivalis, характерные для зубных бляшек. Ингибиторное действие на биопленки проявлялось при концентрациях более низких, чем ингибиторные для планктонных культур и синтеза белка. Изучение биопленок, подвергнутых воздействию азитромицина, показало нарушение у некоторых из штаммов синтеза матрикса при сохранении количества живых клеток (Maezono et al., 2011).

Неясно, каким образом один и тот же антибиотик в отношении одной и той же бактериальной биопленки при низких концентрациях проявляет себя как ингибитор, а при высоких – как стимулятор. Как правило, для токсичных веществ характерна обратная закономерность: проявлять стимулирующее действие при низких концентрациях, а ингибиторное – при высоких. Однако для объяснения данного явления можно предложить гипотетическую модель основанную на том, что синтез (и сборка) компонентов матрикса биопленок осуществляется при одновременном функционировании двух метаболических путей, один из которых чувствителен к ингибиторному действию сверхнизких концентраций азитромицина, а другой – нечувствителен к ингибиторному действию этого антибиотика, но стимулируется более высокими его концентрациями. Тогда, учитывая удельный вклад этих путей в общий процесс формирования матрикса, при сверхнизких концентрациях антибиотика может преобладать ингибиторное действие антибиотика, а при более высоких его концентрациях, когда первый процесс подавлен – стимулирующее. Эти представления согласуются с взаимной зависимостью синтеза полисахаридов матрикса биопленок *P. aeruginosa* (Ma et al., 2012). Недавно предложена математическая модель, допускающая не только непрерывный, но и дискретный тип формирования матрикса биопленок (Mattei et al., 2018). Безусловно, данная гипотеза требует дополнительных биохимических экспериментальных доказательств.

3.1.5. Применение фазово-контрастной микроскопии (ФКМ) и эпифлуоресцентной микроскопии (ЭФМ) для анализа действия азитромицина на биопленки

3.1.5.1. ФКМ. Согласно литературным данным, наиболее вероятной мишенью, как при подавлении азитромицином роста биопленок, так и при его стимулировании является синтез полисахаридов полимерного матрикса. Одним из способов, позволяющих проследить за накоплением полисахаридных компонентов матрикса биопленок, является их окрашивание специфичным для полисахаридов красителем – ДММС. В ранее опубликованной работе нашей лаборатории показано, что подавление (под действием азитромицина, а также в результате мутации) синтеза матриксного полисахарида у некоторых видов грамотрицательных бактерий коррелирует со снижением степени окрашивания биопленки ДММС (Стрелкова с соавт. 2013). Результаты, представленные ниже, также позволяют сделать вывод, что при подавлении роста

био пленок или при стимуляции их роста азитромицином главной мишенью являются полисахаридные компоненты матрикса, поскольку изменения при окрашивании био пленок ДММС проявляются сильнее, чем при окрашивании неспецифическим красителем КФ. Необходимо было проверить, насколько эти выводы коррелируют с микроскопической картиной окрашивания био пленок ДММС при воздействии разных концентраций азитромицина.

На рис. 13 представлены результаты ФКМ био пленок *P. chlororaphis* 449, окрашенных ДММС после преинкубации в течение 6 ч (для формирования матрикса) в присутствии азитромицина: 0.03 мкг/мл (ингибиторная концентрация) и 8 мкг/мл (стимулирующая концентрация). В контрольный образец азитромицин не добавляли. Контрольные опыты показали, что азитромицин не влияет на процесс окрашивания, если добавлен непосредственно перед окрашиванием био пленок.

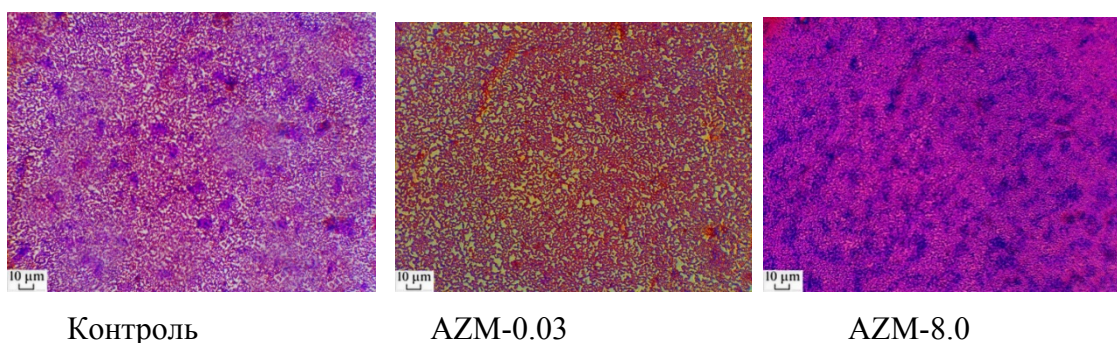


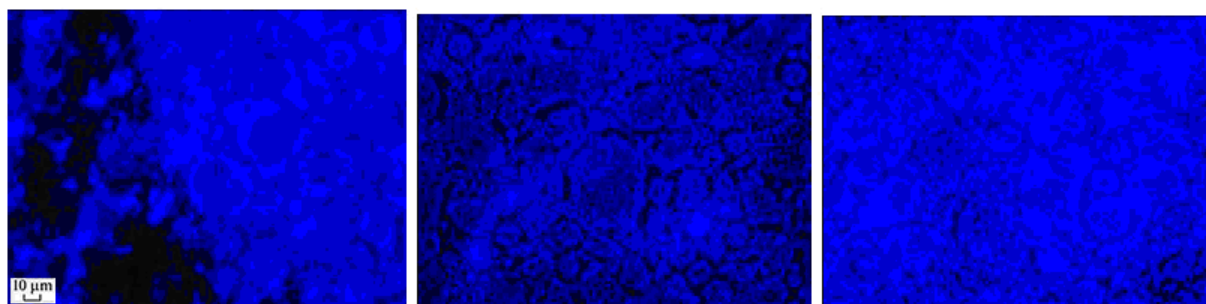
Рис. 13. ФКМ препаратов био пленок *P. chlororaphis* 449, окрашенных ДММС в присутствии разных концентраций азитромицина (контроль без антибиотика, 0.03 мкг/мл; 8.0 мкг/мл)

В присутствии ингибирующей концентрации азитромицина (0.03 мкг/мл) синтез полисахаридных компонентов матрикса (окрашиваемых ДММС) существенно снижается, и значительная часть клеток «оголяется». Напротив, в присутствии стимулирующей концентрации азитромицина (8 мкг/мл) синтез полисахаридных компонентов матрикса значительно усиливается. Эти результаты свидетельствуют в пользу высказанного нами предположения об избирательном действии азитромицина на полисахаридные компоненты матрикса.

3.1.5.2. ЭФМ. Для анализа также выбрано время инкубации 6 ч, когда уже сформирован полноценный матрикс. Поскольку DAPI не только окрашивает ДНК, но и обладает собственным свечением в ультрафиолете, с его помощью можно оценивать общее содержание матрикса в био пленке. DAPI накапливается в клетках и матриксе и визуализирует его за счет

собственной флуоресценции красителя. Сравнение окрашивания DAPI биопленок в контроле, не содержащем азитромицина, с биопленками, сформированными в присутствии ингибиторной (0.03 мкг/мл) и стимулирующей (8 мкг/мл) концентрациями азитромицина показывает, что общее количество матрикса в первом случае снижается, а во втором увеличивается (рис. 14).

Окрашивание DAPI



Контроль

AZM-0.03

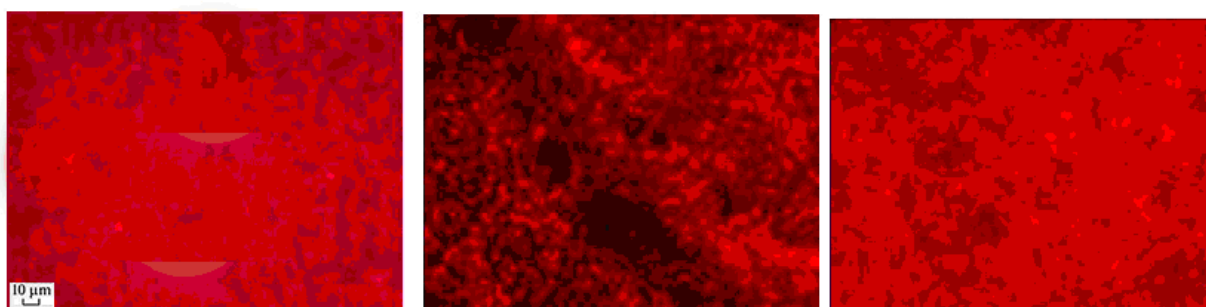
AZM-8.0

Рис. 14. ЭФМ биопленок *P. chlororaphis* 449, окрашенных DAPI в присутствии разных концентраций азитромицина.

Поскольку азитромицин в низкой концентрации не влияет на рост клеток микроорганизма и синтез белка и ДНК, можно полагать, что снижение содержания матрикса, скорее всего, обусловлено подавлением синтеза полисахаридов.

Краситель SYPRO RUBY окрашивает белки, как связанные с клетками, так и находящиеся в матриксе в свободном состоянии. Результаты окрашивания биопленок SYPRO Ruby представлены на рис. 15.

Окрашивание RUBY



Контроль

AZM-0.03

AZM-8.0

Рис. 15. ЭФМ биопленок *P. chlororaphis* 449, окрашенных RUBY в присутствии разных концентраций азитромицина.

Сравнение тех же вариантов биопленок, окрашенных этим красителем, показывает, что в присутствии ингибиторной концентрации азитромицина биопленка становится более рыхлой, содержание белка в ней снижается. В соответствии с высказанными ранее соображениями это снижение, скорее всего, обусловлено нарушением структуры полисахаридного каркаса матрикса, в результате чего часть белка теряется из матрикса в окружающую среду. Напротив, при стимулирующей концентрации антибиотика матрикс становится плотнее и лучше удерживает внеклеточные белки.

3.2. Исследование влияния никлозамида на рост биопленок штаммов микробиоты кожи

3.2.1. Определение видовой принадлежности изолятов С01 и Н01

По результатам секвенирования 16S рРНК изолят С01 был определен как *M. luteus* С01 (99% сходства), а изолят Н01 – как *K. schroeteri* Н01.

3.2.2. Определение эффекта никлозамида на рост микроорганизмов кожи

По результатам исследований биопленок на фильтрах штаммы-комменсалы человека проявляли сходную чувствительность к никлозамиду, т.е. имеют близкие ИД₅₀ (см. табл. 6 и рис. 16). У двух из трех кожных микроорганизмов (*S. aureus* MFP03 и *M. luteus* С01) наблюдалась незначительная стимуляция роста биопленок малыми концентрациями никлозамида. Это соответствует имеющимся в литературе данным о том, что в сверхнизких концентрациях биоциды могут выступать в роли стимуляторов роста. (Стрелкова и соавт., 2012, Ганнесен с соавт., 2015).

Таблица 6. ИД₅₀ никлозамида, экспериментально установленные для исследованных микроорганизмов кожи человека.

Штамм	ИД₅₀, мкг/мл
<i>S. aureus</i> MFP03	0.077
С01	0.067
Н01	0.054

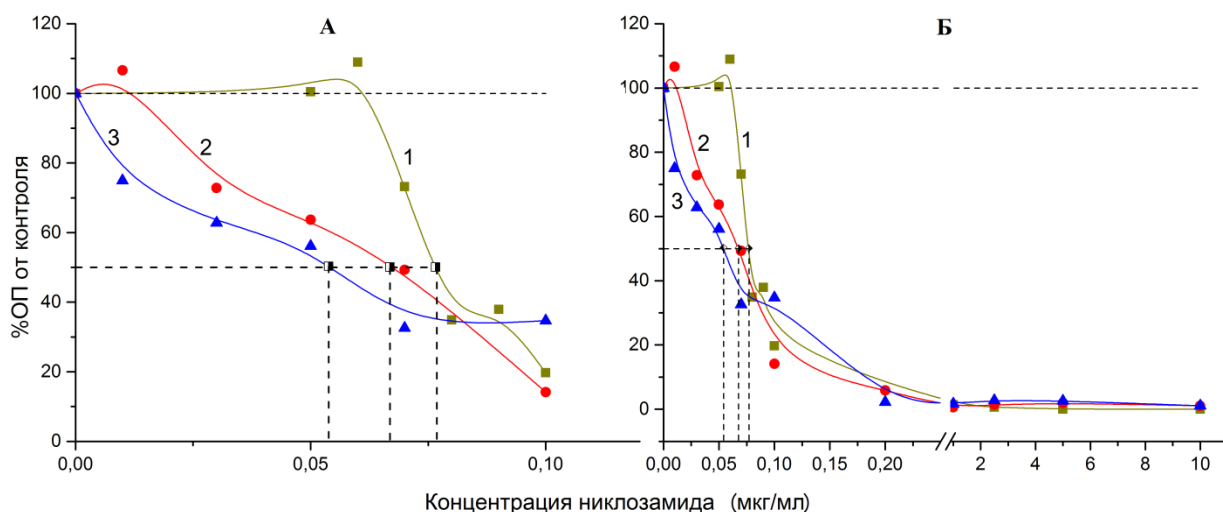


Рис. 16. Влияние никлозамида на рост биопленок микроорганизмов кожной микробиоты. Выращивание на фильтрах из стекловолокна (окрашивание МТТ). А – диапазон малых концентраций; Б – полный диапазон концентраций. 1 – *S. aureus* MFP03; 2 – *M. luteus* C01; 3 – *K. schroeterii* H01. ИД₅₀ соответствуют пересечениям перпендикулярных линий с осью абсцисс. Пунктирная линия – контроль без ингибитора.

В целом уже 0.1 мкг/мл никлозамида в среде вызывало сильное (до 86% у *M. luteus* C01) снижение количества метаболически активных клеток в биопленке (рис. 16-Б). При этом наличие ДМСО не влияло на метаболическую активность клеток. Концентрация 1 мкг/мл никлозамида снижала количество метаболически активных клеток практически до нуля (0.5-1%) у *S. aureus* MFP03, *M. luteus* C01 и *K. schroeterii* H01. Полученные результаты говорят об эффективности использования никлозамида при борьбе с биопленками, а также позволяют рассматривать никлозамид как перспективный компонент комплексных антибиопленочных препаратов.

На примере *S. aureus* 209P показана возможность использования никлозамида как возможного компонента бинарных антибиопленочных препаратов совместно с антибиотиком азитромицином (рис. 17). Концентрации азитромицина и никлозамида подбирали с тем расчетом, чтобы возможно было зарегистрировать эффект совместного воздействия: каждое из веществ в отдельности подавляло формирование биопленок на 30-60%.

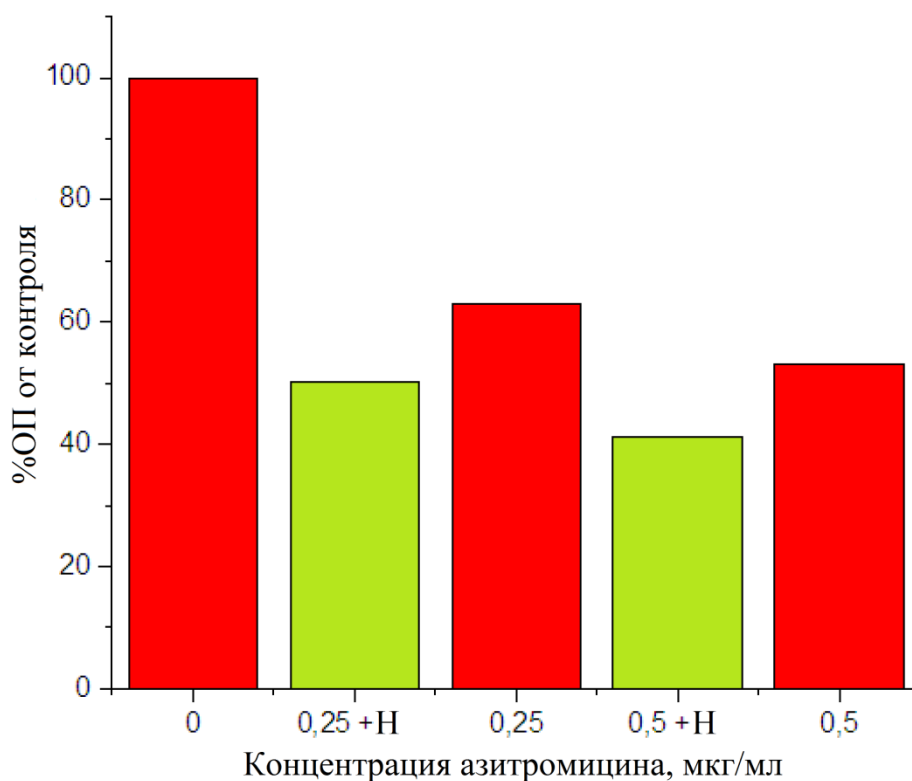


Рис. 17. Действие азитромицина, а также азитромицина в сочетании с 0,025 мкг/мл никлозамида на формирование биопленок *S. aureus* 209P на фильтрах из стекловолокна (окрашивание МТТ). +Н – образцы с добавлением 0.025 мкг/мл никлозамида. 0 – контроль без ингибиторов.

При сочетании никлозамида в концентрации 0.025 мкг/мл с азитромицином наблюдался слабый аддитивный эффект.

3.3. Исследование влияния компонентов косметики на рост моновидовых биопленок штаммов микробиоты кожи

Продолжением поиска соединений, влияющих на формирование биопленок кожи, была работа по исследованию антибиопленочных свойств нетоксичных компонентов косметики – богатого рамнозой олигосахарида тefлозы (PS291®) и термальной воды Уриаж с целью определения возможности создания комплексных препаратов на их основе.

3.3.1. Исследование динамики роста моновидовых культур в присутствии компонентов косметики

Оба штамма *S. acnes* обладали сходной динамикой роста в присутствии ТВУ и PS291®. В случае штамма RT4 добавление PS291® выражалось в легкой задержке роста (удлинение лаг-фазы), тогда как наклон кривой (время удвоения) и ОП (биомасса) в стационарной фазе не изменялись (См. приложение, рис. 1П-А). ТВУ 50%, напротив, значительно сокращала лаг-фазу: половины ОП_{макс} *S. acnes* RT4 в присутствии ТВУ достигал уже через 30 ч инкубации,

тогда как в контроле для этого требовалось 45 ч. У штамма *C. acnes* RT5 максимальная ОП в присутствии ТВУ, напротив, снижалась (вероятно, уменьшалось количество биомассы – см. рис. 1П-Б). В присутствии PS291® время генерации штамма RT5 увеличивалось с 5.0 до 5.3 ч, тогда как конечная ОП и биомасса были идентичными с таковыми в контроле. Так же, как и у штамма RT4, ТВУ в концентрации 50% сокращала лаг-фазу у штамма RT5: с 44 ч в контроле до 29 ч в образцах с ТВУ.

Кинетика роста *S. aureus* MFP03 в присутствии PS291® мало отличалась от таковой в контроле (рис. 1П-В), тогда как ТВУ при 50% значимо снижала максимальную ОП в среднем на 23%, начиная с поздней логарифмической фазы, тогда как время удвоения оставалось неизменным во всех случаях. 50% ФР оказывал идентичный ТВУ эффект, выразившийся в снижении количества биомассы в стационарной фазе (конечная ОП) без значительных изменений времени удвоения. Поведение *S. aureus* в присутствии сочетания ТВУ 50% и PS291® 4% было идентично таковому в образце с ТВУ. Точно так же сочетание ФР 50% и PS291® 4% приводило к сокращению количества биомассы в стационарной фазе, аналогичному таковому в присутствии ФР 50%.

Таким образом, мы можем предполагать, что сокращение количества биомассы, выражающееся в снижении ОП в стационарной фазе роста культур, обосновано разбавлением сред и сокращением количества питательных веществ, необходимых бактериям. Сокращение лаг-фазы у *C. acnes*, вероятно, может объясняться влиянием минерального состава термальной воды, поскольку разбавление среды ФР в той же концентрации не приводит к подобному изменению кинетики роста.

3.3.2. Выращивание моновидовых биопленок в присутствии компонентов косметики на иммунологических планшетах.

Эксперименты по классической методике с КФ проводили в качестве предварительного определения количественных характеристик биопленок *S. aureus* и *C. acnes*. Оценивали общее количество биомассы биопленок и его изменения при добавлении в среду термальной воды или PS291®. Результаты опытов представлены в виде процентной доли опытного образца от контроля (в отсутствие эффектора) на рис. 18.

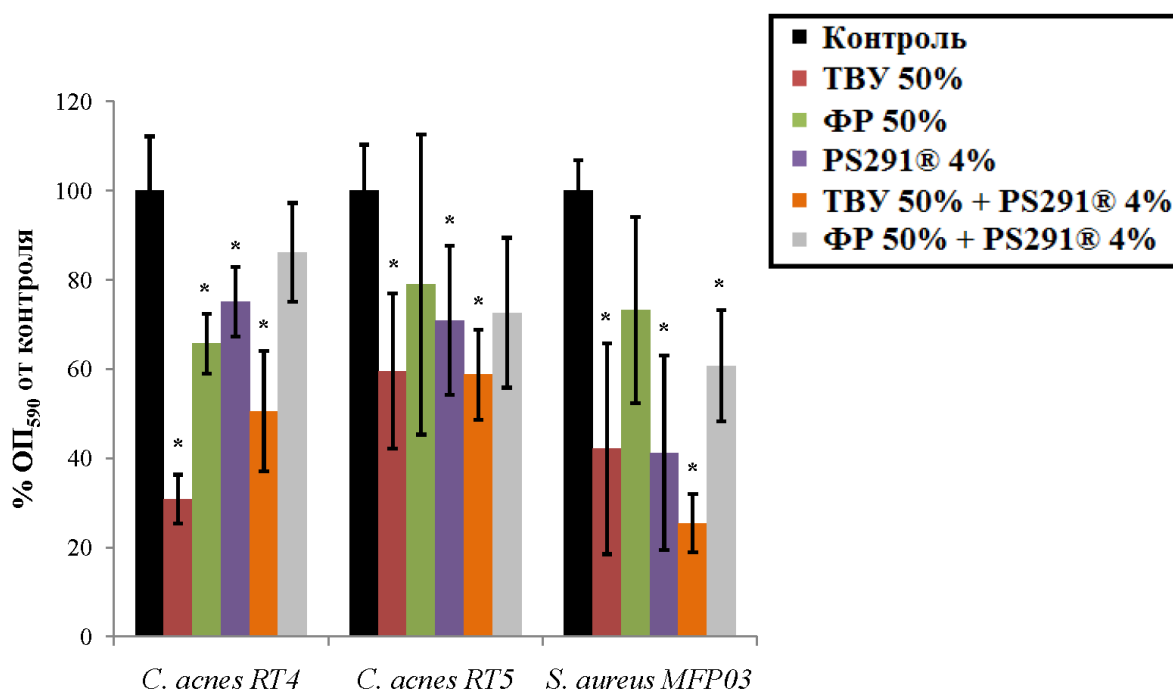


Рис. 18. Влияние компонентов косметики на рост биопленок *C. acnes* и *S. aureus* MFP03. * - различие достоверно при $p=0.05$.

Как видно из рисунка 18, TBU 50% и PS291 4% оказывали значительный эффект на рост биопленок *C. acnes* RT4 и RT5: количество totalной биомассы снижалось до 30.8 ± 17.4 и 59.5 ± 23.6 % от контроля при добавлении 50% TBU соответственно, и до 70.9 ± 16.7 и 41.2 ± 21.8 % от контроля с добавлением 4% PS291 соответственно. Добавление 50% ФР также ухудшало формирование биопленок *C. acnes* RT4 и RT5 до 78.9 ± 33.6 и 65.7 ± 6.7 от контроля. Как и в экспериментах с динамикой роста культур, сочетание двух компонентов не оказывало аддитивного эффекта на формирование биопленок всех трех штаммов: в присутствии 50% TBU и 4% PS291® 4% рост биопленок *C. acnes* RT4, RT5 и *S. aureus* ухудшался до 50.5 ± 13.5 , 58.7 ± 10.3 и 25.4 ± 6.5 % от контроля соответственно. Однако, ингибиторный эффект от сочетания TBU 50% и PS291® 4% был сильнее, чем от сочетания PS291® с ФР 50%. В этом случае рост биопленок *C. acnes* RT4, RT5 and *S. aureus* ухудшался только до $86.1 \pm 11.1\%$, $72.6 \pm 16.8\%$ и $60.7 \pm 12.5\%$ от контроля соответственно.

Таким образом, можно утверждать, что эффект термальной воды связан не только с разбавлением среды (как в случае с ФР), но и с воздействием ее минерального состава.

3.3.3. КЛСМ моновидовых биопленок *C. acnes* и *S. aureus* MFP03, выращенных в присутствии компонентов косметики.

3.3.3.1. Определение плотности и толщины биопленок. Структуру, толщину и плотность биомассы биопленок *C. acnes* и *S. aureus* MFP03 в присутствии ТВУ и PS291® исследовали с помощью анализа трехмерных изображений, полученных в ходе КЛСМ. Сперва производили контроль начальной адгезии клеток (см. приложение, рисунки 2П-А, 3П-А, 4П-А). У *C. acnes* RT4 зрелая биопленка в контроле обладала средней толщиной 35.3 ± 6.2 мкм и плотностью биомассы 30.3 ± 6.4 мкм³/мкм² (рис. 2П-Б). В присутствии 50% ФР средняя толщина биопленки и плотность ее биомассы значительно не изменялись (толщина 32.6 ± 5.1 мкм и плотность биомассы 28.7 ± 4.7 мкм³/мкм² – рис. 2П-В). Добавление же в среду 50% ТВУ оказывало больший эффект: толщина и плотность биомассы биопленок *C. acnes* RT4 снижались до 24.9 ± 4.4 мкм (-29.4%) и 21.7 ± 4.1 мкм³/мкм² (-28.3%) соответственно (рис. 2П-Г). PS291® также ингибировал рост биопленок (-31.4% в толщине и -28.3% в плотности биомассы соответственно – рис. 2П-Д). В отличие от опытов с окрашиванием биопленок КФ, в опытах с КЛСМ сочетание ТВУ и PS291 обладало слабым аддитивным эффектом и сильнее ингибировало рост биопленок по сравнению с компонентами косметики по отдельности. Средняя толщина биопленок снижалась на 40.8% (до 20.9 ± 4.9 мкм) и плотность – на 35.6% (до 19.5 ± 4.8 мкм³/мкм²). Сочетание же PS291® и ФР в тех же пропорциях не обладало столь выраженным эффектом: толщина биопленок снижалась только на 11% (до 31.4 ± 6.9 мкм), а плотность биомассы – на 6% (до 28.5 ± 6.4 мкм³/мкм²), что меньше, чем у PS291® 4%. При этом, во всех случаях серьезного изменения пространственной организации биопленок не обнаруживалось за исключением общего утончения и сглаживания рельефа.

Эффект исследуемых компонентов на рост биопленок штамма *C. acnes* RT5 (по отдельности или в сочетании) был сходным с таковым для штамма RT4. В контроле толщина и плотность биомассы составляли 31.6 ± 4.7 мкм и 27.4 ± 4.1 мкм³/мкм² соответственно (рис. 3П-Б). ФР также не оказывал значительного воздействия на толщину и плотность биомассы биопленок, наблюдалось даже незначительное стимулирование (4.4% и 4.7% соответственно, рис. 2П-В). Ингибиторный эффект ТВУ и PS291® на формирование биопленок был слабее, чем в случае штамма RT5: средняя толщина снижалась лишь на 14.2% (до 27.1 ± 5.2 мкм) в присутствии ТВУ 50% (рис. 2П-Г) и лишь на 5.3% (до 29.9 ± 6.7 мкм) в присутствии PS291® 4% (рис. 3П-Д). Плотность биомассы снижалась на 9.9% (до 24.7 ± 4.7 мкм³/мкм²) в присутствии 50% ТВУ и лишь на 1.8% (до 26.9 ± 5.7 мкм³/мкм²) в присутствии PS291®. Сочетание этих двух компонентов также обладало аддитивным эффектом, более выраженным, чем в случае штамма RT5: толщина биопленок снижалась на 24.4% (до 23.9 ± 6.0 мкм), а плотность биомассы – на 23.8% (до 20.9 ± 5.1 мкм³/мкм²). Сочетание же PS291® и 50% ФР не только не ингибировало рост биопленок, но даже незначительно стимулировало его: толщина увеличивалась на 2.5% (до 32.4 ± 4.5 мкм), а плотность биомассы – на 5.5% (до 28.9 ± 4.3

мкм³/мкм²). Как и в предыдущем случае, биопленки несколько утончались, и их поверхность несколько сглаживалась в присутствии ТВУ и PS291®.

У *S. aureus* MFP03 (рис. 4П) биопленка формировалась гораздо быстрее, чем у *C. acnes*. Зрелые 24-часовые биопленки были тоньше таковых у *C. acnes* (средняя толщина 16.7 ± 1.5 мкм, плотность биомассы 17.7 ± 2.7 мкм³/мкм²), но при этом в них присутствовали грибовидные образования (рис. 4П-Б). Как и в случае обоих штаммов *C. acnes*, добавление в среду ФР 50% не изменяло средней толщины и плотности биомассы биопленок *S. aureus* (рис. 4П-В): средняя толщина биопленок увеличивалась на 3.5% (до 17.3 ± 1.8 мкм), а плотность биомассы – на 5,6% (до 18.7 ± 2.1 мкм³/мкм²). ТВУ (рис. 4П-Г) снижала среднюю толщину биопленок на 20.3% (до 13.3 ± 1.0 мкм), а плотность биомассы – на 23,7% (до 13.5 ± 1.6 мкм³/мкм²). PS291® (рис. 4П-Д) снижал среднюю толщину биопленок на 16,1% (до 14.0 ± 1.1 мкм), а плотность биомассы – на 15,2% (до 15.0 ± 1.8 мкм³/мкм²). Сочетание ТВУ и PS291® ингибировало биопленки *S. aureus* несколько слабее, нежели биопленки *C. acnes*: толщина биопленок уменьшалась лишь на 20.9% (до 13.2 ± 0.8 мкм), а средняя биомасса биопленок – на 24.9% (до 13.3 ± 1.0 мкм³/мкм²). При этом сочетание PS291® с ФР 50% полностью нивелировало ингибиторный эффект PS291®. Также, в присутствии исследуемых соединений количество трехмерных образований (грибовидных структур) уменьшалось: биопленка становилась более тонкой и гладкой.

3.3.3.2. Исследование влияния компонентов косметики на образование микроколоний *S. aureus* MFP03. В ходе проведения экспериментов с КЛСМ было обнаружено, что адгезия клеток *S. aureus* MFP03 к стеклянному дну планшета происходит быстро, и через два часа (стадия первичной адгезии) клетки образуют ровный монослой на стекле (рис. 4П-А). В серии наших экспериментов для выяснения потенциального влияния ТВУ и PS291® на адгезию клеток *S. aureus* и формирование микроколоний биопленки выращивали в равновесии с планктонной культурой без стадии предварительной адгезии в течение 24 ч. По истечении срока на дне планшетов формировались микроколонии (см. приложение, рис. 5П). За микроколонии принимали агрегаты клеток размером от 2.7 мкм² и вычисляли их количество.

В контрольных образцах количество микроколоний в поле зрения достигало в среднем 38 (рис. 5П-А). При добавлении в среду 50% ТВУ количество микроколоний на поле зрения уменьшалось до 13, а при добавлении 4% PS291® - до 7. При добавлении 50% ФР число микроколоний в поле зрения в среднем снижалось лишь до 28. Совместное воздействие ТВУ и PS291® не обладало аддитивностью: среднее число микроколоний в поле зрения равнялось 12. Таким образом, можно предполагать механизм действия ТВУ и PS291® как модификацию адгезивных свойств клеток.

3.3.4. Исследование влияния компонентов косметики на метаболическую активность клеток в моновидовых биопленках

Поскольку окраска биопленок с помощью КФ и SYTO9 не позволяет определить уровень метаболической активности клеток в биопленке, мы провели серию экспериментов по окраске МТТ биопленок *C. acnes* RT4 и *S. aureus* MFP03, выращенных в присутствии компонентов косметики (рис. 19). Как показано на рисунке X16, ни одно из исследованных соединений не снижает количество метаболически активных клеток в биопленках обоих штаммов. Напротив, в присутствии PS291® уровень метаболической активности клеток *C. acnes* RT4 в биопленке возрастал до 119%. Сочетание ТВУ и PS291® также не оказывало значительного эффекта на биопленки обоих штаммов.

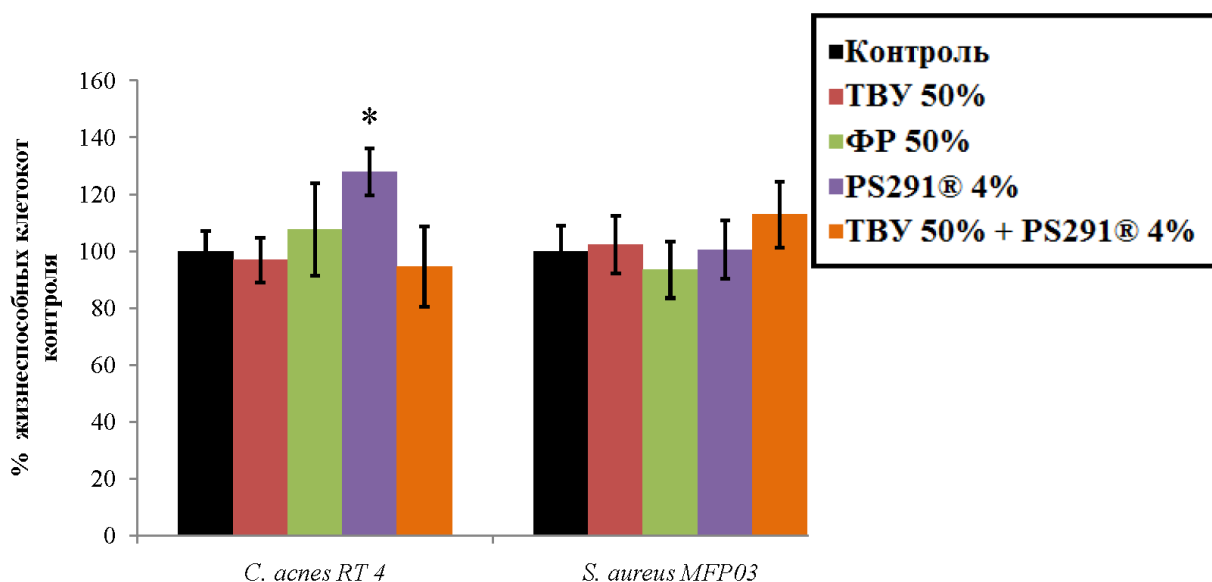


Рис. 19. Влияние ТВУ и PS291® на жизнеспособность клеток в биопленках *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT4. * - различие достоверно при $p=0.05$.

3.3.5. Исследование влияния компонентов косметики на свойства поверхности клеток *C. acnes* и *S. aureus* MFP03

Исходя из результатов предыдущих опытов, можно предположить, что ТВУ и PS291® влияют на стадии первичной адгезии бактерий к поверхности. В свою очередь, способность к адгезии также зависит от свойств клеточной поверхности. Чтобы выявить возможные изменения свойств поверхности клеток вследствие воздействия ТВУ и PS291®, мы провели серию экспериментов по адгезии клеток к растворителям и исследовали изменения заряда поверхности (см. приложение, рис. 6П).

3.3.5.1. Штаммы *C. acnes*. Оба штамма *C. acnes* проявляли высокое сродство ко всем органическим растворителям и гидрофобность клеток (рис. 6П-А, Б), причем их показатели сродства были очень схожими. Так, клетки обоих штаммов в контроле обладали очень высоким сродством к хлороформу - более 90% (RT 4 – 93%, RT5 – 92%). К гексадекану – более 75% (RT4 – 79%, RT5 – 78%), к декану – 60% у обоих штаммов, к этилацетату – 66% (RT4) и 71% (RT5). Добавление в среду TBY, PS291® или их сочетания не оказывало значимого эффекта на сродство клеток *C. acnes* к растворителям – показатели сродства клеток были на том же уровне с незначительными изменениями.

3.3.5.2. *S. aureus* MFP03. *S. aureus* MFP03 также обладал очень высоким сродством к хлороформу (90% в контроле) и средним сродством к декану (34%) и гексадекану (52%, рис. 6П-В). Это говорит о том, что поверхность клеток *S. aureus* MFP03 так же гидрофобна, как и у клеток *C. acnes*. Однако, низкое сродство клеток *S. aureus* к этилацетату (20%) свидетельствует об отличных от таковых у *C. acnes* люисовских кислотно-основных свойствах молекул поверхности клеток у *S. aureus*, а значит – об отличии поверхностного заряда клеток *S. aureus* от такового у клеток *C. acnes*. Растворители пары «хлороформ-гексадекан» обладают практически одинаковыми Ван дер Ваальсовыми силами, и TBY и PS291® увеличивали гидрофобность и отрицательный заряд поверхности бактериальной клетки в случае *S. aureus*: сродство к хлороформу повышалось до 98% и 97% соответственно. Это подтверждалось и тем, что у клеток снижалось сродство к этилацетату (TBY 50% - до 10%, PS291® - до 15%). При этом, TBY и PS291® незначительно повышали гидрофобность клеток – возрастало сродство к декану (до 50% и 41% соответственно) и гексадекану (до 65% и 56% соответственно). ФР 50% очень по-разному влиял на *S. aureus* MFP03: сродство к хлороформу (90%) не изменялось, сродство к этилацетату понижалось до 17,5%, к декану и гексадекану также понижалось (до 17% и 29% соответственно). Это может быть объяснено тем, что при разбавлении среды ФР уменьшается общая гидрофобность клеток *S. aureus*, тогда как поверхностные заряды не изменяются. Это подтверждает гипотезу о влиянии именно химического состава TBY на формирование биопленок.

3.4. Исследование влияния НУП на моновидовые биопленки микроорганизмов-комменсалов кожи

Наконец, для того, чтобы выяснить, как наши собственные гуморальные системы взаимодействуют с микробиомом кожи и влияют на формирование биопленок, мы исследовали влияние НУП на рост моновидовых и бинарных культур и биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека.

3.4.1. Исследование динамики роста культур в присутствии НУП

3.4.1.1. *C. acnes*. В ходе экспериментов было установлено, что ни ANP, ни CNP во всех концентрациях, а также их сочетание, не оказывали выраженного значимого эффекта на рост культур. У обоих штаммов *C. acnes* (см. приложение, рис. 7П) максимальная ОП При 37 °С лежала в пределах от 0.8 до 1.4. При этом CNP в концентрации 10^{-6} М вызывала некоторое увеличение биомассы во второй половине логарифмической фазы, что особенно выражено у штамма RT4. У *C. acnes* RT5 CNP в других исследованных концентрациях несколько снижал ОП_{макс} (в наибольшей степени при концентрации 1×10^{-7} М, рис. 7П-А) тогда как все исследованные концентрации ANP понижали максимальный уровень ОП до порядка 0.8 (рис. 7П-А). При этом CNP во всех исследованных концентрациях повышал количество биомассы (ОП) у штамма RT4 (рис. 7П-Б), тогда как в образцах с ANP ОП_{макс} была близка к контролю либо немного уменьшалась.

Влияние НУП на параметры динамики роста культур *C. acnes* выражалось также в том, что рост клеток замедлялся, при этом длина лаг-фазы у обоих штаммов не изменялась: в контроле у *C. acnes* RT5 она составляла 16 ч, а у *C. acnes* RT4 – 22 ч. В контрольных образцах константы скорости у штаммов RT5 и RT4 равнялись 0.12 ч^{-1} и 0.09 ч^{-1} соответственно, тогда как в образцах с НУП они были меньше. Результаты расчетов приведены в таблице 7.

Таблица 7. Характеристики роста культур *C. acnes* в присутствии НУП

Штаммы и параметры НУП	<i>C. acnes</i> RT5			<i>C. acnes</i> RT4		
	Константа скорости роста, ч ⁻¹	Время удвоения, ч	Константа отмирания, ч ⁻¹	Константа скорости роста, ч ⁻¹	Время удвоения, ч	Константа отмирания, ч ⁻¹
ANP 1×10^{-6} М	0,07	9,74	0,0020	0,07	10,28	0,0064
ANP 1×10^{-7} М	0,12	11,33	-0,0130	0,08	8,61	-0,0061
ANP 1×10^{-8} М	0,05	14,87	-0,0081	0,09	8,54	0,0010
CNP 1×10^{-6} М	0,08	8,06	-0,0003	0,13	5,76	-0,0005
CNP 1×10^{-7} М	0,06	11,29	0,0113	0,08	8,40	0,0124
CNP 1×10^{-8} М	0,07	10,31	0,0181	0,06	12,25	0,0194
ANP+CNP 1×10^{-6} М	0,08	10,38	-0,0051	0,09	8,07	0,0065
Контроль	0,12	6,96	0,0003	0,09	7,80	0,0155

У обоих штаммов *C. acnes* добавление НУП вызывало некоторое замедление роста, что выражалось в уменьшении константы скорости роста и увеличении времени удвоения. При этом исключением были образцы с сочетанием НУП в концентрации 1×10^{-6} М: замедление

роста было незначительным в случае штамма RT5, а в случае штамма RT4 наблюдалось даже некоторое ускорение роста.

3.4.1.2. *Staphylococcus*. По результатам экспериментов (см. приложение, рис. 8П) константы скорости роста моновидовых культур у *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 оказались практически идентичны: при 37°C в контроле 0.6 и 0.69 ч⁻¹, а времена удвоения – 61 и 69 мин соответственно. Константы скорости отмирания в контроле при 37°C у *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 были 0.009 и 0.05 ч⁻¹ соответственно. Максимальные показатели оптической плотности у *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 при 37°C также были сходными и находились в диапазоне ОП₅₈₀ от 0.9 до 1 (по золотистому стафилококку данные не показаны). Добавление НУП не оказывало значимого эффекта на параметры роста обеих культур: лишь в случае *S. epidermidis* добавление ANP в концентрации 10⁻⁶ М незначительно увеличивало время удвоения (до 69 мин), уменьшало константу скорости роста (до 0.63 ч⁻¹) и увеличивало константу скорости отмирания (до 0.06 ч⁻¹). Длина лаг-фазы при 37°C во всех случаях не изменялась и составляла 1 ч у *S. aureus* MFP03 и 1.8 ч у *S. epidermidis* MFP04

При 33°C ситуация несколько изменялась: константы скорости роста в контроле у *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 были 0.63 и 0.69 ч⁻¹ соответственно (времена удвоения 63 и 67 мин соответственно). Константа скорости отмирания *S. epidermidis* MFP04 в контроле при 33°C составляла 0.04 ч⁻¹. У *S. aureus* MFP03 в течение 24 ч инкубации фаза отмирания не начиналась. Длительность лаг-фазы немного увеличивалась по сравнению с 37°C – до 1.5 ч у *S. aureus* MFP03 и до 2 ч. у *S. epidermidis* MFP04. Максимальные ОП, как и при 37°C, лежали в диапазоне 0.9-1.0. Добавление НУП ни в одной концентрации не изменяло параметров роста обоих микроорганизмов. Это вполне согласуется с результатами ранее опубликованных работ, выполненных на других микроорганизмах (Veron et al., 2008; Rosay et al., 2015).

3.4.2. Исследование влияния НУП на формирование моновидовых биопленок при помощи КЛСМ

3.4.2.1. КЛСМ биопленок *S. aureus* MFP03 в присутствии НУП. Анализ средней толщины и биомассы биопленок *S. aureus* MFP03 показывал, что условия культивирования микроорганизма критически важны при его взаимодействии с натрийуретическими пептидами (см. приложение, рис. 9П). Причем наиболее сильным эффектом обладали субмикромольные концентрации, а именно 1x10⁻⁷ и 1x10⁻⁸ М. При 37°C и аэробной атмосфере (стандартные условия) в присутствии НУП значительно уменьшались и средняя толщина, и плотность биомасса биопленок. В контроле средняя толщина составляла 30.13 мкм, а плотность биомассы – 27.66 мкм³/мкм². При концентрации ANP 1x10⁻⁸ М средняя толщина снижалась до 25.6 мкм (85% от контроля), а плотность биомассы – до 18 мкм³/мкм² (65% от контроля). Сочетание пептидов обладало аддитивным эффектом. При понижении температуры до 33°C толщина

био пленок в контроле составляла 14.1 мкм, а плотность биомассы – 14.07 мкм³/мкм²: био пленки росли хуже, чем при 37°C. При этом ингибиторный эффект НУП исчезал и намечалась тенденция к стимуляции, при этом аддитивного эффекта от сочетания пептидов не наблюдалось.

После удаления из атмосферы кислорода при 33°C стимулирующий эффект НУП усилился. Толщина био пленок *S. aureus* MFP03 составляла 17.3 мкм, а плотность биомассы – 16.7 мкм³/мкм², что выше, чем при 33°C и аэробной атмосфере. ANP в концентрации 1x10⁻⁸ М увеличивал толщину и плотность биомассы био пленок до 23.3 мкм (134.9% от контроля) и 22.81 мкм³/мкм² (136.6% от контроля). CNP в концентрации 1x10⁻⁸ М увеличивал среднюю толщину до 21.2 мкм (122.7% от контроля), а среднюю плотность биомассы – до 21.17 мкм³/мкм² (126.8% от контроля), а в концентрации 1x10⁻⁷ М – до 19.2 мкм (111% от контроля) и до 18.7 мкм³/мкм² (112% от контроля) соответственно. Сочетание пептидов, как и в предыдущем случае, не оказывало аддитивного эффекта, более того, при сочетании НУП стимулирующий эффект пропал. Когда после всех изменений условий заменили среду TSB на RSM, то этим нейтрализовали стимулирующий, и ингибиторный эффект пептидов. Зависимость эффектов пептидов на *S. aureus* MFP03 резюмирована в таблице 8.

Таблица 8. Зависимость эффекта натрийуретических пептидов на рост био пленок *S. aureus* от изменения условий культивирования

УСЛОВИЯ	37°C, аэробная атмосфера, среда TSB (Стандартные)	33°C, аэробная атмосфера, среда TSB	33°C, анаэробная атмосфера, среда TSB	33°C, анаэробная атмосфера, среда RCM
ЭФФЕКТ	Отсутствие выраженного эффекта пептидов при высоких концентрациях (10 ⁻⁶ , 10 ⁻⁷ М), ингибиторный эффект при концентрации 10 ⁻⁸ М обоих пептидов	Исчезновение ингибиторного эффекта, намечается тенденция к стимуляции	Выраженная стимуляция роста при низких концентрациях обоих пептидов	Исчезновение ингибиторного эффекта, намечается тенденция к стимуляции

3.4.2.2. КЛСМ биопленок *S. epidermidis* MFP04 в присутствии НУП. В случае *S. epidermidis* эффекты НУП и их характер отличались от таковых у *S. aureus*. При 37°C и аэробной атмосфере средняя толщина и плотность биомассы биопленок были оба НУП во всех концентрациях стимулировали рост биопленок (см. приложение, рис. 10П).

Плотность биомассы в контроле равнялась 23.52 мкм³/мкм², а средняя толщина – 24,7 мкм. При добавлении ANP во всех исследованных концентрациях наблюдали увеличение плотности биомассы, максимальное при концентрации 1x10⁻⁶ М (до 29 мкм³/мкм² или 125,8% от контроля), а также средней толщины, также максимальное при концентрации 1x10⁻⁶ М (до 30.3 мкм или до 123% от контроля). CNP оказывал схожее стимулирующее воздействие при 37°C: плотность биомассы и средняя толщина биопленок больше всего увеличивались при концентрации CNP 10⁻⁷ М (до 30.3 мкм³/мкм² или 129% и до 31.7 мкм или 128% соответственно). Сочетание НУП придавало некоторый аддитивный характер их действию, (рисунок X22): толщина увеличивалась до 35.1 мкм (142% от контроля), а плотность биомассы – до 32.9 мкм³/мкм² (139% от контроля).

При понижении температуры культивирования *S. epidermidis* MFP04 до 33°C воздействие НУП приобретало противоположный, подавляющий характер. Если в контроле плотность биомассы и средняя толщина составляли 16.83 мкм³/мкм² и 16.93 мкм соответственно, то при добавлении ANP наблюдали снижение обоих параметров, максимально выраженные при концентрации ANP 10⁻⁸ М (плотность биомассы - 14.5 мкм³/мкм² или 86% от уровня контроля, и средняя толщина - 14.4 мкм или 84.9% от уровня контроля). CNP также снижал плотность биомассы и среднюю толщину биопленок *S. epidermidis* MFP04. Максимальный эффект наблюдали при концентрации 10⁻⁷ М, когда плотность биомассы снижалась до 12.5 мкм³/мкм² (уровень 74.2% от контроля), а средняя толщина – до 10.31 мкм (60.9 % от контроля). Эффекты НУП на рост биопленок *S. epidermidis* MFP04 резюмированы в таблице 9.

При удалении кислорода из атмосферы культивирования ингибиторный эффект НУП сменился на стимулирующий. В контроле толщина и плотность биомассы биопленок составляли 11 мкм и 10.9 мкм³/мкм² соответственно. ANP в концентрации 1x10⁻⁶ М увеличивал толщину и плотность биомассы биопленок *S. epidermidis* до 14.1 мкм (127.8% от контроля) и 13.8 мкм³/мкм² (123.1% от контроля) соответственно. CNP в концентрации 1x10⁻⁷ М увеличивал толщину и плотность биомассы до 15.6 мкм (142% от контроля) и 15.3 мкм³/мкм² (139% от контроля) соответственно, а в концентрации 1x10⁻⁸ М - до 17.6 мкм (160% от контроля) и 16.9 мкм³/мкм² (153% от контроля) соответственно.

Таблица 9. Зависимость эффекта натрийуретических пептидов на рост биопленок *S. epidermidis* MFP04 от изменения условий культивирования

УСЛОВИЯ	37°C, аэробная атмосфера, среда TSB (Стандартные)	33°C, аэробная атмосфера, среда TSB	33°C, анаэробная атмосфера, среда TSB
ЭФФЕКТ	Выраженный стимулирующий эффект обоих НУП во всех концентрациях	Ингибиторный эффект обоих пептидов, особенно в низких концентрациях	Выраженная стимуляция роста при низких концентрациях обоих пептидов.

3.4.2.3. КЛСМ биопленок *S.acnes* в присутствии НУП. *S. acnes* тоже оказался чувствителен к воздействию пептидов, в стандартных условиях оба штамма ингибировались обоими НУП во всех исследованных концентрациях. *S. acnes* RT5 при 37°C в контроле образовывал биопленки со средней толщиной 26.9 мкм и плотностью биомассы 23.3 мкм³/мкм² (см. приложение, рис. 11П), ингибиторный эффект ANP был примерно одинаков – толщина и плотность биомассы биопленки снижались до 20.3-21.5 мкм (75.5-79.5% от контроля) и 15.5-18.3 мкм³/мкм² (67-79% от контроля) соответственно. CNP оказывал наибольший ингибиторный эффект при концентрации 1x10⁻⁶ М: толщина и плотность биомассы снижались до 13.23 мкм (49.2% от контроля) и 11.4 мкм³/мкм² (42.3% от контроля) соответственно. Сочетание пептидов не обладало аддитивным характером: ингибирование роста биопленок было примерно на уровне CNP в той же концентрации, что позволяет предположить о конкурентном характере взаимодействия пептидов.

S. acnes RT4 при 37°C также ингибировался всеми исследованными концентрациями обоих НУП (см. приложение, рис. 12П). В контроле средняя толщина и плотность биомассы биопленок составляли 23.2 мкм и 20.1 мкм³/мкм² соответственно. ANF оказывал наибольшее ингибиторное воздействие в концентрации 1x10⁻⁷ М: толщина и плотность биомассы биопленок снижались до 15.9 мкм (68.5% от контроля) и 12.5 мкм³/мкм² (62.3% от контроля) соответственно. CNP оказывал наибольший ингибиторный эффект также при концентрации 1x10⁻⁷ М: толщина и плотность биомассы биопленок снижались до 11.8 мкм (51% от контроля) и 9.8 мкм³/мкм² (49% от контроля) соответственно. Сочетание также обладало слабым аддитивным эффектом.

При понижении температуры до 33°C штаммы повели себя по-разному. *S. acnes* RT5 в контроле образовывал биопленки со средней толщиной 21 мкм и плотностью биомассы 20.7 мкм³/мкм² (слабее, чем при 37°C). Ингибирование обоими НУП сохранилось, хотя в целом оно стало чуть слабее. ANP во всех исследованных концентрациях ингибировал рост биопленок примерно одинаково, наибольший эффект наблюдали при концентрации 1x10⁻⁸ М: толщина и плотность биомассы биопленок снижались до 16.7 мкм (77% от контроля) и 15,9 мкм³/мкм² (77% от контроля) соответственно. CNP оказывал наибольший подавляющий эффект при концентрации 1x10⁻⁷ М: толщина и плотность биомассы биопленок снижались до 14.1 мкм (67% от контроля) и 14.2 мкм³/мкм² (68.5% от контроля) соответственно. *S. acnes* RT4 в контроле формировал биопленки со средней толщиной 9.3 мкм и плотностью биомассы 8.9 мкм³/мкм². При понижении температуры данный штамм стал полностью нечувствителен к воздействию пептидов. Таким образом, можно предполагать, что воздействие НУП в случае пропионовокислых бактерий штаммоспецифично и зависит от фенотипа и экологической роли каждого штамма на коже человека. Характер воздействия НУП на штаммы *S. acnes* резюмирован в таблице 10.

Таблица 10. Зависимость эффекта натрийуретических пептидов на рост биопленок *S. acnes* от изменения условий культивирования

УСЛОВИЯ ШТАММ		37°C, анаэробная атмосфера, среда RCM (Стандартные)	33°C, анаэробная атмосфера, среда RCM
		ЭФФЕКТ	ЭФФЕКТ
ЭФФЕКТ	<i>S. acnes</i> RT5	Значительное ингибирование роста биопленок (снижение средней толщины и биомассы) при всех концентрациях обоих пептидов	Значительное ингибирование роста биопленок при всех концентрациях обоих пептидов
	<i>S. acnes</i> RT4	Значительное ингибирование роста биопленок при всех концентрациях обоих пептидов	Исчезновение ингибиторного эффекта обоих пептидов, отсутствие влияния на рост биопленок

3.5. Исследование бинарных биопленок *S. aureus* и *S. epidermidis* и влияния на них компонентов косметики и НУП

3.5.1. Исследование взаимодействия микроорганизмов в бинарных биопленках *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04

В экспериментах с бинарными биопленками стафилококков биопленки моделировали при температуре 37°C.

Логарифм количества КОЕ *S. aureus* и *S. epidermidis*, наносимого на фильтр, был равен 7.75-8.5 (число КОЕ, наносимое на фильтр – от 5.6×10^7 до 3.2×10^8). В моновидовых биопленках после 24 ч культивирования количество КОЕ *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 было равно в среднем 4.65×10^{12} и 4.1×10^{12} соответственно (рис. 20). При этом, в случае бинарных биопленок на основе предформированных, 48-часовые моновидовые биопленки *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 содержали в себе в среднем 1.1×10^{11} и 1.8×10^{11} КОЕ соответственно: за дополнительные 24 ч культивирования количество КОЕ в биопленках снижалось более чем на порядок, что подтверждается результатами окрашивания биопленок МТТ (рис. 21): метаболическая активность клеток, пропорциональная оптической плотности экстракта формазана, в моновидовых биопленках, росших 24 ч, была на уровне 1.4 у обоих микроорганизмов, тогда как после 48 ч инкубации она понижалась до 0.86 у *S. aureus* MFP03 и 0.68 у *S. epidermidis* MFP04.

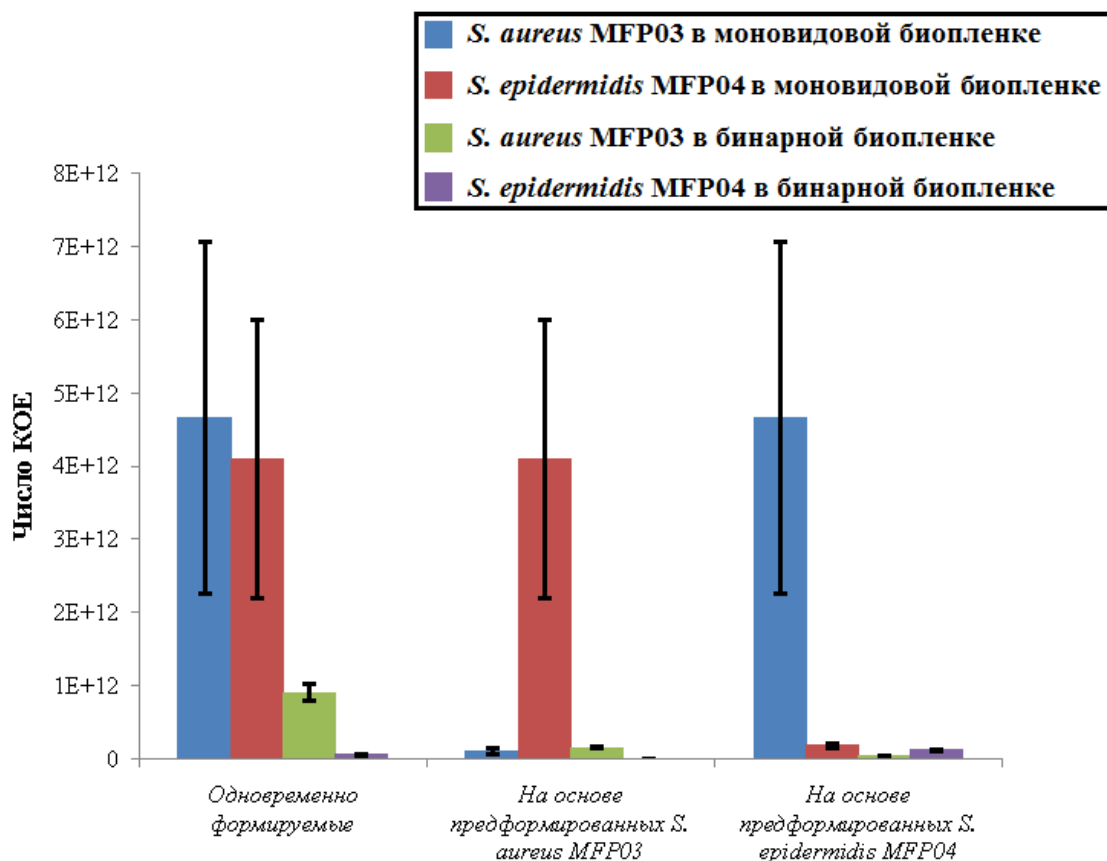


Рис. 20. Количество КОЕ моновидовых и бинарных биопленок *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04.

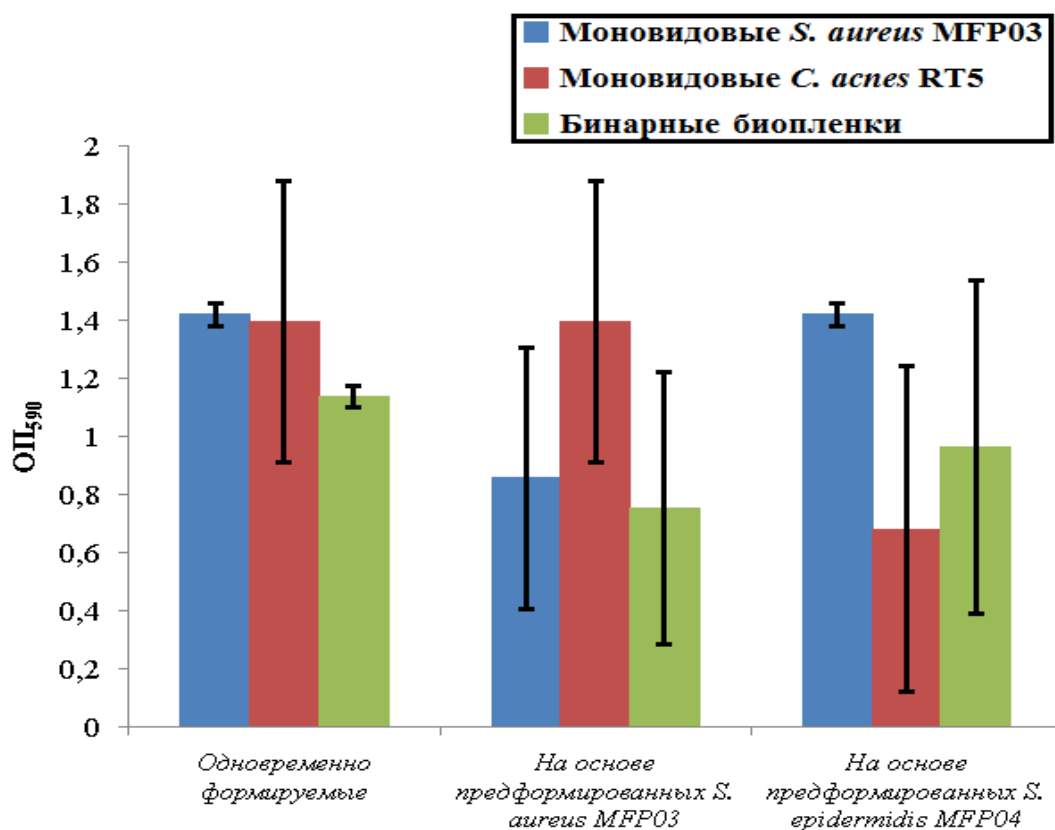


Рис. 21. Окрашивание МТТ моновидовых и бинарных биопленок *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04, выращенных при 37°C.

В бинарных биопленках оба микроорганизма росли значительно хуже, нежели в моновидовых, что свидетельствует о высокой конкуренции между ними. Так, в одновременно формируемых бинарных биопленках количество КОЕ *S. aureus* MFP03 достигало лишь 9×10^{11} , а *S. epidermidis* MFP04 – $5,9 \times 10^{10}$, что отражалось также и в интенсивности окраски МТТ (рис. 21), которая при этом снижалась до 1.1.

В бинарных биопленках, созданных на основе предформированных биопленок *S. aureus* MFP03 количество КОЕ в моновидовых биопленках *S. aureus* снижалось, как уже было показано выше. При добавлении *S. epidermidis* количество КОЕ *S. aureus* в бинарной биопленке незначительно повышалось по сравнению с моновидовой и было равно $1,5 \times 10^{11}$. Количество КОЕ *S. epidermidis* в бинарной биопленке было равно в среднем $4,1 \times 10^9$, что на три порядка меньше, чем в моновидовых 24 ч биопленках. Это коррелирует и со снижением метаболической активности бинарных биопленок, которая оставалась на уровне активности моновидовых 48-часовых биопленок *S. aureus* MFP03.

В бинарных биопленках на основе предформированных биопленок *S. epidermidis* MFP04 количество КОЕ *S. epidermidis* по сравнению с 48-часовыми моновидовыми биопленками изменялось незначительно и составляло $1,2 \times 10^{11}$, тогда как число КОЕ *S. aureus* составляло $3,7 \times 10^{10}$, что на порядок меньше, чем в бинарных биопленках других типов и на два порядка

меньше, чем в 24-часовых моновидовых биопленках. Это отражалось и на результатах окраски МТТ: уровень метаболической активности бинарных биопленок был лишь незначительно выше, чем у моновидовых биопленок *S. epidermidis* (0.96 и 0.7 соответственно).

Результаты экспериментов показали, что *S. aureus* MFP03 обладал значительным конкурентным преимуществом перед *S. epidermidis* MFP04 в бинарных биопленках. Если количество КОЕ и параметры роста у данных микроорганизмов в моновидовых культурах и биопленках были практически идентичны, в составе бинарных биопленок *S. epidermidis* MFP04 рос на несколько порядков хуже, чем в моновидовых. При этом *S. aureus* также рос хуже, однако, негативный эффект от присутствия *S. epidermidis* MFP04 был значительно слабее – число КОЕ уменьшалось лишь на порядок. Также, результаты опытов демонстрируют лучшую защищенность и устойчивость микроорганизмов в составе биопленок к неблагоприятным внешним факторам, таким как поселение конкурентов-колонизаторов. *S. epidermidis* MFP04 при одновременном с *S. aureus* MFP03 формировании бинарных биопленок, или же будучи вторичным колонизатором зрелых биопленок *S. aureus* MFP03, рос на 2-3 порядка хуже по сравнению с моновидовыми биопленками. В зрелой биопленке *S. epidermidis* MFP04 оказывался практически нечувствительным к присутствию *S. aureus* MFP03. Аналогично *S. aureus* MFP03 в составе сформированной зрелой биопленки был нечувствителен к присутствию *S. epidermidis* MFP04. Таким образом, конкурентные свойства данных микроорганизмов проявлялись в основном на стадии формирования биопленок.

3.5.2. Исследование влияния компонентов косметики на моновидовые и бинарные биопленки *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04

Поскольку исследуемые соединения дороги для использования в больших объемах (особенно НУП), исследования их потенциального влияния на бинарные биопленки исследовали в жидкой среде в малых объемах. Также, для минимизации возможных ошибок, связанных с переносом носителей с биопленками со старых сред на новые (как в экспериментах с предформированными биопленками), исследовали только биопленки, формируемые одновременно обоими микроорганизмами с нуля. Биопленки выращивали при 37°C.

В бинарных планктонных культурах *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 в данной системе суммарное количество КОЕ обоих микроорганизмов в контроле составляло 5.2×10^{10} клеток, из которых *S. aureus* MFP03 – 3.9×10^{10} , а *S. epidermidis* MFP04 – 1.3×10^{10} : разница в количестве КОЕ составляла 2.6 раза (рис. 22-А). Добавление в среду 50% ФР понижало количество КОЕ вследствие разбавления и нехватки питательных веществ: общее число КОЕ было равно 2.18×10^{10} , *S. aureus* MFP03 – 8.9×10^9 , *S. epidermidis* MFP04 – 1.29×10^{10} . Соотношение разница в количестве КОЕ *S. aureus* и *S. epidermidis* составляла 0.69. Однако, при добавлении ТВУ 50% количество КОЕ обоих микроорганизмов увеличивалось по сравнению с

контролем: общее число КОЕ составило 1.3×10^{11} , из которых *S. aureus* MFP03 - 6.95×10^{10} КОЕ, а *S. epidermidis* MFP04 – 6.05×10^{10} , разница чисел КОЕ микроорганизмов составила 1.15 раза.

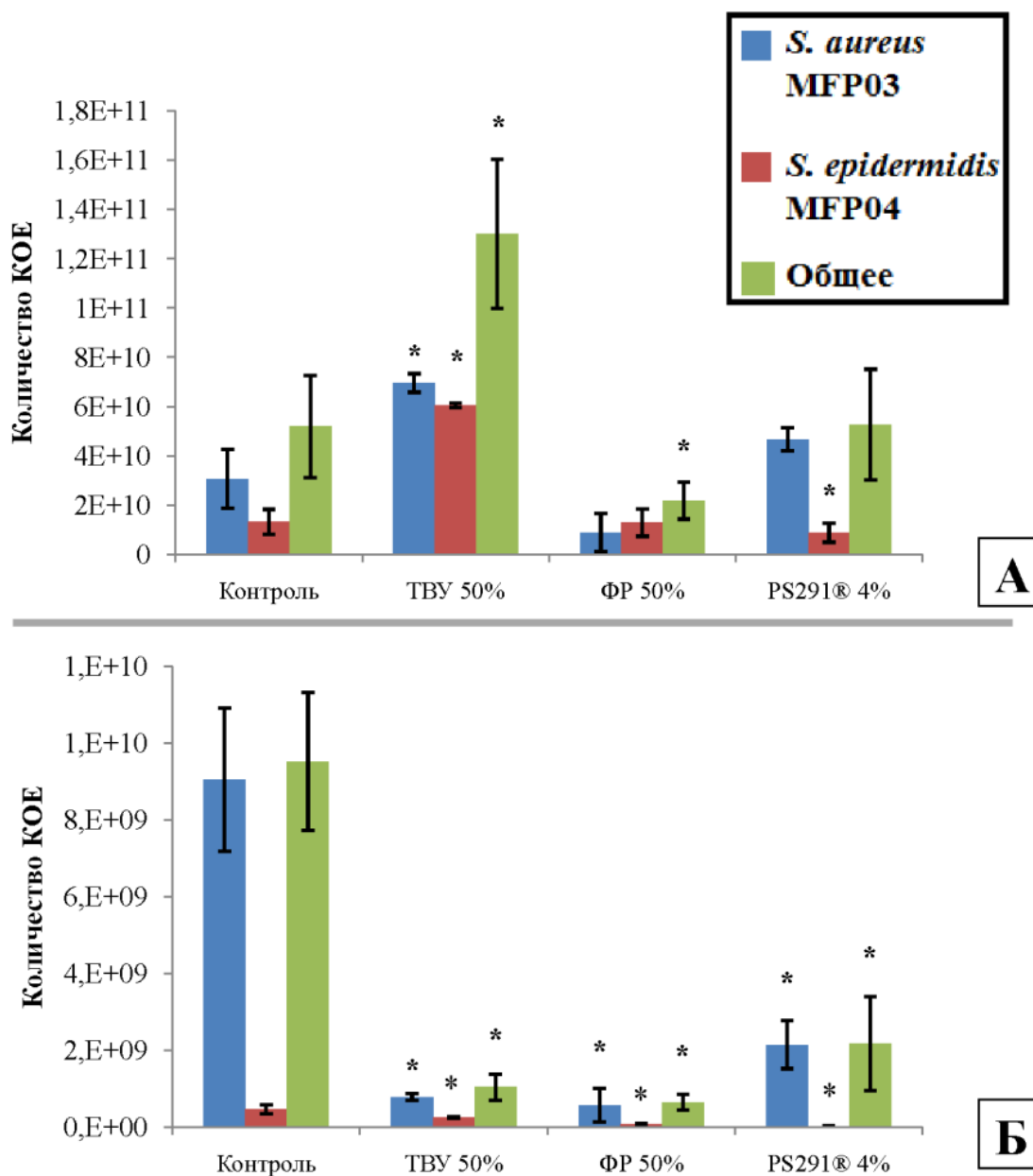


Рис. 22. Количество КОЕ *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 в бинарных планктонных культурах и био пленках при добавлении ТВУ 50%, ФР 50%, PS291® 4%. А – планктонные культуры. Б – био пленки. * - различие достоверно при $p=0.05$.

Таким образом, ТВУ, несмотря на разбавление среды, увеличивала количество КОЕ в планктонных культурах. При этом эффект разбавления среды выражается в большем приросте КОЕ *S. epidermidis* MFP04 относительно *S. aureus*. Это подтверждается также результатами подсчета КОЕ образцов с PS291®. Поскольку разбавления среды при этом не происходило, разница в числе КОЕ микроорганизмов была равна 5.2 раза (число КОЕ *S. aureus* MFP03 4.67×10^{10} , число КОЕ *S. epidermidis* MFP04 – 8.78×10^9 , общее – 5.5×10^{10}). При этом количество

КОЕ золотистого стафилококка в присутствии PS291® увеличивалось относительно контрольного. Если сравнивать количество КОЕ в моновидовых и бинарных планктонных культурах, то *S. aureus* MFP03 то существенную разницу в числе КОЕ между моновидовыми и бинарными планктонными культурами наблюдали только при добавлении ФР 50%, когда оно уменьшалось в бинарной культуре в 3 раза по сравнению с моновидовой. В целом же и ТВУ и PS291 увеличивали число КОЕ *S. aureus* MFP03 по сравнению с контролем и в моновидовых, и в бинарных планктонных культурах. Добавление ФР 50% также увеличивало число КОЕ в моновидовых культурах по сравнению с контролем, но уменьшало в бинарных. *S. epidermidis* MFP04 рос значительно хуже в бинарных культурах по сравнению с моновидовыми (см. приложение, рис. 13П-А-Б): разница в числе КОЕ *S. epidermidis* MFP04 между моновидовыми и бинарными планктонными культурами составляла 16 раз. Добавление 50% ТВУ увеличивало число КОЕ и в моновидовых (около 2.5 раз), и в бинарных культурах (около 4.5 раз), и количество КОЕ в моновидовых культурах было всего в 9 раз больше, чем в бинарных. Наименьшая разница (всего 4 раза) между числом КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в моновидовых и бинарных биопленках была при добавлении ФР50%: в бинарных культурах количество КОЕ оставалось на уровне контроля, тогда как в моновидовых – снижалось (что подтверждает гипотезу о влиянии разбавления среды на соотношение микроорганизмов в бинарных культурах). Добавление PS291® существенно не влияло на баланс микроорганизмов в бинарных культурах по сравнению с контролем, а также не влияло существенно на количество КОЕ в моновидовых планктонных культурах.

В биопленках (рисунок 22-Б, рис. 13П-В-Г) количество КОЕ обоих микроорганизмов было существенно меньше: в контроле общее число КОЕ в среднем было равно 9.52×10^9 (что почти на порядок меньше, чем в планктонной культуре), и из этого количества 9.05×10^9 были КОЕ *S. aureus* MFP03 (20-кратное преимущество перед *S. epidermidis* MFP04). Добавление ФР, ТВУ и PS291® очень сильно снижало количество КОЕ в бинарных биопленках в первую очередь за счет сокращения количества КОЕ *S. aureus*, но и количество КОЕ *S. epidermidis* также понижалось по сравнению с контролем. При добавлении ТВУ число КОЕ *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 составляло 7.9×10^8 и 2.5×10^8 соответственно (разница 3.16 раза), а при добавлении ФР – 5.7×10^8 и 8.3×10^7 соответственно (разница 6.9 раз). Добавление же PS291® увеличивало разницу в количестве КОЕ между *S. aureus* и *S. epidermidis* до 77 раз (2.15×10^9 против 2.8×10^7 КОЕ соответственно). Таким образом, ТВУ увеличивало конкурентные свойства *S. epidermidis* MFP04 в биопленках с *S. aureus* MFP03, а PS291® - ослаблял.

При сравнении числа КОЕ штаммов между моновидовыми и бинарными биопленками наблюдали следующую картину: при добавлении всех испытываемых компонентов косметики и ФР у *S. aureus* MFP03 количество КОЕ в моновидовых и бинарных биопленках снижалось

(рисунок 13П-В), тогда как у *S. epidermidis* MFP04 в моновидовых биопленках при добавлении ТВУ количество КОЕ увеличивалось, при добавлении ФР – уменьшалось, при добавлении PS291® - не изменялось (рисунок 13П-Г), что свидетельствует о противоположных эффектах данных соединений на рост биопленок двух близкородственных микроорганизмов. Это подтверждает гипотезу об усилении конкурентных свойств *S. epidermidis* MFP04 по отношению к *S. aureus* MFP03 в присутствии ТВУ. PS291, по-видимому, не оказывает подобного действия. Это подтверждается, также, и данными по окраске биопленок МТТ (данные не показаны): при добавлении исследуемых соединений интенсивность окраски МТТ биопленок уменьшалась.

3.5.3. Исследование влияния НУП на моновидовые и бинарные биопленки *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04

Анализ числа КОЕ в моновидовых и бинарных биопленках *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 показал, что НУП в высоких концентрациях (1×10^{-6} М) понижают число КОЕ в моновидовых планктонных культурах (рисунок 23-А, рисунок 14П) обоих микроорганизмов. Так, в бинарных планктонных культурах суммарное количество КОЕ обоих микроорганизмов в контроле составляло 5.2×10^{10} клеток, из которых *S. aureus* MFP03 – 3.9×10^{10} , а *S. epidermidis* MFP04 – 1.3×10^{10} : разница в количестве КОЕ составляла 2.6 раза (рисунок 29-А). Добавление ANP в концентрациях 1×10^{-7} и 1×10^{-8} М не оказывало значимого эффекта на количество КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в бинарных культурах, но значительно снижало количество КОЕ *S. aureus* MFP03 (до 2.23×10^{10} и 2.2×10^{10} соответственно), сдвигая таким образом баланс в сторону *S. epidermidis* MFP04.

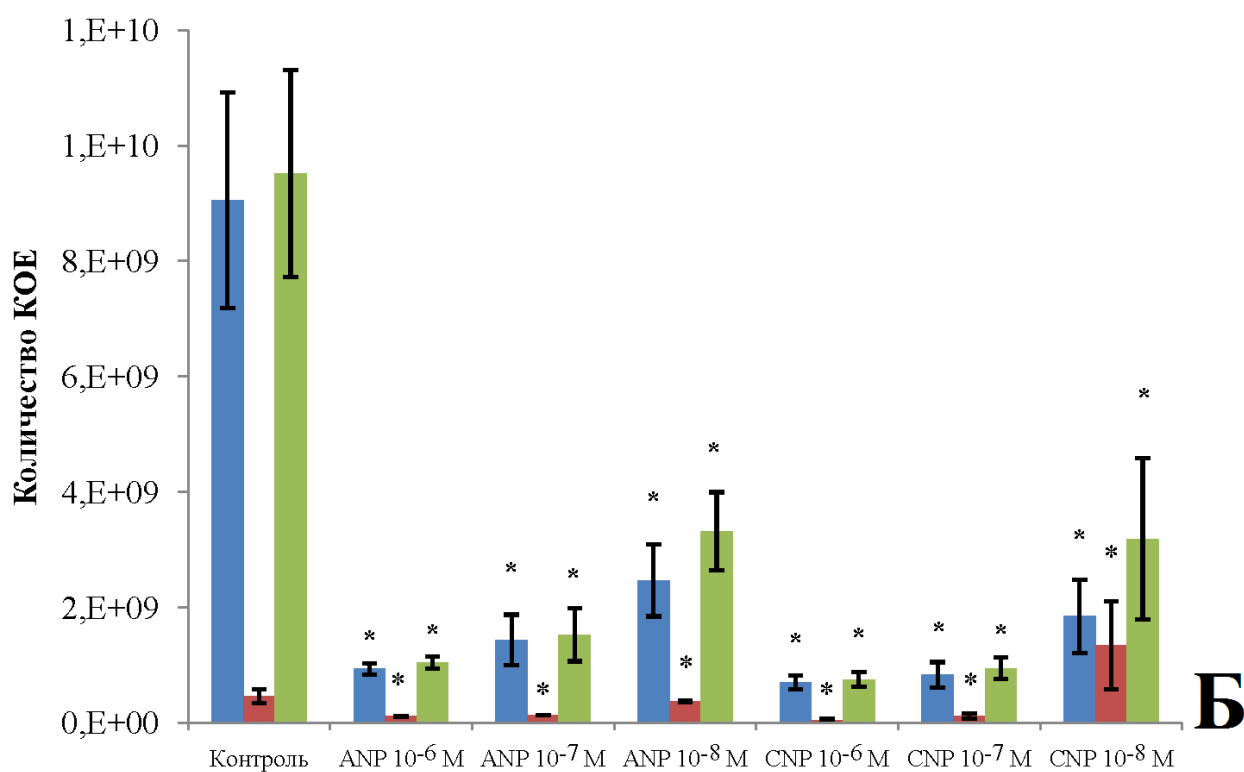
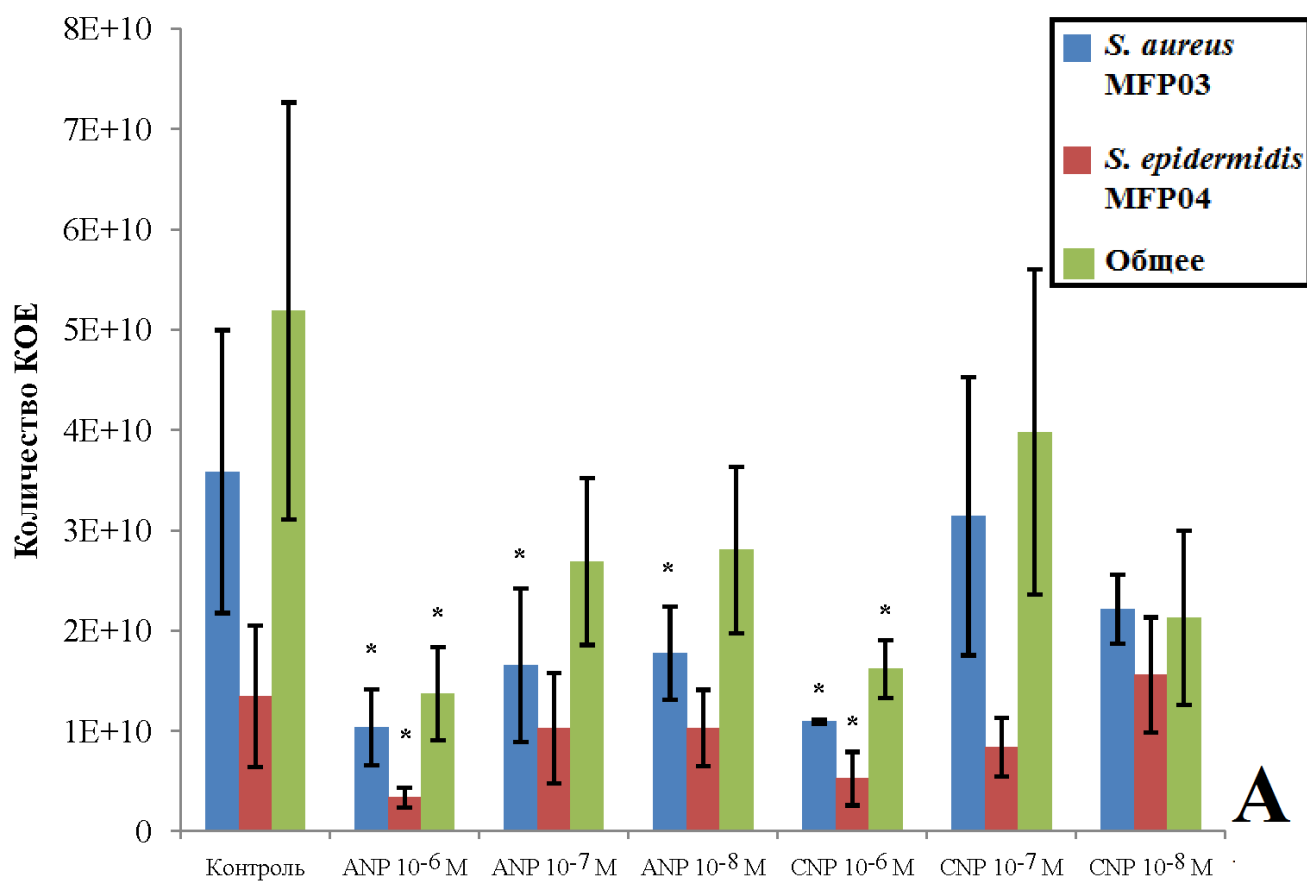


Рис. 23. Количество КОЕ *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 в бинарных планктонных культурах и биопленках при добавлении НУП. А – планктонные культуры. Б – биопленки. * - различие достоверно при $p=0.05$.

3.6. Исследование бинарных биопленок *C. acnes* и *Staphylococcus* и влияния на них компонентов косметики и НУП

Взаимодействие микроорганизмов в составе бинарных биопленок может коренным образом изменять общие свойства и параметры сообщества. Поэтому прежде чем исследовать потенциальные эффекты активных соединений (компонентов косметики, НУП) на сообщества микроорганизмов, необходимо исследовать, каким образом микроорганизмы влияют друг на друга в их отсутствие, что и было сделано в данном разделе работы

3.6.1. Исследование взаимодействия микроорганизмов в бинарных биопленках *C. acnes* в сочетании с *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04

3.6.1.1. Исследование бинарных биопленок *C. acnes*, *S. aureus* и *S. epidermidis* при 37°C. Штаммы *C. acnes* RT4 и RT5 образовывали очень прочные агрегаты клеток, которые не разрушались даже под действием ультразвука (рис. 24), поэтому исследование количества КОЕ данных штаммов не принесло бы результата. В случае изученных штаммов *Staphylococcus* для разрушения клеточных агрегатов было достаточно размешивания суспензии биопленок на фильтрах на вортексе: волокна фильтра, действуя как абразив, разрушали агрегаты клеток. В дополнительных экспериментах (данные не показаны) провели сравнение эффекта ультразвуковой обработки биопленок на фильтрах и размешивания на вортексе и получили одинаковые результаты.

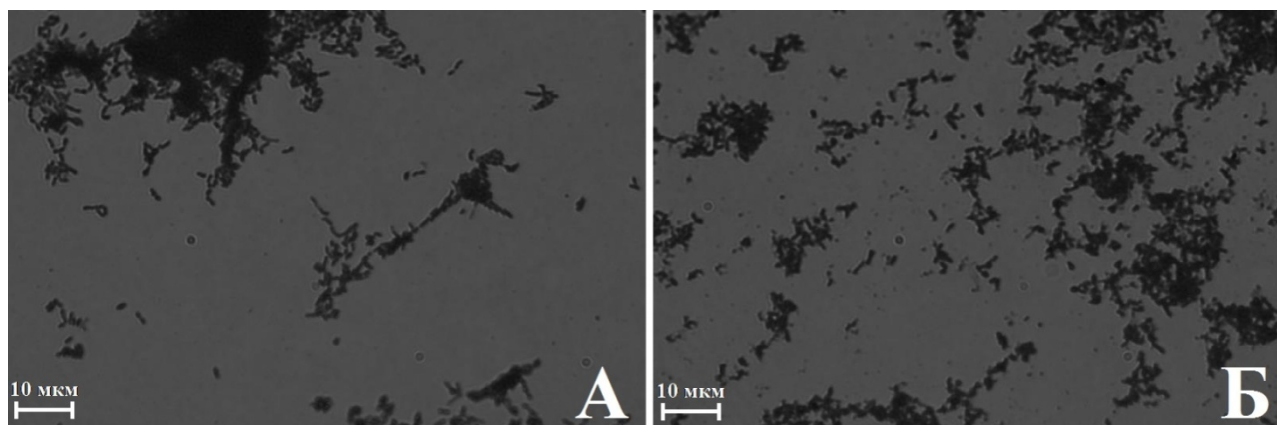


Рис. 24. Агрегаты клеток из биопленок *C. acnes* RT5. А – без обработки, Б – после обработки ультразвуком.

Влияние микроорганизмов друг на друга определяли косвенными методами: подсчетом КОЕ *S. aureus* и *S. epidermidis* и определением ОП экстрактов формазана как показателя метаболической активности клеток. Вначале выращивали моновидовые и бинарные биопленки при 37°C. Результаты подсчета КОЕ представлены на рисунке 25.

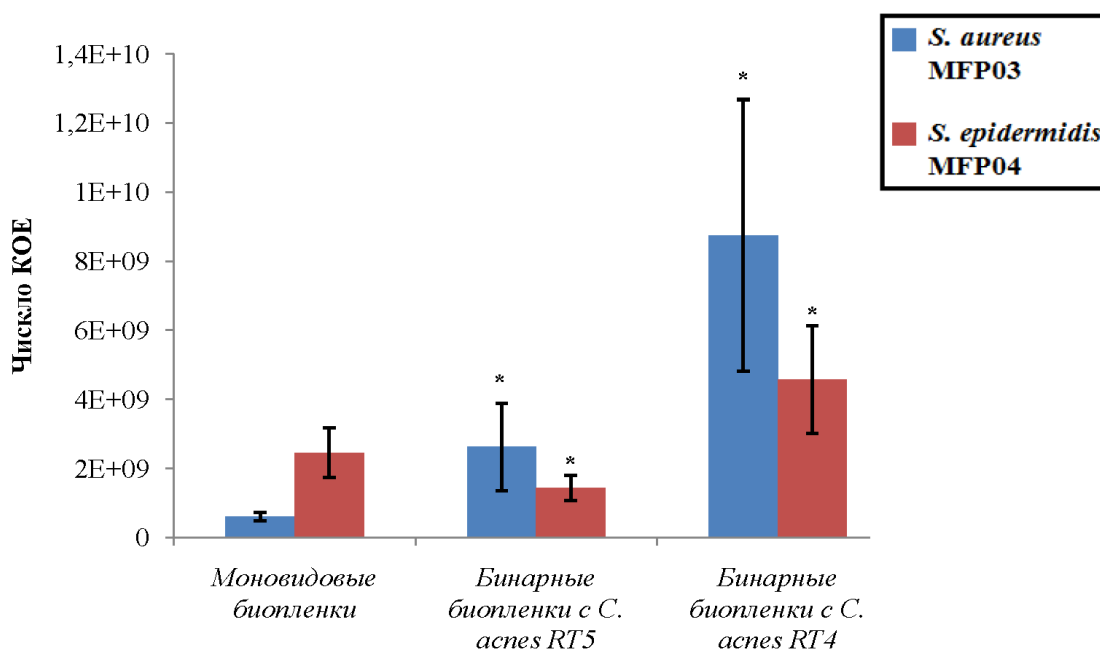


Рис. 25. Число КОЕ *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 в моновидовых биопленках и бинарных биопленках с *C. acnes*, выращенных при 37°C. * - различие достоверно при $p=0.05$.

Логарифм количества КОЕ *S. aureus* и *S. epidermidis*, наносимого на фильтр, был равен 7.75-8.5 (число КОЕ, наносимое на фильтр – от 5.6×10^7 до 3.2×10^8). Рост *S. aureus* MFP03 при 37°C улучшался в присутствии обоих штаммов *C. acnes*. Моновидовые биопленки *S. aureus* MFP03 содержали в себе в среднем 6.05×10^8 КОЕ. В сочетании со штаммом *C. acnes* RT5 число КОЕ *S. aureus* MFP03 увеличивалось до 2.6×10^9 . В бинарной биопленке с *C. acnes* RT4 число КОЕ *S. aureus* увеличивалось до 8.75×10^9 . *S. epidermidis* MFP04 в анаэробных условиях рос лучше, нежели *S. aureus* MFP03: моновидовые биопленки содержали в среднем 2.45×10^9 КОЕ. При этом рос хуже в сочетании с *C. acnes* RT5, чем в моновидовых биопленках и лучше – в сочетании с *C. acnes* RT4: число КОЕ *S. epidermidis* в бинарных биопленках достигало 1.44×10^9 и 4.57×10^9 соответственно. Таким образом, то, каким образом *C. acnes* влияет на рост стафилококков в бинарных биопленках, являлось штаммовой характеристикой *C. acnes*.

Окрашивание моновидовых и бинарных биопленок, выращенных при 37°C, МТТ показало, что суммарная метаболическая активность клеток бинарных биопленок (эквивалентная ОП экстракта МТТ) меньше, чем сумма ОП моновидовых биопленок (см. рис. 26). Если число КОЕ *S. aureus* увеличивалось в присутствии *C. acnes*, уменьшение ОП экстракта бинарной биопленки свидетельствует о снижении числа КОЕ *C. acnes* в присутствии *S. aureus* (рисунок 26-А). В случае сочетания *S. epidermidis* и *C. acnes* RT5 ОП экстракта формазана из бинарной биопленки была даже меньше, чем таковая у моновидовых биопленок *S. epidermidis* (1.38 и 1.3 соответственно, рис. 26-Б). Данная корреляция количества формазана и числа КОЕ

стафилококков свидетельствует о подавляющем преимуществе *Staphylococcus* перед *C. acnes*, что логично следует из разницы скоростей роста данных микроорганизмов.

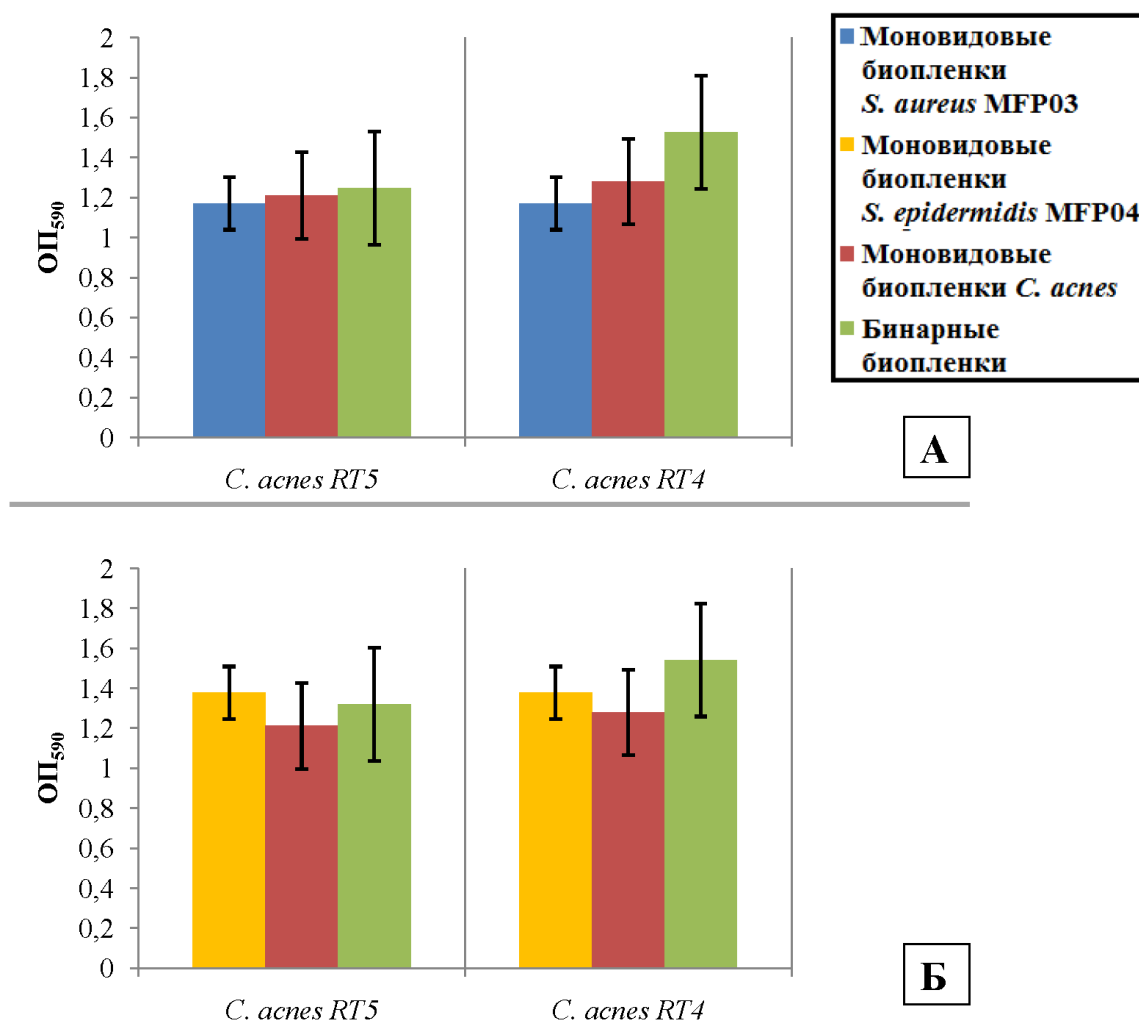


Рис. 26. Окрашивание МТТ моновидовых и бинарных биопленок *C. acnes*, *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04, выращенных при 37°C. А – *S. aureus* + *C. acnes*, Б – *S. epidermidis* + *C. acnes*.

3.6.1.2. Исследование бинарных биопленок *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5 при 33°C.

При понижении температуры до 33°C характер взаимоотношений *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5 изменился. Если при 37°C количество КОЕ *S. aureus* было значительно выше в одновременно формируемых бинарных биопленках, чем в моновидовых в тех же условиях, то при 33°C ощутимой разницы в количестве КОЕ не наблюдали: число КОЕ было равно 4.8×10^9 и 5.2×10^9 в моновидовых и бинарных биопленках соответственно (рис. 27), что несколько ниже, чем при 37°C. При этом в случае предформированных биопленок *S. aureus* количество КОЕ *S. aureus* в бинарных биопленках равнялось 3.9×10^9 и 5.9×10^9 для аэробных и анаэробных условий соответственно (в моновидовых – 4.5×10^9 и 4.2×10^9 соответственно).

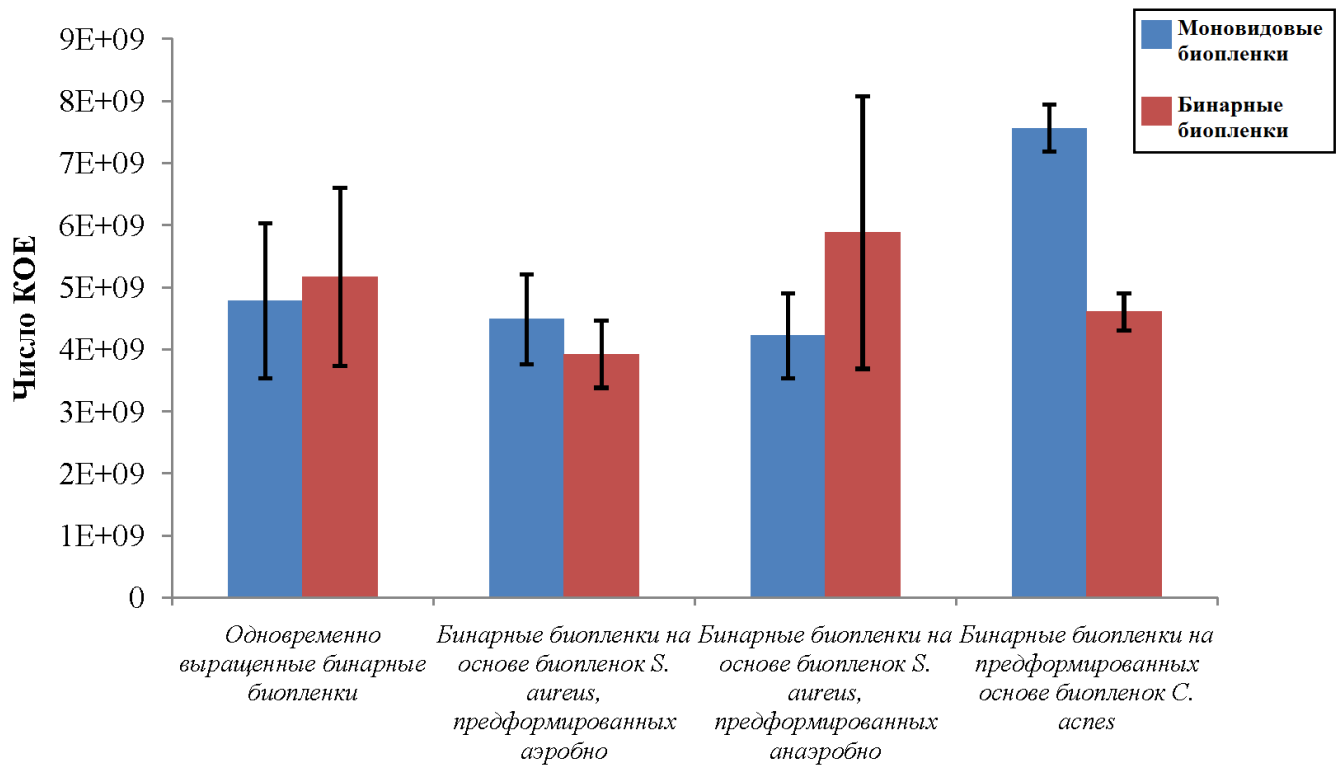


Рис. 27. Количество КОЕ в моновидовых и бинарных биопленках *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5, выращенных при температуре 33°C.

В случае бинарных биопленок на основе предформированных биопленок *C. acnes* RT5 число КОЕ *S. aureus* в бинарных биопленках было равно в среднем 4.6×10^9 . При этом моновидовые биопленки содержали в себе в среднем 7.6×10^9 КОЕ *S. aureus*: *C. acnes* значительно ухудшал рост *S. aureus*. Высокое число КОЕ в моновидовых биопленках *S. aureus* объясняется сравнительно малым временем инкубации – 24 ч, тогда как в остальных случаях *S. aureus* MFP03 росли по 72 или 96 ч, и их биомасса в значительной степени отмирала. Это подтверждается результатами окрашивания биопленок МТТ (рисунок 28). Суммарная метаболическая активность клеток в 24-часовых биопленках *S. aureus* MFP03 равнялась 1.9 и была выше, нежели в остальных вариантах (72 ч и 96 ч инкубации). Метаболическая активность бинарных биопленок так же, как и при 37°C, при 33°C оставалась меньшей, чем сумма активностей моновидовых биопленок, однако, разница между суммами активностей моновидовых пленок и активностями в бинарных биопленках была меньше, чем при 37°C. Особенно отчетливо это выражено в случае бинарных биопленок на основе предформированных биопленок *C. acnes* RT5 (ОП экстракта формазана из бинарных биопленок в среднем была равна 3, ОП моновидовых биопленок *S. aureus* MFP03 – 1.9, а *C. acnes* RT5 – 2.3). Это позволяет предполагать, что при 33°C *C. acnes* RT5 растут лучше в присутствии *S.*

aureus MFP03, чем при 37°C. А предформирование биопленки *C. acnes* RT5 делает их маловосприимчивыми к присутствию *S. aureus* MFP03. При этом сам *S. aureus* MFP03 при 33°C растет хуже в присутствии *C. acnes* RT5, нежели при 37°C.

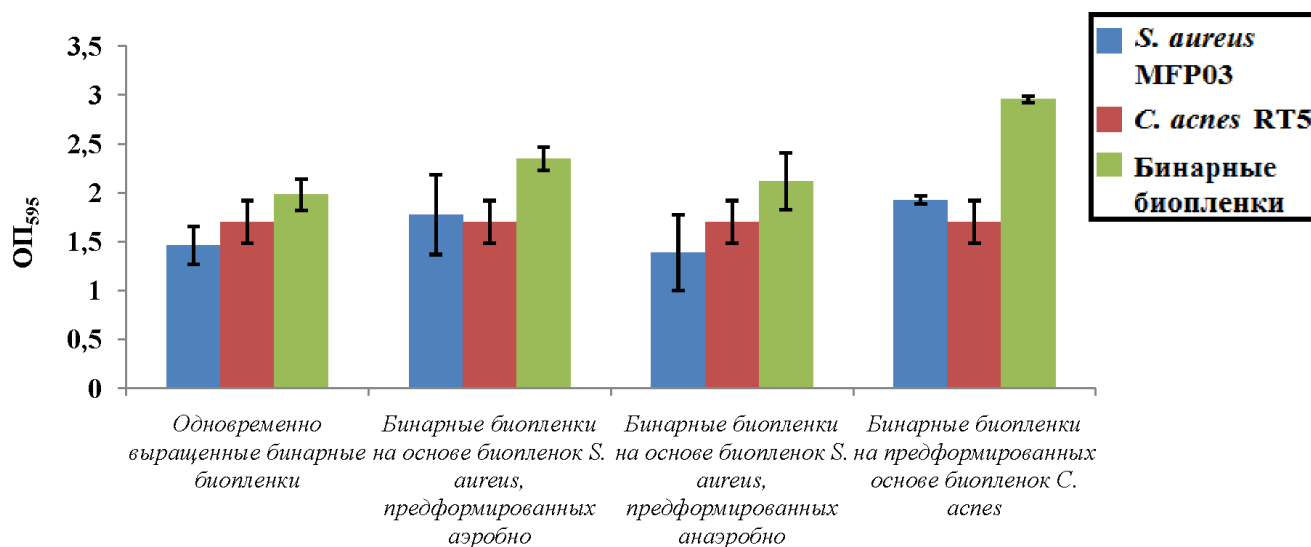


Рис. 28. Окрашивание МТТ моновидовых и бинарных биопленок *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5, выращенных при температуре 33°C.

3.6.2. Исследование влияния компонентов косметики на бинарные биопленки *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03

Биопленки выращивали при 33°C – естественной температуре некоторых участков кожи. В исследованиях использовали концентрации ТВУ (и, соответственно, ФР) 30% по объему, поскольку в данной концентрации они оказывали практически такой же эффект, как при 50% (данные не показаны). В ходе экспериментов было установлено, что число КОЕ *S. aureus* MFP03 в моновидовых биопленках значительно снижалось при добавлении ТВУ и ФР, что, видимо, связано с разбавлением среды (1.76×10^9 в контроле $1,2 \times 10^9$ и 1.1×10^9 при добавлении ТВУ и ФР, рис. 29). PS291® также понижал количество КОЕ в моновидовых биопленках (1.6×10^9), однако, эффект был не такой сильный, как в случае ТВУ.

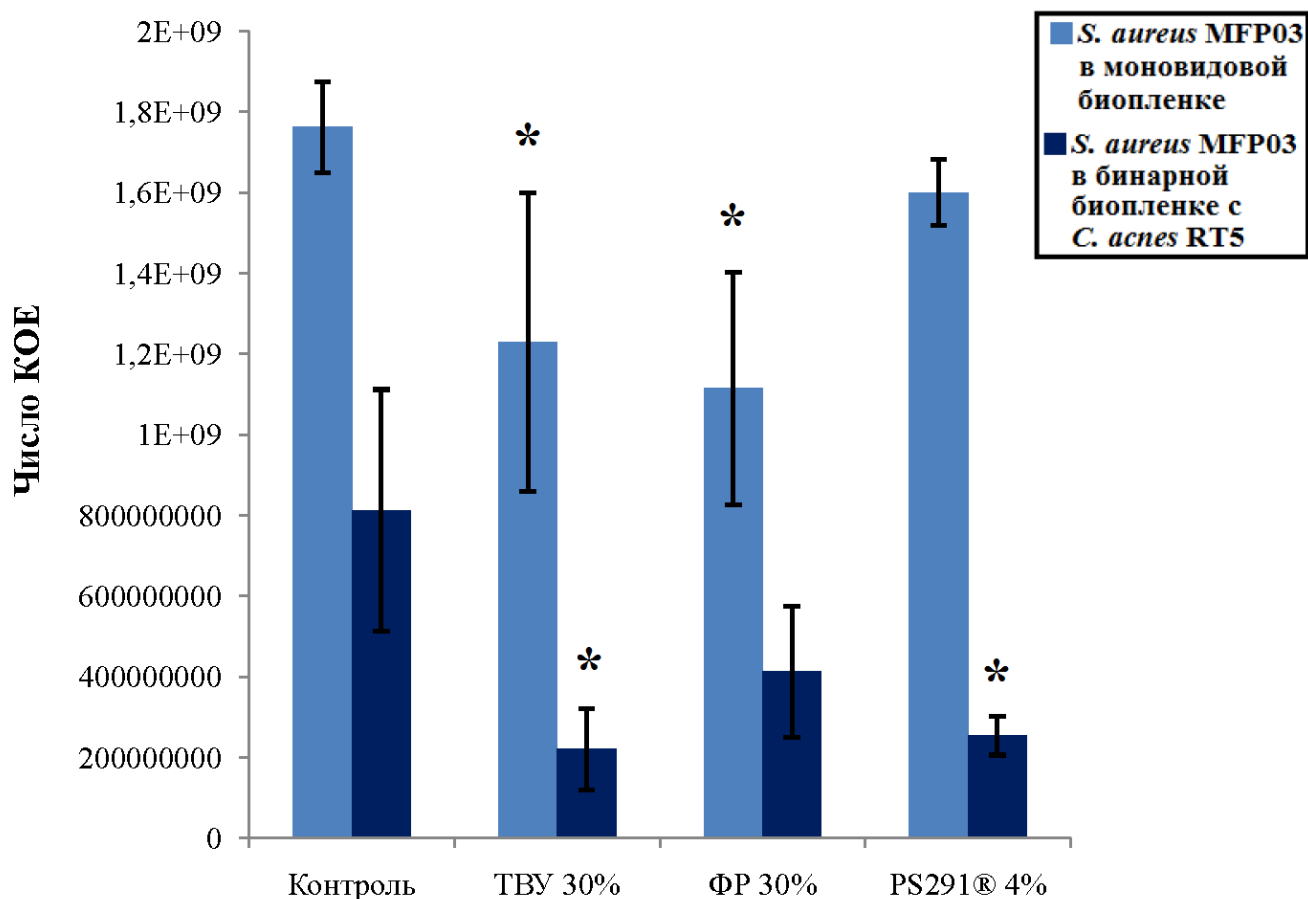


Рис. 29. Количество КОЕ *S. aureus* MFP03 в моновидовых и бинарных биопленках с *C. acnes* RT5 при добавлении ТВУ 30%, ФР 30%, PS291® 4%. * - различие достоверно при $p=0.05$.

В бинарных биопленках в контроле количество КОЕ *S. aureus* MFP03 было на в 2.15 раза ниже, чем в моновидовых (8.1×10^8). Добавление 30% ТВУ увеличивало разницу в количестве КОЕ *S. aureus* MFP03 между моновидовыми и бинарными биопленками до 5.6 раза (2.21×10^8 КОЕ *S. aureus* MFP03 в бинарной биопленке при добавлении ТВУ). ФР увеличивал разницу в числе КОЕ *S. aureus* MFP03 между моновидовыми и бинарными биопленками лишь до 2.7 раза. Сильнее всего увеличивало разницу в числе КОЕ добавление PS291®: в бинарных биопленках число КОЕ *S. aureus* MFP03 снижалось в 6.3 раза (до 2.54×10^8 по сравнению с моновидовыми). Результаты свидетельствуют о том, что компоненты косметических средств ослабляли конкурентные свойства *S. aureus* MFP03 в бинарной системе с *C. acnes* RT5. Данные выводы подтверждали результаты окрашивания биопленок МТТ (рис. 30).

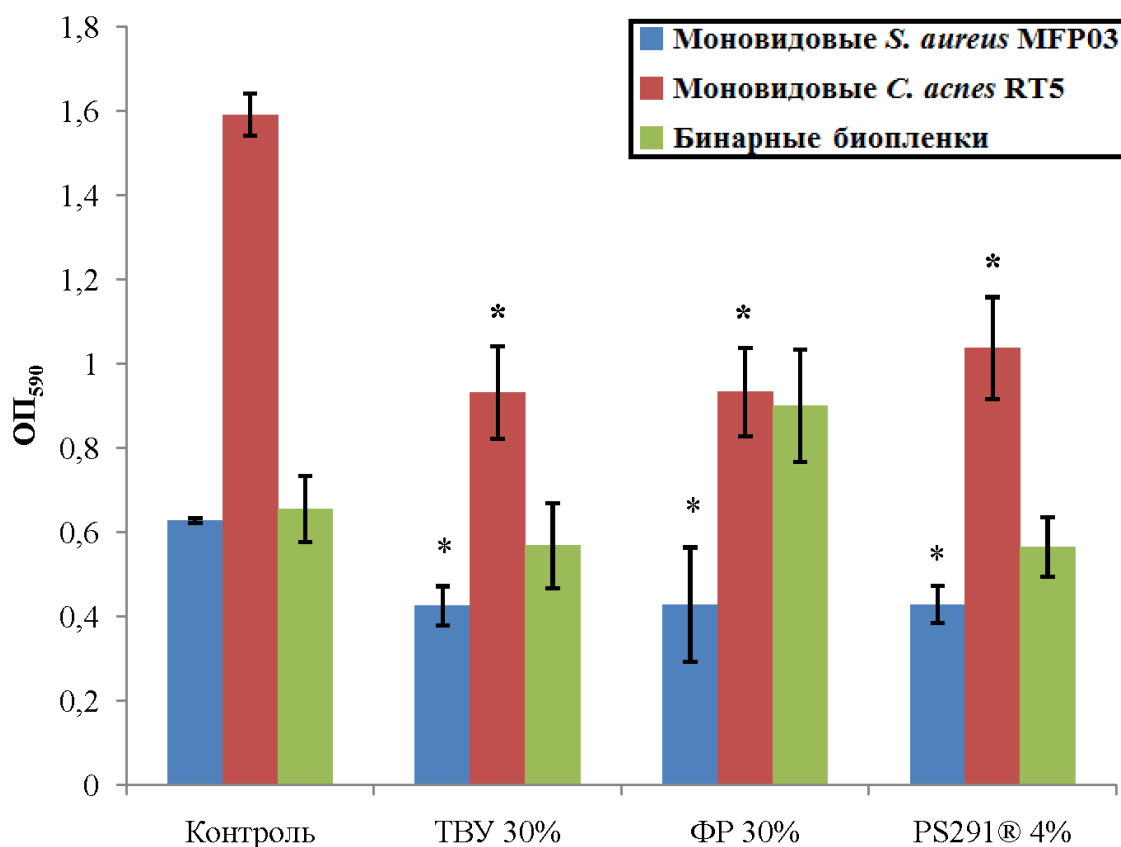


Рис. 30. Окрашивание МТТ моновидовых и бинарных биопленок *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03, выращенных в присутствии компонентов косметики. * - различие достоверно при $p=0.05$.

Оба компонента косметики и ФР снижали метаболическую активность (эквивалентную ОП экстракта формазана) моновидовых биопленок обоих микроорганизмов за счет сокращения числа КОЕ биопленок. В контроле метаболическая активность клеток в бинарных биопленках была практически на уровне моновидовых биопленок *S. aureus* MFP03, что говорит о доминировании *S. aureus*. Поскольку ТБУ и PS291® снижали конкурентное преимущество *S. aureus* в бинарных биопленках, метаболическая активность в бинарных биопленках в присутствии ТБУ и PS291® была также гораздо ниже, чем сумма активностей моновидовых биопленок, но выше, чем метаболическая активность моновидовых биопленок *S. aureus*: по-видимому, увеличивался прирост *C. acnes*. При добавлении ФР снижения конкурентных свойств *S. aureus* не происходило, однако, за счет того, что *S. aureus* рос хуже, чем в контроле, по-видимому, *C. acnes* приобретал преимущество и здесь. Из-за этих двух обстоятельств метаболическая активность бинарных биопленок была значительно выше, чем в контроле.

Таким образом, подводя промежуточный итог, можно сказать, что ТБУ и PS291® снижают не только количество биомассы биопленок, но и ослабляют конкурентные свойства *S.*

aureus MFP03, что может являться важным свойством данных соединений как потенциальных регуляторов кожной микробиоты.

3.6.3. Исследование влияния НУП на бинарные биопленки *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03

Исследовали НУП в концентрациях, оказывавших наибольший эффект на моновидовые биопленки при 33°C. Для ANP это 1×10^{-8} М, для CNP – 1×10^{-7} М.

3.6.3.1. Определение числа КОЕ и метаболической активности клеток в моновидовых и бинарных биопленках *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03 в присутствии НУП. В присутствии НУП число КОЕ *S. aureus* MFP03 снижалось в моновидовых биопленках: если в контроле оно достигало 1.76×10^9 , то в присутствии НУП оно понижалось до 1.64×10^9 и 7.58×10^8 (ANP и CNP соответственно, рис. 31).

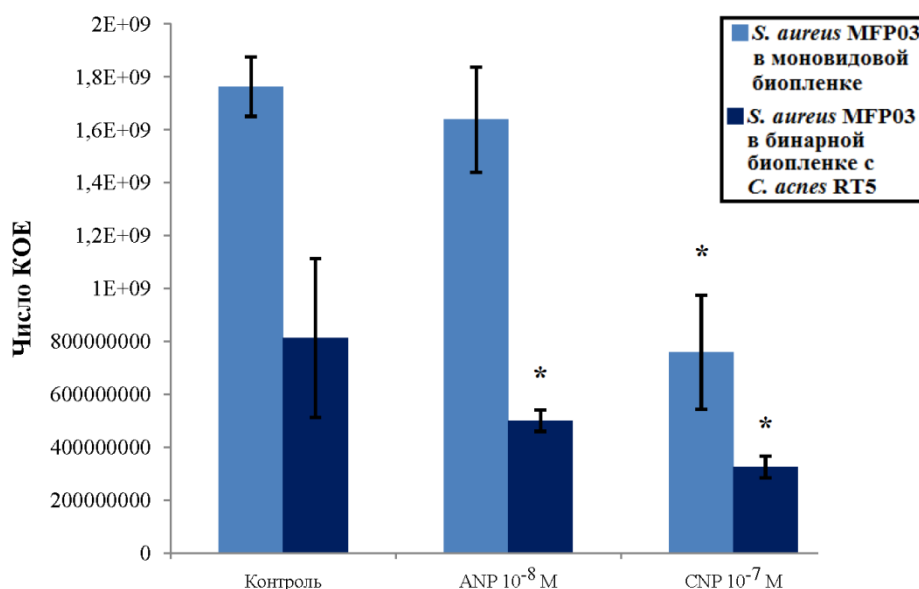


Рис. 31. Количество КОЕ *S. aureus* MFP03 в моновидовых и бинарных биопленках с *C. acnes* RT5 при добавлении НУП.

В бинарных биопленках в контроле количество КОЕ *S. aureus* MFP03 было на в 2.15 раза ниже, чем в моновидовых (8.1×10^8). Добавление ANP увеличивало разницу до 3.3 раз (число КОЕ *S. aureus* MFP03 в бинарных биопленках в присутствии ANP достигало 5×10^8). Добавление CNP не оказывало значимого эффекта на разницу в числе КОЕ *S. aureus* MFP03 в моновидовых и бинарных биопленках (в моновидовых биопленках оно было в 2.33 раза больше: 7.58×10^8 и 3.25×10^8 соответственно). Вероятно, это могло быть связано с сильным эффектом CNP на моновидовые биопленки, гораздо более выраженном, чем в случае ANP.

Результаты подсчета КОЕ коррелируют с результатами окраски биопленок МТТ (рис. 32). Интенсивность окраски МТТ (а, соответственно, и метаболическая активность) моновидовых биопленок *S. aureus* MFP03 снижается в присутствии пептидов (ОП контроля 0.63, в присутствии ANP и CNP – 0.52 и 0.47 соответственно). ОП экстрактов формазана из моновидовых биопленок *C. acnes* RT5 было выше, чем из биопленок *S. aureus*. НУП также оказывали подавляющий эффект: в контроле средняя ОП достигала 1.6, тогда как в присутствии ANP и CNP она была равна 1.3 в обоих случаях. Однако, ОП экстрактов формазана из бинарных биопленок в контроле и в присутствии ANP и CNP была практически одинакова: 0.65, 0.61 и 0.72 соответственно, что, как и в разделе с компонентами косметики, свидетельствует о доминировании *S. aureus* MFP03 в бинарных биопленках. Однако, поскольку ОП бинарных биопленок в присутствии НУП практически не изменялась при уменьшении это свидетельствует также свидетельствует о сдвиге баланса в бинарной биопленке в сторону *C. acnes*.

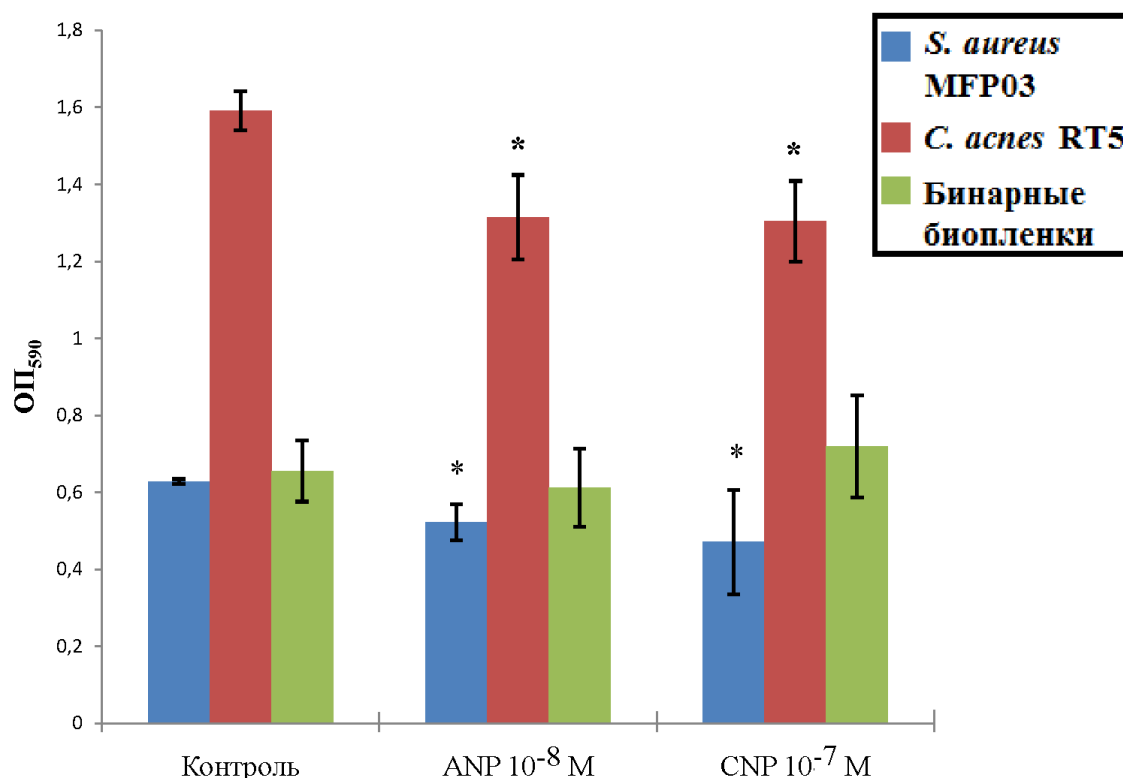


Рис. 32. Окрашивание МТТ моновидовых и бинарных биопленок *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03, выращенных в присутствии НУП. * - различие достоверно при $p=0.05$.

Таким образом, НУП оказывают аналогичное ТВУ и PS291® действие: увеличивают конкурентное преимущество *C. acnes* в бинарных биопленках.

3.6.3.2. Исследование бинарных биопленок *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03 в присутствии НУП при помощи FISH. При помощи методики FISH и КЛСМ исследовали пространственную

структуру и количественное соотношение биомассы *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03 в бинарных биопленках. Поскольку подсчет КОЕ *C. acnes* RT5 не давал бы корректных результатов, метод FISH, совмещенный с КЛСМ, позволил восполнить пробел информации и точно определить эффект НУП на соотношение микроорганизмов в бинарной биопленке. На рисунке 40 представлен пример окрашивания биомассы *C. acnes* RT5 флуоресцентным зондом (рисунок 40-А), тотальной биомассы (рисунок 40-Б) и комбинированного двухцветного изображения (рисунок 40-В).

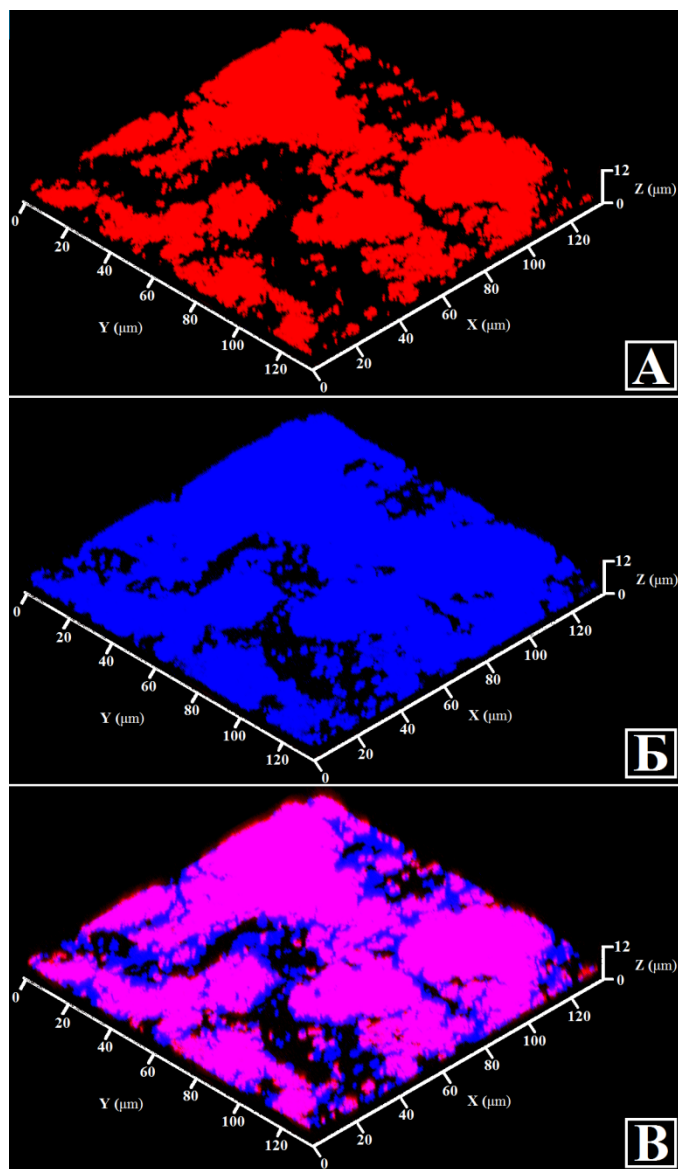


Рис. 33. Пример КЛСМ бинарных биопленок *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03, . А – биомасса *C. acnes* RT5, меченная специфичным зондом, Б – тотальная биомасса бинарной биопленки, окрашенная DAPI, В – комбинированное изображение.

Предварительно произвели проверку специфичности окрашивания биомассы *C. acnes* зондом. Для этого моновидовые биопленки *S. aureus* подвергали процедурам окраски в

условиях, специфичных для гибридизации зонда в клетках *C. acnes*. Специфичность окраски зондом для *C. acnes* была на уровне 100%: неспецифического окрашивания клеток *S. aureus* не происходило (данные не показаны). На рис. 33 показан пример смешанной окраски бинарных биопленок.

Исследовали те же концентрации НУП, что и в опытах по подсчету КОЕ. Во всех исследованных типах бинарных биопленок добавление обоих НУП увеличивало долю биомассы *C. acnes* RT5 (см. рис. 34 и рис. 15П в приложении). В одновременно формируемых биопленках в контроле плотность тотальной биомассы, окрашиваемой DAPI, была равна в среднем $2.93 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$. При добавлении ANP и CNP она была равна в среднем 2.87 и $3.06 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$ – изменений тотальной биомассы не следовало. При этом плотность биомассы *C. acnes* RT5 в контроле и при добавлении ANP и CNP была равна 0.36, 0.85 и $0.54 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$ соответственно: процентная доля биомассы *C. acnes* RT5 увеличивалась до 31 и 18% при добавлении ANP и CNP соответственно (в контроле – 12%, рис. 34-А, рис. 15П-А-В). Т.е. при одинаковом количестве биомассы прирост *C. acnes* RT5 в присутствии пептидов увеличивается. Это коррелирует с результатами опытов по подсчету КОЕ и окрашиванию биопленок МТТ.

В бинарных биопленках, выращенных на основе предформированных биопленок *S. aureus* MFP03 наблюдали сходную картину (рис. 34-Б, рис. 15П-Г-Е). В контроле средняя плотность тотальной биомассы была $2.9 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$. При добавлении ANP и CNP плотность тотальной биомассы была 3.1 и $0.8 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$. Резкое уменьшение плотности биомассы при добавлении CNP коррелирует с уменьшением числа КОЕ *S. aureus* MFP03, что свидетельствует о сильном эффекте CNP. При этом плотность биомассы *C. acnes* составляла 0.61, 1.25 и $0.29 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$ в контроле, при добавлении ANP и при добавлении CNP соответственно, таким образом, процентная доля биомассы *C. acnes* RT5 была равна 21%, 61.2% и 36.3% соответственно. Поверхность биопленки *S. aureus* MFP03 обладает, по-видимому, свойствами, благоприятными для адгезии клеток *C. acnes* RT5, что выражается в более высокой доле биомассы *C. acnes* в бинарной биопленке. И уменьшение количества биомассы *S. aureus* ведет к уменьшению биомассы *C. acnes*.

Наконец, в бинарных биопленках на основе предформированных биопленок *C. acnes* преимущество *C. acnes* было выражено еще сильнее. Плотность тотальной биомассы биопленок в контроле и при добавлении ANP и CNP была равна 2.7, 2.9 и $3.4 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$. При этом биомасса *C. acnes* RT5 была равна 1.53, 2.02 и $2.64 \text{ мкм}^3/\text{мкм}^2$ соответственно, а ее процентная доля – 55.0%, 68.2% и 74.5% соответственно (рис. 34 и 15П-Ж-И). Тотальная биомасса биопленки даже увеличивалась в присутствии НУП за счет увеличения биомассы *C. acnes* RT5. При этом поверхность биопленки *C. acnes* RT5 не является удобным местом для адгезии клеток *S. aureus* MFP03, если сравнить с биопленками на основе предформированных биопленок *S.*

aureus. Таким образом, в сравнении с контролем во всех случаях наблюдали значимое увеличение доли биомассы *C. acnes*.

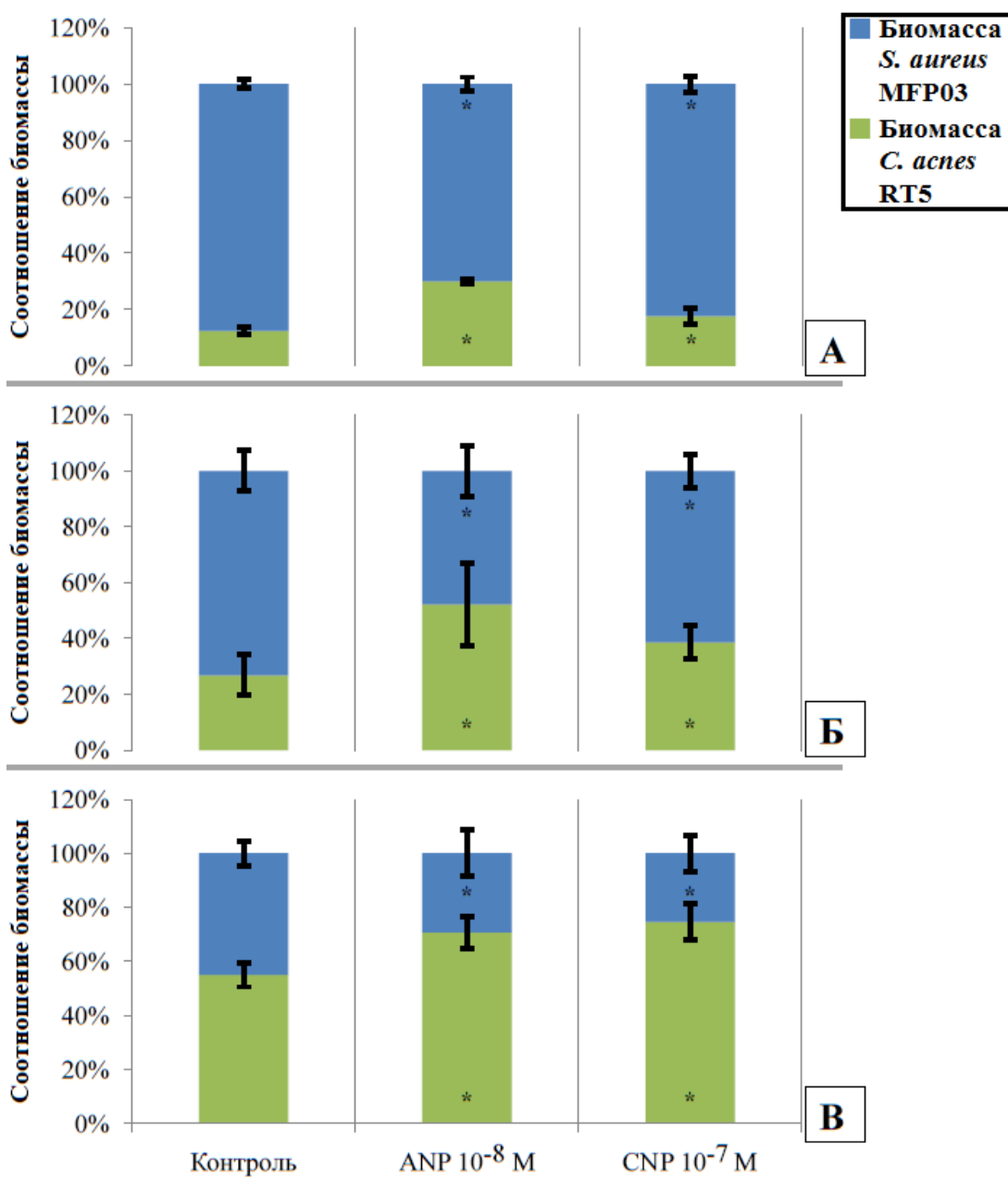


Рис. 34. Соотношение количества биомассы *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03 в бинарных биопленках, окрашенных по методике FISH. А – одновременно сформированные биопленки; Б – биопленки на основе предформированных биопленок *S. aureus* MFP03; В – биопленки на основе предформированных биопленок *C. acnes* RT5. * - различие достоверно при $p=0.05$.

Таким образом, факт усиления конкурентных свойств *C. acnes* в присутствии НУП был подтвержден разными методами.

3.6.4. Protein-BLAST-исследование

Проанализировав базы данных NCBI библиотек секвенированных последовательностей коллекционных штаммов, мы обнаружили, что N-ацетомурамоил-L-аланинамидаза *C. acnes* (NCBI reference sequence: WP_042852295.1) обладает 69% гомологии с регулятором амидазного оперона AmiC *P. aeruginosa* PAO. Также, амидаза Propionibacteriaceae (NCBI reference sequence WP_002530699.1) обладает 50% гомологией с субъединицей GatA аспартат-тРНК/глутамат-тРНК-амидотрансферазы *S. aureus* (NCBI reference sequence WP_072460603.1). Эти ферменты катализируют одну и ту же реакцию – разрыв связи между углеродом и азотом, но в разных клеточных процессах: регулятор амидазного оперона AmiC у *P. aeruginosa* (косвенно) и амидаза *C. acnes* (напрямую) участвуют в клеточном цикле и контроле образования клеточной стенки, тогда как амидотрансфераза *S. aureus* косвенно вовлечена в обмен аминокислот и синтез белков. С одной стороны это позволяет предполагать, что потенциально амидаза *C. acnes* и амидотрансфераза *S. aureus* также являются рецепторами НУП человека. С другой стороны, разные функции этих белков могут служить причиной столь разного поведения микроорганизмов в присутствии НУП.

3.7. Исследование биохимического состава матрикса биопленок *C. acnes* RT5

3.7.1. Получение матрикса *C. acnes* RT5

После центрифугирования матрикс разделялся на две условные фазы (рис. 35-Б): прозрачную верхнюю фазу, окрашенную в буроватый цвет (за счет порфиринов) и мутную нижнюю фазу. Оптические плотности верхней и нижней фаз матрикса были равны в среднем 0.1 и 1.2 при длине волны 490 нм.

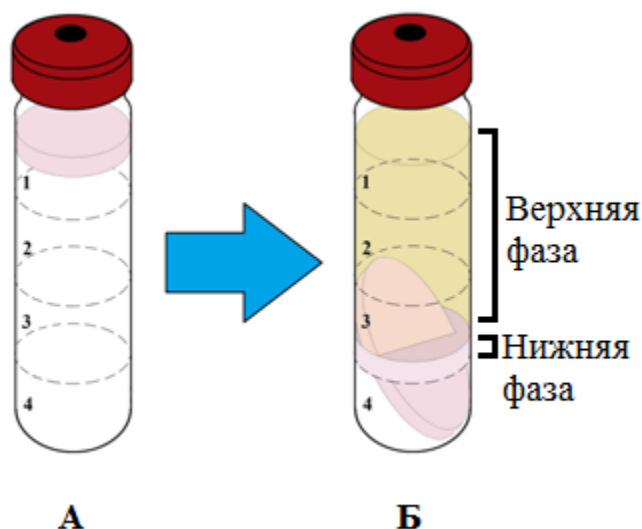


Рис. 35. Центрифугирование обработанной биомассы *C. acnes* RT5 в угловом роторе. А – построение градиента и внесение биомассы. Б – фазы матрикса после разделения и пеллета клеток. 1,2,3,4 – растворы CsCl (см. таблицу 5).

При определении потенциальной ЛДГ-активности в образцах обеих фаз матрикса при оптических плотностях (0.1 для верхней и 0.9 для нижней фазы) ОП образывавшегося формазана составляла порядка 0.05 при длине волны 490 нм. В образцах суспензий интактных клеток с теми же оптическими плотностями ОП формазана была равна 0, а в образцах суспензий клеток, обработанных лизирующим буфером – порядка 0.1. При этом видимое невооруженным глазом покраснение (образование формазана) наблюдали только при высокой концентрации интактных клеток в суспензии (ОП₄₉₀ порядка 1.5). Это говорит о том, что у клеток *S. acnes* RT5 активность ЛДГ была низкой. В процессе роста биопленок часть клеток лизируется, и их содержимое оказывается в матриксе, что объясняет несколько отличный от нуля уровень активности ЛДГ. Дополнительное разрушение клеток несколько повышает выход фермента из клеток, что находит отражение в слабом повышении активности.

Чтобы доказать, что в процессе подготовки биомассы для отделения матрикса клетки не разрушаются, провели серию экспериментов по определению ЛДГ активности в препаратах клеток, подвергнутых различным процедурам разрушения, в сочетании с микроскопической детекцией разрушения клеток. Во всех случаях (см. пункт 2.2.5.4) активность ЛДГ оставалась примерно на уровне 0.1, что говорит об отсутствии разрушения клеток даже в условиях жесткой обработки лизоцимом и ультразвуком в сочетании с абразивным материалом (стеклянные бусинки). Это подтверждалось и микроскопией обработанных образцов. Клетки не только не разрушались, но не разрушались даже их агрегаты (см. приложение, рис. 16П-А-В). Агрегаты клеток удалось полностью разрушить лишь при самых жестких условиях обработки биомассы – обработке лизоцимом, лизирующим буфером и ультразвуком в присутствии стеклянных бусин (рис. 16П-Д). В отсутствие бусин агрегаты также разрушались, но не до конца (рис. 16П-Г).

3.7.2. Количественное соотношение основных компонентов матрикса *S. acnes* RT5

Количественными биохимическими методами было установлено соотношение основных классов соединений, выделяемых с помощью использованной методики (рис. 36 и 37). Процентное соотношение классов соединений рассчитывали с учетом определения белка по Бредфорду. Большую часть выделяемого по данной методике матрикса составляли углеводы. В верхней прозрачной фазе после гидролиза количество редуцирующих сахаров было в среднем 3.7 мг/мл (64.3% всего органического вещества фазы), в нижней – 1.44 мг/мл (39.9% всего органического вещества фазы). С учетом объема фаз (верхняя – 12 мл, нижняя – 3 мл), всего из матрикса выделяли 3.2 мг/мл редуцирующих сахаров (54.2% от всего органического вещества фазы), что с учетом общего объема матрикса равно 48 мг на 1-2 см³ сырой биомассы. В

образцах без предварительного гидролиза количество редуцирующих сахаров в верхней фазе составляло 2.9 мг/мл, в нижней – 1.1 мг/мл. Средняя концентрация на весь объем раствора матрикса составляла 2.55 мг/мл, ниже, чем в гидролизованных образцах, но не намного. Этому может быть несколько причин. Во-первых, причиной этому может быть большое количество моно- или олигомерных соединений и малое количество гликополимеров, которые, распадаясь, дают малое дополнительное количество олиго- и мономеров. Во-вторых, этому может быть причиной малая эффективность гидролиза.

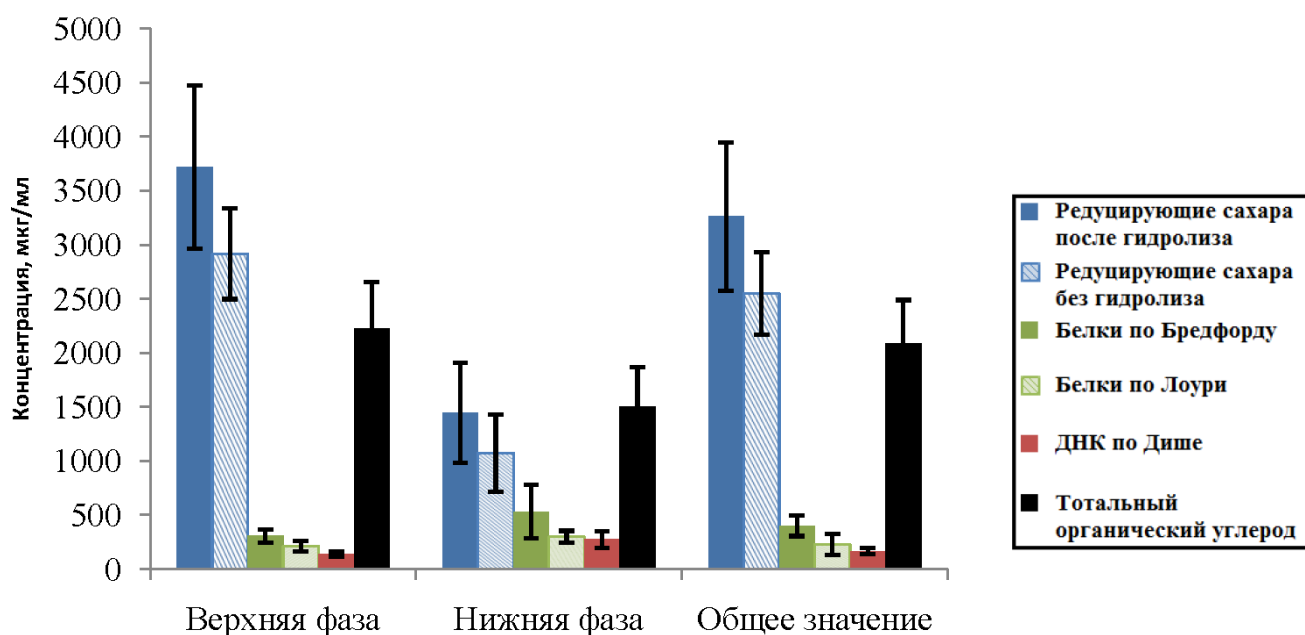


Рис. 36. Концентрации основных классов соединений, выделенных из матрикса *S. acnes* RT5.

На втором месте по количеству вещества в матриксе – вещества белковой природы. Пептиды определяли двумя методами – по Бредфорду и по Лоури. Более чувствительным и эффективным методом оказался метод Бредфорда: в верхней фазе этим методом была определена концентрация белков, равная 307.6 мкг/мл (5.8% от всего органического вещества фазы), а в нижней фазе – 531.8 мкг/мл (20.3% от всего органического вещества фазы). Обобщенная же концентрация белков по Бредфорду в матриксе составляла 401.4 мкг/мл (11,9% от общего количества органического вещества). Таким образом, общая масса белков по Бредфорду в выделяемом матриксе составляла около 6 мг на 1-2 см³ сырой биомассы. Метод Лоури оказался менее чувствительным, в верхней и нижней фазах концентрация белка по Лоури составила 211.9 и 298.2 мкг/мл, а средняя общая концентрация – 229.1 мкг/мл. Общее число белков в выделяемом матриксе, определяемых по методу Лоури, составило 3.4 мг на 1-2 см³ сырой биомассы, что почти в 2 раза меньше, чем по методу Бредфорда. Однако, оба метода

выявили схожую тенденцию: в нижней фазе матрикса концентрация белков была выше, чем в верхней. Вероятно, внизу скапливались тяжелые крупные белки (ферменты и другие). Однако, несмотря на высокую концентрацию белков в нижней фазе, при пересчете на объем каждой фазы, доля тяжелых белков в матриксе составляла около 35%, а легких – 65% (если отталкиваться от определения белка по Бредфорду).

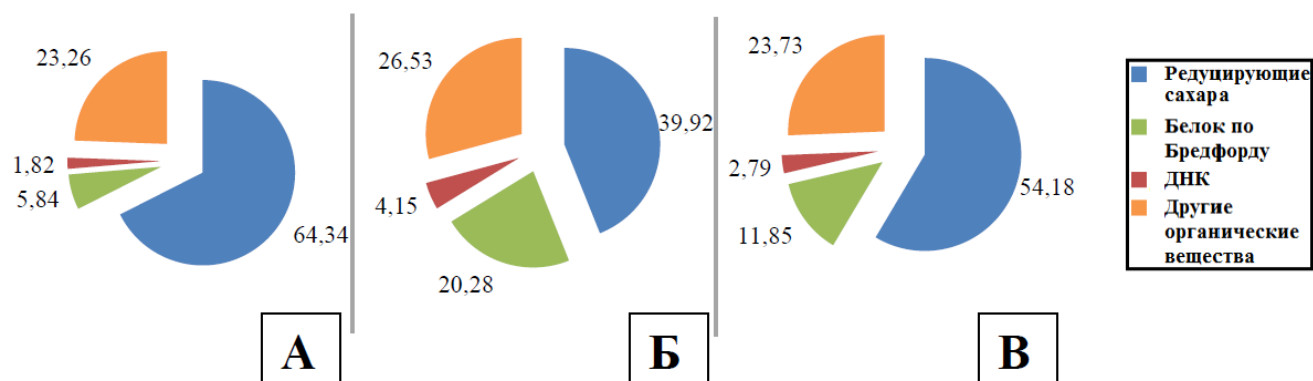


Рис. 37. Процентное соотношение основных классов соединений, выделенных в составе матрикса *C. acnes* RT5. А – верхняя фаза, Б – нижняя фаза, В – всего.

Концентрация ДНК в выделяемом матриксе составляла в верхней фазе 139.8 мкг/мл (1.8% от всего органического вещества фазы), в нижней – 274.9 мкг/мл (4.15% от всего органического вещества фазы). Общая средняя концентрация выделяемой ДНК из матрикса была равна 166.8 мкг/мл (2.79% от общего количества органического вещества), а, соответственно, общее количество выделяемой ДНК матрикса было равно 2.5 мг на 1-2 см³ сырой биомассы. Данные по количеству ДНК говорят о том, что был выделен именно матрикс, а не суспензия разрушенных клеток. Это видно из сравнения количества ДНК, выделяемой из разрушенных клеток *E. coli* по стандартной методике получения плазмидной ДНК, и количества ДНК из биомассы *C. acnes* RT5. При объеме пеллеты, на порядок меньшем, чем объем биомассы биопленок *C. acnes* RT5, только ДНК из мульткопийной плазмиды pTetONCFPOpt (Sastalla et al., 2009) трансформированного штамма *E. coli* выделялась в количестве до 100 мкг/мл (данные не показаны).

Общее количество органического углерода подсчитывали методом мокрого сжигания в смеси бихромата калия с серной кислотой. При калибровке использовали стандартные растворы глюкозы и, зная массовую долю углерода в глюкозе, определяли зависимость между поглощением света конечным раствором и концентрацией органического углерода. Выяснили, что в верхней фазе концентрация углерода была равна в среднем 2.2 мг/мл, в нижней – 1.5 мг/мл, а средняя общая концентрация углерода, выделяемого из матрикса, была равна 2.1 мг/мл (31.5 мг органического углерода на 1-2 см³ сырой биомассы биопленок *C. acnes*). На основе

этого установили, что в матриксе, выделяемым по нашей методике, 23.7% органического углерода входит в состав соединений, не определяемым по методикам определения белков, ДНК или редуцирующих сахаров (рисунок 45). Сюда, по-видимому, относятся порфирины и интермедиаты их синтеза и прочие метаболиты. В результате качественной реакции было выявлено большое количество α -аминолевулиновой кислоты в растворе матрикса (данные не показаны).

3.7.3. Анализ тотального протеома матрикса *C. acnes* RT5 при помощи масс-спектрометрии методом орбитальной ловушки

Масс-спектрометрический анализ протеома матрикса биопленок *C. acnes* RT5 показал наличие в матриксе 447 различных белков. 40 белков были характерны только для верхней фазы а 107 – только для нижней (см. табл. 1П в приложении). Однако, подобное различие скорее всего не имеет значения, поскольку нет четкой привязки наличия белка в той или иной фазе матрикса к его молекулярной массе. Много белков, обнаруженных в матриксе, были доменами в составе более сложных белков или белковых комплексов (рибосомные белки, каталитические домены и т.д.). Наличие большого числа ферментов, катализирующих различные процессы, в том числе внутриклеточные, может быть логическим следствием естественного аутолиза клеток, которые имеет место в процессе роста и развития биопленки. То же самое, вероятно, относится и к неферментным белкам. Были обнаружены протеазы, нуклеазы, ферменты метаболизма сахаров, липидов, а также 48 белков неизвестного назначения и 43 рибосомных белка различной массы (точно определенных и возможных). Можно предполагать их возможные роли в организации матрикса, патогенности биопленок, однако, необходимы более глубокие исследования каждого компонента для четкого понимания функций тех или иных белков в матриксе.

Если говорить более конкретно о протеоме матрикса, то следует отметить ряд наиболее важных моментов. Обе фазы содержали в большом количестве шаперонин GroL – белок, вовлеченный в подготовку белков стрессового ответа. В *E. coli* он обычно локализуется в цитозоле, однако, иногда встречается и в мембранах (Li, Young, 2012). Возможно, исходя из его функциональной роли, он участвует в организации белкового каркаса биопленочного матрикса, однако, эта гипотеза спекулятивна и нуждается в подтверждении. Затем, обнаружены три белка семейства DoxX, длиной в 270, 210 и 133 аминокислотных остатка. DoxX-белки входят в одноименное семейство, включающее также трансмембранные белки неизвестного назначения. Есть предположение, что они вовлечены в регуляцию баланса Na в нервных клетках (Tran et al., 2010).

Неясными остаются функции белков DohX-семейства и в биопленках *C. acnes* RT5. Каталитический компонент матрикса представлен разнообразно. Например, в матриксе биопленок обнаружено несколько гидролаз различных субстратов (сахара, белки, нуклеотиды, липиды). В частности, в матриксе присутствовали две целлюлазы, другая гликозилгидролаза, нуклеазы, амидогидролазы, которые могут играть роль в формировании биопленок и потреблении различных субстратов в коже человека. Эти ферменты также могут быть факторами вирулентности, расщепляя компоненты окружающих тканей в комедонах. Особенно стоит отметить глицерофосфодиэстерфосфодиэстеразу – фермент метаболизма липидов, который может быть важен для образования биопленок *C. acnes* и их патогенности в коже. Возможная NAD-гидролаза, обнаруженная в матриксе, также может быть вовлечена в расщепление липидов, поскольку в данном случае функция ее неизвестна, а в целом NAD-семейство включает в себя и липазы (Sarañós-Martín et al., 2013). Также, в липидный обмен могут быть вовлечены и другие возможные гидролазы, обнаруженные в матриксе. Помимо гидролаз, в матриксе *C. acnes* RT5 обнаружено еще множество ферментов различных внутриклеточных процессов: катаболизма сахаров, транскрипции и трансляции, клеточного цикла, синтеза аминокислот и др. Обнаружены факторы инициации, элонгации и терминации транскрипции и трансляции (см. табл. 13 в приложении). Отдельно стоит упомянуть каталазу и супероксиддисмутазу, найденные в матриксе и, возможно, участвующих в защитных реакциях на окислительный стресс у анаэробных *C. acnes*, что теоретически может увеличивать сопротивляемость биопленок *C. acnes* неблагоприятным факторам среды.

Интересно, что матрикс *C. acnes* RT5 содержал возможный стрептолизин-ассоциированный белок SagB, имеющий длину 343 аминокислот (для сравнения, SagB *Streptococcus pyogenes* состоит из 315 аминокислот (AF067649, <https://www.uniprot.org>)). У рода *Streptococcus* SagB является цитоплазмной циклодегидрогеназой, которая вовлечена в посттрансляционный процессинг стрептолизина SagA с использованием флавинмононуклеотида в качестве акцептора электронов (Molloy et al., 2011). Вероятно, у *C. acnes* RT5 этот возможный белок вовлечен в схожий с таковым у *Streptococcus* процесс подготовки другого возможного гемолизина, важного для патогенности *C. acnes* и его биопленок. Интересно, что в нижней фазе матрикса обнаружен возможный белок FliS – шаперон, участвующий в сборке жгутиков у разных подвижных бактерий (Altegoer et al., 2018). Роль FliS у неподвижных *C. acnes* дискуссионна, однако, возможно, данный белок имеет другие функции, к примеру, связанные напрямую со сборкой каркасных компонентов матрикса биопленок. Гипотезы о ролях белков спекулятивны и нуждаются в дальнейшем экспериментальном подтверждении.

Можно предполагать, что в матриксе также обнаружены CAMP-факторы *C. acnes*, входящие в состав группы гипотетических белков. Гипотетический белок HMPREF9571_02536 имеет более 99% схожести с CAMP-1 фактором других штаммов *C. acnes* (в соответствии с данными базы Uniprot (<https://www.uniprot.org>) и NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)). Он состоит из 285 аминокислот и обладает массой 30.394 кДа. Также, сразу два гипотетических белка HMPREF9571_00078 и HMPREF9571_02289 обладают высокой схожестью с CAMP-3 фактором *C. acnes*: они длиной 271 аминокислот и обладают массой 29.1 и 29.25 кДа соответственно. Ряд других гипотетических белков также, возможно, являются CAMP-факторами.

3.7.4. Поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия матрикса *C. acnes* RT5

При анализе SERS-спектров выделенного матрикса в сравнении с биомассой до и после выделения матрикса показал было выявлено более 40 выраженных пиков (см. табл. 2П в приложении и рисунок 38). Различия в пиках и их интенсивности служат еще одним доказательством того, что был выделен именно матрикс биопленок. Различия устанавливали при помощи автоматической программной обработки и сравнения высоты пиков на графике, различными считали пики, различавшиеся по высоте в два и более раза.

Графически пики изображены на рис. 38. Спектр каждого образца строили на графике со смещением по оси ординат, чтобы избежать наложения спектров. Получены профили спектров тотальной биомассы биопленок и спектров матрикса *C. acnes*, которые войдут в базу данных SERS-спектров микроорганизмов. Спектры в будущем будут применяться их для идентификации *C. acnes* в сложных биологических объектах и образцах при помощи SERS. Таким образом, можно заметить, что SERS-спектроскопия сама по себе является достаточно мощным инструментом обнаружения наиболее широко представленных в матриксе биопленок соединений. Однако, более полную картину, несомненно, необходимо строить при помощи сочетания SERS и других методов. Также, на сегодняшний день слабым местом SERS является отсутствие большой базы данных по спектрам органических полимеров, что сильно затрудняет анализ.

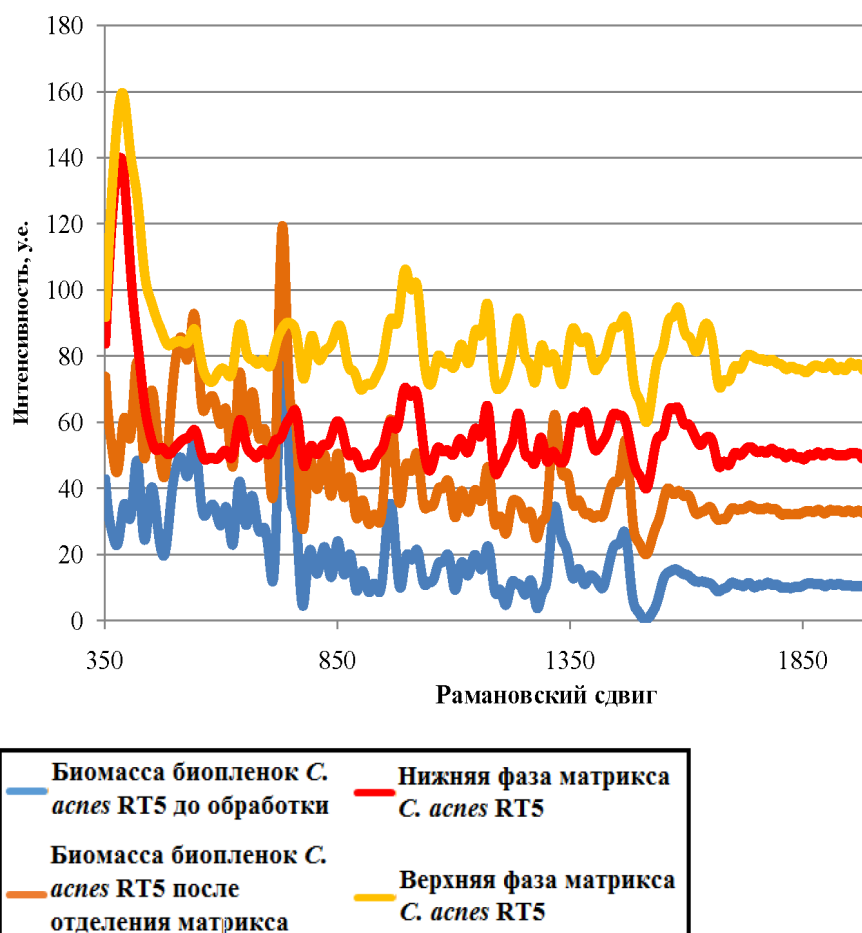


Рис. 38. SERS-спектры биомассы биопленок *C. acnes* RT5 и их матрикса.

ГЛАВА 4. Обсуждение

Микробные биопленки, будучи основной формой жизни микроорганизмов в природных экотопах и в организме человека, постоянно подвергаются воздействию неблагоприятных факторов. Это могут быть физические, химические или биологические воздействия. Человек в ходе своей жизни и хозяйственной деятельности постоянно сталкивается с биопленками микроорганизмов и оказывает на них прямое или косвенное влияние. В области здравоохранения человек имеет дело, как правило, с биопленками патогенных, условно-патогенных и симбиотических микроорганизмов. Большинство исследований посвящено биопленкам первых двух типов, т.к. биопленки патогенных и условно-патогенных микроорганизмов являются причиной хронических инфекций (Ножевникова с соавт., 2015) и разного рода осложнений. Много работ посвящено исследованию влияния антибиотиков на биопленки патогенных микроорганизмов, в частности, *C. acnes* (Furustrand Tafin et al., 2012; Crane et al., 2013) и *S. aureus* (Bhattacharya et al., 2015; Schilcher et al., 2016). Показан, к примеру, ингибиторный эффект азитромицина на рост биопленок *S. aureus* (Wu et al., 2010; Gui et al., 2014; Majidpour et al., 2017), множество работ посвящено псевдомонадам (Gillis, Iglewski, 2004;

Phelan et al., 2015; Das et al., 2016; Li et al., 2017; Saini et al., 2017) и воздействию антибиотиков на их биопленки. Однако, в связи с увеличивающимся с каждым годом числом устойчивых к антибиотикам штаммов (Magiorakos et al., 2012), в том числе в составе биопленок (Плакунов с соавт., 2010)), все большую актуальность для фундаментальной науки и медицины приобретает поиск соединений, не являющихся антибиотиками, но способных влиять на рост биопленок (усиливать его в случае симбионтных микроорганизмов или подавлять в случае патогенов). Такими соединениями, в частности, могут быть косметические средства или их компоненты нарушающие или стимулирующие рост биопленок (масло цимбопогона (Aiemsraad et al., 2011), апельсиновое масло (Federman et al., 2016) и др.), а также лекарственные препараты, которые ранее не использовались в терапии бактериальных инфекций (такие как противогельминтный препарат никлозамид (Журина с соавт., 2017) и 4-гексилрезорцин, противоопухолевое соединение и по совместительству пищевая добавка и антисептик (Lee et al., 2013)). К этому типу относятся собственные продукты организма человека, такие как гормоны (адреналин (Tiwari et al., 2018), норэпинефрин (Pillai et al., 2018), дофамин, инсулин, эстроген (Feraco et al., 2016) и др.) или другие соединения (нейропептиды – вещество P, нейропептиды Y и др., Augustyniak et al., 2012), которые, не будучи напрямую вовлеченными в борьбу с бактериями и их биопленками, могут оказывать на них регуляторное воздействие. В данной работе проведены исследования влияния ряда упомянутых соединений на микроорганизмы. Проверено воздействие азитромицина на *P. chlororaphis* 449, никлозамида как перспективного антибиопленочного агента на ряд кожных микроорганизмов, а также его сочетания с азитромицином на *S. aureus* 209P. На примере биопленок кожных *C. acnes*, *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 исследованы эффекты косметических средств PS291® и TBY, а также натрийуретических пептидов человека ANP и CNP. Исследованы также регуляторные воздействия косметических средств и НУП на бинарные биопленки *C. acnes*, *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04. Предварительно, были исследованы взаимодействия микроорганизмов в бинарных биопленках без добавления активных соединений. Отдельным, но при этом связанным с остальными частями, разделом работы было изучение химического состава матрикса *C. acnes* RT5 – впервые проведенное нами приоритетное исследование, которое позволило получить данные о составе и соотношении компонентов матрикса. Эти данные важны с точки зрения как фундаментальной науки, так и прикладных ее областей – зная состав матрикса, можно подбирать те или иные соединения, которые будут способны разрушать его, а также можно регулировать процессы его синтеза, воздействуя на микроорганизмы.

Работа с *P. chlororaphis* 449 и его генетически модифицированными штаммами была обусловлена рядом причин. Во-первых, *P. chlororaphis* – это ризосферный сапротрофный микроорганизм, родственник условно-патогенным штаммам псевдомонад, обитающим в том

числе на коже человека, таким как *P. aeruginosa* и *P. fluorescens* (Mishra et al., 2009; Hesse et al., 2018), что делает его удобным и безопасным объектом для моделирования процессов, происходящих у патогенных микроорганизмов. Во-вторых, в литературе в настоящее время накоплен большой объем данных касательно действия антимикробных соединений на рост биопленок *P. aeruginosa*, в частности, азитромицина (Tan et al., 2016; Li et al., 2017; Bahari et al., 2017), но при этом очень мало работ посвящено *P. chlororaphis*. Таким образом, изучение воздействия антибиотиков на *P. chlororaphis* 449 актуально тем, что показывает общебиологический характер явления стимуляции антибиотиками формирования биопленок. Это исследование имеет большое значение для понимания фундаментальных процессов, происходящих при формировании биопленок, и взаимодействии микроорганизмов с неблагоприятными факторами окружающей среды.

Главной задачей работы с *P. chlororaphis* являлось изучение влияния мутаций, повреждающих регуляторные системы микроорганизма, на характер воздействия азитромицина на планктонные культуры и биопленки *P. chlororaphis* штаммы 449 и 66. Антибиотик использовали как биохимический инструмент (ингибитор синтеза белка, взаимодействующий с 50S субъединицей рибосомы). У штамма дикого типа *P. chlororaphis* 449 биопленки оказались значительно устойчивее к азитромицину, чем планктонные клетки: при концентрациях этого антибиотика, подавлявших рост планктонной культуры на 50%, рост биопленок увеличивался в 1.5-1.6 раза. Эффект стимуляции формирования биопленок проявлялся и при концентрациях азитромицина, не влиявших на рост планктонной культуры (0.1 мкг/мл), а, следовательно, он прямо не связан со способностью антибиотика ингибировать синтез белка. Стимуляция роста биопленок в присутствии низких концентраций антибиотика имеет важное практическое значение, поскольку может приводить к серьезным осложнениям при химиотерапии инфекций в случае несоблюдения длительности лечения или снижения эффективных доз антибиотика. С другой стороны, выяснение механизма стимуляции может помочь создать инструмент для управления формированием биопленок с целью их биотехнологического использования (например, в биореакторах для производства полезных продуктов или для очистки сточных вод). Поэтому в настоящей работе изучению механизмов этого явления было уделено повышенное внимание.

Мутации, не действующие на синтез АГЛ (штаммы $\Delta rpoS$, Δphz) существенно не влияют ни на чувствительность планктонной культуры измененного штамма к азитромицину, ни на активирующий эффект этого антибиотика в отношении биопленок мутанта. Мутация в гене *gacS*, кодирующем сенсор-киназу GacS двухкомпонентной регуляторной системы GacA-GacS приводящая к полному подавлению синтеза части АГЛ (штамм $\Delta gacS$), не влияя на чувствительность планктонной культуры к азитромицину, существенно уменьшает

стимуляцию роста биопленок в присутствии этого антибиотика. Наконец, введение плазмиды pME6863, включающей клонированный ген N-ацилгомосеринлактаназы, AiiA и вызывающей деградацию всех типов АГЛ (штамм pME6863), приводит к полному снятию стимуляции азитромицином роста биопленки, причем этот рост становится даже более чувствительным к азитромицину, чем рост планктонной культуры. Таким образом, из наших экспериментов можно сделать важный вывод о том, что стимуляция азитромицином роста биопленок прямо связана с функционированием системы глобальной регуляции quorum sensing и обязательным синтезом ее сигнальных компонентов – АГЛ.

Стимуляцию формирования биопленок вызывают не только антибиотики, но и некоторые окислители, например, перекись водорода. При введении той же самой плазмиды pME6863 (присутствующей у использованного нами мутанта *P. chlororaphis* 449/pME6863) в штамм *P. aeruginosa* PAO1, у которого перекись водорода стимулирует рост биопленок, эффект стимуляции полностью снимается (Плюта В.А. с соавт., 2013). По-видимому, в этих случаях антибиотики и окислители являются стрессовыми факторами, на которые микроорганизм реагирует путем перехода к более устойчивому биопленочному типу существования, при котором необходимую роль играют сигнальные компоненты системы quorum sensing.

Отвечая на вопрос о биохимическом механизме стимуляции роста биопленок *P. chlororaphis* азитромицином, можно сформулировать следующие возможные причины данного явления у патогенных бактерий. Во-первых, это активация биосинтеза факторов адгезии, например, в случае действия субингибиторных концентраций антибиотика имипенема на *A. baumannii* (Nucleo et al., 2009). Во-вторых, положительное воздействие на синтез факторов регуляторной системы quorum sensing, необходимых для формирования биопленок, как это показано для макролидов в случае *Chromobacterium violaceum* (Liu et al., 2013). Наконец, в третьих, влияние на регуляторные системы с участием циклического дигуанозинмонофосфата (c-di-GMP) участвующего в биосинтезе полисахаридных компонентов матрикса биопленок (показано для амногликозидов) в случае *E. coli* (Boehm et al., 2009). Таким образом, антибиотики не только вызывают гибель или подавление роста микроорганизмов, но в субингибиторных концентрациях могут выступать в качестве факторов, вызывающих стрессовый ответ (Linares et al., 2006).

Нами продемонстрирована корреляция между способностью к синтезу АГЛ у изученных псевдомонад и наличием эффекта активации азитромицином формирования у них биопленок. Показано, что эффект активации роста биопленок сопровождается повышенным синтезом в них полисахаридных компонентов матрикса. Поэтому можно полагать, что эффект активации, скорее всего, обусловлен совместным действием нескольких регуляторных механизмов

(системы quorum sensing, а также системы c-di-GMP) , вовлекаемых в процесс формирования матрикса биопленок.

Особый интерес представляет ингибиторный эффект сверхнизких концентраций азитромицина на формирование биопленок у изученных псевдомонад. Для его объяснения нами выдвинута следующая гипотеза. Матрикс биопленок представляет собой сложную, многокомпонентную систему биополимеров (ДНК, белков и полисахаридов), но, поскольку азитромицин в сверхнизких концентрациях не влияет на синтез ДНК или белков, можно предположить, что основной его мишенью является синтез полисахаридов. В построении биопленок у псевдомонад участвуют несколько полисахаридов. Если синтез одного из них подавляется азитромицином в сверхнизких концентрациях, а синтез другого активируется азитромицином при более высоких концентрациях, и оба процесса синтеза идут одновременно, то в итоге может возникать картина формирования биопленок, представленная на рисунках 10 и 11: ингибирование возникает за счет подавления антибиотиком синтеза первого компонента, когда синтез второго еще не активирован. А при более высоких концентрациях азитромицина активированный синтез второго компонента компенсирует ингибирование первого компонента. Гипотеза имеет спекулятивный характер и нуждается в экспериментальном подтверждении.

Таким образом, результаты работы с *P. chlororaphis* демонстрируют, что стимуляция роста биопленок антибиотиками – это явление универсальное и характерное не только для микроорганизмов-комменсалов человека или патогенов, но и для сапротрофов.

Отдельным направлением нашей работы было исследование влияния лекарственных соединений, не являющихся антибиотиками, на рост биопленок. Нами был выбран антигельминтный препарат никлозамид, для которого были проверены, по-первых, его способность влиять на рост биопленок, а во-вторых – возможность его применения совместно с антибиотиками в виде бинарных антибиопленочных препаратов. В составе таких препаратов никлозамид был бы компонентом, усиливающим действие антибиотика. Ранее (Imperi et al., 2013; Torres et al., 2016) уже появлялись единичные данные об ингибиторном влиянии никлозамида на рост микроорганизмов, однако, новизна нашей работы состояла в изучении широкого диапазона штаммов. В ходе наших исследований продемонстрирована эффективность никлозамида как антибиопленочного препарата широкого спектра действия. Полученные результаты позволяют рассматривать никлозамид как перспективный компонент комплексных антибиопленочных препаратов (в сочетании с антибиотиками), для чего существуют и экономические причины. Никлозамид производится в больших количествах во всем мире и в России в частности, что облегчает создание комплексных антибиопленочных препаратов, и при этом он относительно дешев. Никлозамид обладает очень высокой активностью: сотые доли мкг/мл снижают количество метаболически активных клеток в

био пленках на 50%. Наконец, никлозамид не токсичен в используемых концентрациях для организма-хозяина.

Также мы показали, что никлозамид потенциально может усиливать действие антибиотиков. Аддитивный характер взаимодействия никлозамида и азитромицина может быть связан с различиями в механизмах их антибиопленочного действия. Известно, что азитромицин подавляет синтез белка на этапе трансляции, взаимодействуя с 50S-субъединицей рибосомы (Bakheit et al., 2014). Вследствие этого подавление формирования био пленок может быть обусловлено дефицитом необходимых ферментов. В случае никлозамида, как мы уже отмечали, описан ингибиторный эффект на QS-систему *P. aeruginosa* за счет подавления синтеза N-ацилгомосеринлактонов (Imperi et al., 2013). Однако, никлозамид проявляет антибиопленочный эффект и в случае грамположительных бактерий, с принципиально отличающимися системами QS. Согласно полученным нами экспериментальным результатам, никлозамида воздействует на процессы, связанные с переходом планктонных клеток к прикрепленному способу существования. Однако молекулярные механизмы действия никлозамида на формирование био пленок требуют дальнейших исследований.

Следующим этапом работы было исследование влияния на рост био пленок кожных микроорганизмов соединений, не являющихся лекарственными средствами, но напрямую воздействующих на микроорганизмы кожи – косметическим средствам и их компонентам. Исследования влияния активных компонентов косметики, которые применяются или в перспективе будут применяться в индустрии, в нынешнее время достаточное количество работ. Это связано, в частности, с глобальной тенденцией разработки косметических средств без консервантов. Последние являются причинами аллергии и других кожных расстройств (Herpin et al., 2013; Nabavi et al., 2015).

В своей работе мы, во-первых, впервые исследовали эффекты PS291® и термальной воды Уриаж™ на рост культур, био пленок и свойства поверхности клеток *S. aureus* и *C. acnes*. Во-вторых, при помощи конфокальной микроскопии мы показали изменение структуры био пленок *C. acnes* и *S. aureus* под воздействием данных веществ. В-третьих, мы выдвинули гипотезу о наиболее вероятном механизме ингибиторного воздействия данных соединений на формирование био пленок *C. acnes* и *S. aureus* на этапе адгезии. Наконец, исходя из того факта, что и термальная вода, и PS291® практически одинаково ингибируют рост био пленок представителей двух филумов бактерий, мы можем предполагать наличие универсального механизма ингибирующего влияния данных соединений на грамположительные неподвижные бактерии-комменсалы кожи человека.

PS291® и термальная вода, не оказывая токсического воздействия на планктонные клетки бактерий, значительно снижают общее количество биомассы их био пленок. Эти результаты

получены как при помощи окрашивания КФ, так и при наблюдении в КЛСМ. Интересно, что ФР в тех же концентрациях не только не оказывал существенного воздействия на рост биопленок, но, более того, нивелировал подавляющий эффект PS291®. Это свидетельствует о том, что причина ингибиторного воздействия термальной воды на биопленки *S. acnes* и *S. aureus* определяется особенностями ее химического состава

Возможно также, что в случае с физиологическим раствором, как и с термальной водой, при высокой их концентрации (т.е. при сильном разбавлении среды) могут запускаться процессы, повышающие устойчивость биопленок к воздействию неблагоприятных факторов, подобно тому, как это происходит у *E. coli* в случае устойчивости к офлоксацину (Bernier et al., 2013). Это может объяснять снятие эффекта PS291® в присутствии физиологического раствора, а также отсутствие выраженного аддитивного эффекта от комбинации PS291® и термальной воды. При этом термальная вода при высоких концентрациях (30% и больше) не стимулировала роста биопленок. Однако, это гипотеза спекулятивна и нуждается в дальнейшей проверке.

PS291® или тефлоза (от «coating like Teflon», http://www.solabia.com/Produto_16,1/Cosmetique/Teflose.html), по данным производителя, способна формировать слой на поверхностях, который теоретически препятствует адгезии. Препятствование адгезии клеток и образованию биопленок тефлозой было обнаружено ранее на примере неакнеического штамма *S. acnes* BEC1666 (Enault et al., 2014). Нами это подтверждено на примере *S. aureus* и двух акнеических штаммов *S. acnes*, что говорит об отсутствии зависимости данного эффекта от штаммовых различий и акнеического фенотипа. PS291®, во-первых, в значительной степени снижает адгезию клеток *S. aureus* к стеклу и образование микроколоний; во-вторых, меняет свойства поверхности клеток обоих микроорганизмов. Клетки *S. aureus* становятся более электроотрицательными, а у клеток обоих штаммов *S. acnes* снижается сродство к полярным органическим растворителям. Вероятно, что PS291® связывается с поверхностными структурами клеток, что изменяет и снижает их способность к адгезии. Однако данное предположение требует дальнейшего исследования.

Что касается архитектуры биопленок, то в этом случае и термальная вода, и PS291® обладают сходным эффектом. В их присутствии биопленки обоих микроорганизмов утончаются, а также снижается количество выростов и структурных образований на поверхности, т.е. по сути, упрощается трехмерная структура биопленок. Это подтверждает гипотезу об антиадгезивных свойствах исследуемых веществ: клетки, выросшие в составе биопленки в присутствии тефлозы или термальной воды легче диспергируются. У *S. aureus* MFP03 при 50% термальной воды в среде биопленка фактически представляет собой монослой клеток, мало отличающийся по толщине от такового после этапа принудительной адгезии. У *S.*

acnes, вероятно, в силу более высокой гидрофобности клеток, этот эффект выражен не так сильно, но тоже присутствует.

Исследования эффектов термальной воды и тефлозы на *S. aureus* и *C. acnes* также важны в связи с недавним обнаружением молекулярно-генетическими методами присутствия в микробиоте язвочек и прыщей вульгарных акне значительных количеств *Staphylococcus spp.* наряду с *C. acnes*, что говорит о возможной вовлеченности стафилококков в развитие акне (Dreno et al., 2017). В модельных опытах в составе бинарной биопленки оба микроорганизма способны расти как в анаэробных, так и в аэробных условиях (Tyner, Patel, 2016). Понимание процессов, происходящих на коже при развитии акне, а также при воздействии косметики позволит создавать препараты, способные ликвидировать проблему прыщей и угрей, от которой страдает большое количество людей по всему миру. Это может быть одной из причин того, что данные средства вызывают улучшение состояния кожи после длительного применения.

Подытоживая, можно сказать, что исследование влияния косметических средств и их компонентов подтвердило, что они способны оказывать значительный эффект на рост биопленок микроорганизмов-комменсалов кожи человека. Не обладая цитотоксическим действием, PS291® и TBY способны, по-видимому, модифицировать процессы адгезии клеток друг к другу и к поверхности. Нетоксичность для клеток микроорганизмов при действующей концентрации – важная характеристика данных соединений, поскольку это означает, что можно находить способы управлять микробиомом человека и формированием биопленок не только с помощью лекарственных средств или веществ, напрямую влияющих на метаболизм микроорганизмов, но также с помощью соединений, добавление которых в среду не изменяет общего метаболического состояния микроорганизмов. Таким образом, подобные соединения будут безопасны для человека.

Наконец, последней группой изученных в данной работе активных соединений, стали натрийуретические пептиды. Если до этого мы исследовали искусственные или натуральные соединения экзогенной для организма человека природы, то НУП – это эндогенные соединения, обладающие широким спектром функций в организме. Мы впервые продемонстрировали, что А и С типы натрийуретических пептидов человека способны оказывать значительное воздействие на микроорганизмы кожи и их взаимоотношения в бинарных сообществах. Особенно важно, что НУП функционируют не как хорошо известные антибактериальные вещества, вырабатываемые в организме человека, а, скорее всего, выполняют роль сигналов межклеточной коммуникации, не только между клетками человека-хозяина, но и между организмом хозяина и его кожной микробиотой. Доказательством этому может служить тот факт, что пептиды, не оказывая значительного эффекта на рост планктонных культур,

воздействуют на формирование как моновидовых биопленок, так и на конкурентные свойства микроорганизмов в составе бинарных биопленок.

НУП, синтезируемые в том числе клетками эндотелия капилляров (CNP), с кровотоком пересекают разные зоны организма, отличающиеся температурой и концентрацией кислорода. Внутри тела человека температура равна приблизительно 37°C, присутствуют как аэробные, так и анаэробные зоны. В коже также есть аэробные и анаэробные микрониши, однако температура там существенно ниже. В частности, на коже лба, где чаще всего развивается акне – порядка 33°C (Boutcher et al., 1995). Внутри волосяного фолликула пептиды непосредственно воздействуют на сообщество микроорганизмов, обитающее в нем, в том числе на *S. acnes* и *S. aureus*. Это воздействие представляется весьма существенным по двум причинам. Во-первых, в особой зоне фолликула возле балджа, где кровеносные капилляры образуют густую сеть (Xiao et al., 2013), концентрация пептидов может быть особенно высока вследствие диффузии. Во-вторых в данной области клетки микроорганизмов находятся на очень малом расстоянии от капилляров, фактически подвергаясь таким образом постоянному воздействию пептидов.

S. acnes, будучи одним из доминирующих компонентов микробиома кожи, предположительно вовлечен в процесс развития акне. Однако, внутри кожных желез и волосяных фолликулов обитают сотни видов микроорганизмов, поэтому говорить о том, что *S. acnes* является единственным возбудителем акне пока преждевременно. Исследования последних лет показывают, что в некоторых случаях внутри воспаленных язвочек акне также обильно присутствует *S. aureus* (Totte et al., 2016; Dreno et al., 2017). Пока не найдено прямых доказательств роли *S. aureus* как возбудителя акне, однако, есть все основания предполагать его участие в воспалительном процессе. Также *S. aureus* обильно колонизирует участки кожи, пораженные псориазом и атопическим дерматитом (Elfatoiki et al., 2016; Lacey et al., 2016), вызывая воспаления и осложняя процесс лечения. Внутри полостей кожных желез и волосяных фолликулов *S. acnes*, будучи в некоторой степени аэротолерантным анаэробом, предпочитает занимать анаэробные микрониши (Matard et al., 2013), где формирует биопленки, в которые может включаться *S. aureus*.

Специфичный для биопленок эффект натрийуретических пептидов может быть объяснен тем, что в организме человека микроорганизмы живут преимущественно в виде мультивидовых биопленок. Особенно это касается кожи, где физико-химические параметры среды просто не позволяют развиваться планктонной культуре. Мы показали, что натрийуретические пептиды обладают не только большим числом регуляторных функций внутри организма человека, но также способны воздействовать на микроорганизмов-комменсалов человека, что расширяет горизонт нашего понимания работы гормональной системы человека. Помимо этого, мы еще на

один шаг приближаемся к пониманию глобальной картины взаимодействия микроорганизмов-комменсалов с организмом человека.

Различие в силе эффекта и его зависимость от концентрации пептида у разных микроорганизмов может быть эволюционным приспособлением гормональной системы человека к взаимодействию с микробиотой. Нелогичная, на первый взгляд, обратная зависимость силы эффекта от концентрации пептида в случае *S. aureus* может быть объяснена, во-первых, тем, что при высоких концентрациях молекулы натрийуретических пептидов способны образовывать агрегаты, что может приводить к снижению их активности (Torticelli et al., 2004). Во-вторых, *S. aureus* обитает, как правило, в местах, где концентрация пептидов в норме должна быть ниже, чем в случае *C. acnes*, что делает эффективными именно низкие концентрации. Это выражается в том числе и в том, что и ингибиторный, и стимулирующий эффекты в случае *S. aureus* проявляются именно при низкой концентрации. *C. acnes* же концентрируется в зонах, где концентрация пептидов предположительно выше, что в ходе эволюции сделало их более эффективными в высоких концентрациях. Тем не менее, НУП, по-видимому, обладают штаммоспецифичным действием на *C. acnes*: при смене условий культивирования характер воздействия пептидов на разные штаммы *C. acnes* изменяется по-разному, что может быть следствием, с одной стороны, более тесного эволюционного взаимодействия гормональных систем человека именно с *C. acnes* и, возможно, более долгим и тесным сосуществованием *C. acnes* с человеком, а с другой стороны может свидетельствовать о разной роли разных штаммов *C. acnes* на коже человека и их разном взаимодействии с организмом.

Прежде чем исследовать влияние активных соединений на бинарные биопленки, мы исследовали взаимоотношения микроорганизмов друг с другом в бинарных системах без добавления активных соединений – косметики или НУП. Мы показали, что в бинарных биопленках двух стафилококков *S. aureus* MFP03 обладает значительным конкурентным преимуществом перед *S. epidermidis* MFP04. Причем если *S. aureus* MFP03 способен подавлять рост *S. epidermidis* MFP04 примерно на два порядка в случае одновременно формируемых биопленок и активно колонизировать зрелые 24-часовые биопленки *S. epidermidis* MFP04, то *S. epidermidis* MFP04 способен выдерживать присутствие *S. aureus* MFP03 только при условии предварительного формирования зрелой 24-часовой моновидовой биопленки. Колонизация зрелых биопленок *S. aureus* MFP03 у данного штамма протекает значительно хуже. На момент написания данной диссертации найдена лишь одна работа Vandecandelaere et al., 2017, посвященная бинарным биопленкам ряда штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis*. В ней показано, что в бинарной биопленке оба микроорганизма меняют уровень экспрессии ряда генов, и штаммы *S. aureus* Mu50 в целом проявляли меньшую метаболическую активность в

присутствии штаммов *S. epidermidis*, при этом у штаммов *S. epidermidis* повышалась экспрессия генов устойчивости к ряду антибиотиков. Причем соотношение количества КОЕ в бинарных биопленках оставалось таким же, каким исследователи его создавали при посеве и не менялось с ростом биопленок. При сравнении результатов нашей работы с работой Vandecandelaere et al., 2017, видно, что взаимодействие *S. aureus* и *S. epidermidis* носит штаммоспецифичный характер. В работе Vandecandelaere et al. использовали штаммы *S. epidermidis*, выделенные из биопленок трахейного имплантата, а *S. aureus* были выделены либо из ран на коже, либо также с поверхности имплантата, либо были взяты из коллекций. Это говорит о том, что, возможно, на коже при сосуществовании в близких или одинаковых микро niches *S. aureus* MFP03 приобрел преимущество перед *S. epidermidis* MFP04, поскольку оба микроорганизма были выделены с кожи здоровых добровольцев.

Бинарным биопленкам *S. aureus* и *C. acnes* на сегодняшний день посвящена одна опубликованная работа Tyner, Patel, 2016. В ней авторы показали, что *S. aureus* IDRL-4284 выживал лучше в составе бинарной биопленки с *C. acnes* IDRL-7676 чем в моновидовой биопленке при долгосрочном (более 10 дней) культивировании, и в целом *C. acnes* оказывал благотворное воздействие на *S. aureus* (оба штамма – клинические изоляты). При этом число КОЕ *C. acnes* не изменялось в присутствии *S. aureus*. Данные, полученные в данной работе, не противоречат результатам работы Tyner, Patel, поскольку при 37°C *S. aureus* MFP03 в присутствии обоих штаммов *C. acnes* рос лучше, чем в моновидовой культуре. При этом, за счет скорости роста *S. aureus* MFP03 выигрывал конкуренцию с *C. acnes* в случае одновременно формируемых биопленок. Результаты нашей работы коррелируют с данными Wollenberg et al., которые показали, что копропорфирин III, синтезируемый *C. acnes*, стимулирует агрегацию клеток *S. aureus*, его адгезию к поверхности и рост биопленок (Wollenberg et al., 2014). Однако, в наших экспериментах при 33°C картина менялась: во всех случаях, где *S. aureus* MFP03 имел преимущество в скорости роста или в виде уже предформированной биопленки (одновременно формируемые биопленки или же биопленки, созданные на основе предформированных моновидовых биопленок *S. aureus* MFP03), присутствие *C. acnes* RT5 не влияло заметно на число КОЕ *S. aureus* MFP03, тогда как в случае бинарных биопленок на основе предформированных моновидовых биопленок *C. acnes* RT5 наблюдали значительное уменьшение числа КОЕ *S. aureus* MFP03, тогда как биомасса *C. acnes* RT5 существенно не изменялась. Это свидетельствует, во-первых, о штаммовой специфичности взаимодействий микроорганизмов, а, во-вторых, о возможном экологическом взаимодействии штаммов на коже: *C. acnes* RT5 при нормальной температуре кожи (33°C), по-видимому, способен подавлять рост *S. aureus* MFP03.

Если говорить об исследованиях бинарных биопленок *S. epidermidis* и *C. acnes*, то обнаружена всего одна работа Eroshenko et al., 2017, посвященная воздействию N-ацетилцистеина на ряд грамположительных микроорганизмов кожи, в которой авторы проверили действие соединения на моновидовые биопленки, а также бинарную биопленку *S. epidermidis* и *C. acnes* (Eroshenko et al., 2017). Авторы предполагают, что, поскольку *S. epidermidis* более устойчив к действию N-ацетилцистеина, нежели *C. acnes*, то долгое применение данного препарата может изменить баланс микроорганизмов на коже (Eroshenko et al., 2017). Есть отдельные работы, которые свидетельствуют об антагонизме *S. epidermidis* и *C. acnes* (Christensen et al., 2016), обнаруженном с помощью высевов на чашки Петри с последующим анализом зон просветления, секвенирования генома и нахождения в нем определенных генов, ответственных за синтез тех или иных антимикробных соединений. Наша работа показала, что исследованные штаммы *S. epidermidis* MFP04 и *C. acnes* RT4 и RT5 ведут себя по-разному в бинарных биопленках. *S. epidermidis* MFP04 при 37°C в присутствии штамма RT5 рос хуже, чем в моновидовых биопленках, а в присутствии штамма RT4 – лучше. Это показывает штаммоспецифичность взаимодействий данных видов. При этом, как и в случае *S. aureus* MFP03, оба штамма *C. acnes* росли хуже в присутствии *S. epidermidis* MFP04, чем в моновидовых биопленках, поскольку последний рос лучше в анаэробных условиях, чем *S. aureus* MFP03. Данная работа показывает, что в некоторых случаях может существовать антагонизм между штаммами *S. epidermidis* и *C. acnes*, подобно тому, как это наблюдалось в работе Christensen et al.

Мы исследовали влияние TBY и PS291® на рост бинарных биопленок *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5, а также *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04. Добавление TBY в среду культивирования увеличивало конкурентные свойства *S. epidermidis* MFP04 в бинарных биопленках с *S. aureus* MFP03 по сравнению с контролем, а также увеличивало конкурентные свойства *C. acnes* RT5 в бинарных биопленках с *S. aureus* MFP03. PS291® оказывал различный эффект: в бинарных биопленках *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 он подавлял рост *S. epidermidis* по сравнению с контролем, а в бинарных биопленках *C. acnes* RT5 + *S. aureus* MFP03 он увеличивал конкурентные свойства *C. acnes* RT5, частично ухудшая рост *S. aureus* MFP03. Это может служить одной из причин благоприятного воздействия TBY и PS291® на кожу, поскольку они нарушают рост биопленок считающегося более агрессивным патогеном *S. aureus*. При этом можно заметить, что в бинарных биопленках *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03 эффект обоих косметических средств отличается от такового в случае моновидовых биопленок, где оба соединения подавляют рост биопленок обоих микроорганизмов.

В случае натрийуретических пептидов в бинарных биопленках *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03 эффекты ANP и CNP, как и в случае косметических средств TBY и PS291®, отличаются

от таковых в случае моновидовых пленок. Тесное соседство и взаимодействие двух микроорганизмов критически меняет характер воздействия на них пептидов. Оба пептида начинают стимулировать рост биомассы *C. acnes*, хотя в моновидовых биопленках происходило значительное ингибирование роста. Это может указывать на существование механизмов межвидового взаимодействия и, возможно, мутуализма, которые предохраняют *C. acnes* от действия пептидов в присутствии *S. aureus*, или же позволяют ему обратить их присутствие в свою пользу. На основе данных, полученных нами в ходе работы, мы можем сформулировать гипотезу о том, каким образом натрийуретические пептиды регулируют состав микробного сообщества в биопленках. В нормальных условиях (здоровая кожа, температура 33°C) внутри сообщества, где есть *C. acnes* и *S. aureus* натрийуретические пептиды усиливают конкурентное преимущество *C. acnes*, подавляя рост *S. aureus*. Это представляется логичным, т.к. *S. aureus* является более агрессивным и патогенным микроорганизмом, чей избыточный рост крайне нежелателен (Vandecandelaere et al., 2017). В определенных условиях (закупорка пор, образование комедонов) возникают условия еще более благоприятные для избыточного роста *C. acnes*. Возникает очаг акне и начинается воспалительный процесс, который сопровождается локальным повышением температуры (поднимается до уровня 37°C). С ростом температуры ситуация меняется – *S. aureus* и *C. acnes*, по-видимому, переходят к мутуалистическим взаимодействиям, и их сосуществование в биопленке благотворно влияет на рост – оба микроорганизма начинают интенсивно размножаться, что ухудшает ситуацию в воспалительном очаге. И именно на стадии повышенной локальной температуры натрийуретические пептиды начинают ингибировать рост биопленок обоих микроорганизмов, что позволяет защитным системам организма справиться с воспалением.

Мы также можем высказать гипотезу вовлеченности натрийуретических пептидов А и С типа в развитие псориаза. Согласно исследованиям, в процессе развития псориаза на пораженных участках кожи создаются условия, благоприятные для обильного роста *S. aureus*. Поскольку псориаз предположительно имеет аутоиммунную природу и протекает, как правило, волнообразно, мы вполне можем предположить участие натрийуретических пептидов в процессе его развития. На стадии, когда псориазные бляшки еще не воспалены и в них поддерживается нормальная для кожи температура, на них попадает *S. aureus* и начинает интенсивно размножаться. Поскольку по невыясненным пока причинам в области псориазных бляшек *S. aureus*, по-видимому, обладает большими конкурентными преимуществами перед другими микроорганизмами, можно предположить, что в некоторых микронизмах он образует практически моновидовые биопленки. На эти биопленки натрийуретические пептиды на довоспалительной стадии оказывают стимулирующий эффект, что, возможно, является одной из причин воспаления. В процессе воспаления локальная

температура также повышается, что приводит к запуску обратного процесса – натрийуретические пептиды начинают ингибировать рост биопленок *S. aureus*. Данная гипотеза хорошо согласуется с экспериментальными данными: ингибирование роста биопленок *S. aureus* при 37°C натрийуретическими пептидами протекает при относительно низких концентрациях пептидов в среде. В то же время известно, что при псориазическом поражении кожи наблюдается избыточный ангиогенез. Большое количество капилляров означает большую циркуляцию крови и большую концентрацию пептидов. С ростом числа капилляров на воспаленном участке кожи возрастает и концентрация пептидов в ткани, что устраняет ингибиторный эффект. Однако для окончательного подтверждения обеих гипотез необходимы исследования *in vivo*.

Если рассматривать бинарные системы *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04, то нам представляется весьма существенным тот факт, что при 37°C ANP и CNP стимулируют рост моновидовых биопленок эпидермального стафилококка, тогда как в случае моновидовых биопленок золотистого стафилококка, оба пептида при 37°C, напротив, преимущественно подавляют их рост. Эти факты позволяют дополнить гипотезу о регуляторной и, возможно, защитной роли НУП в коже человека. В нормальных условиях (когда нет воспаления, а температура около 30-33°C, в зависимости от зоны на коже) рост культуры *S. epidermidis* (биопленки и планктонные клетки) слегка подавляется либо не изменяется под воздействием НУП. Если нарушается баланс микроорганизмов на коже, то гораздо более опасный и агрессивный *S. aureus* начинает интенсивно размножаться, что приводит к воспалению и, соответственно, к локальному (или общему) повышению температуры до 37°C и выше. В этом случае натрийуретические пептиды начинают подавлять рост золотистого стафилококка и стимулировать рост не только *C. acnes*, но и *S. epidermidis*. Тем самым, вероятно, снижается опасность осложнений и дополнительного ухудшения состояния, вызванного чрезмерным размножением *S. aureus*, а также восстанавливается нормальное соотношение микроорганизмов на коже. Таким образом, можно объяснить защитную роль *S. epidermidis* для кожи человека, данных о которой становится все больше (Iwase et al., 2010, Sugimoto et al., 2013), если принять, что *S. epidermidis* получает дополнительную помощь от гуморальных систем человека в противодействии агрессивным штаммам *S. aureus*. Гипотеза эта спекулятивна, тем не менее, результаты нашего исследования позволяют с достаточным основанием рассматривать НУП как важный компонент системы взаимодействия микробиоты кожи и организма человека, что открывает новые перспективы как в фундаментальных аспектах дерматологии, микробиологии, и физиологии, так и в их прикладных аспектах: косметологии и фармацевтике. Также они свидетельствуют о глубокой эволюционной взаимосвязи между человеком и его микроорганизмами-комменсалами.

Важной частью нашей работы является исследование биохимического состава матрикса биопленок *C. acnes*. На момент написания данной диссертации были опубликованы две работы, посвященные составу матрикса *C. acnes*. В первой из них (Jahns et al., 2016) проведено исследование матрикса при помощи специфических флуоресцентных красителей для ДНК, полисахаридов и белков. Используя флуоресцентную микроскопию, авторы определили наличие углеводов, белков и ДНК в матриксе без дальнейшего углубления в биохимическую структуру соединений. Другая работа Okuda et al., 2018 посвящена в том числе выделению матрикса и анализу его состава. Авторы оценили количество ДНК, белков и поли-N-ацетилглюкозамина (поверхностного адгезина). Их данные близки к полученным в нашей работе. Авторами также охарактеризованы некоторые белки матрикса, например, гидролазы, енолаза, липопротеин RlpA и фактор гемолиза CAMP. Вызывает сомнения методика, по которой они получали биопленки, поскольку Chiba et al., 2015, по методике которых они выделяли матрикс, выращивали культуру в жидкой среде в пробирках в статических условиях без специализированного носителя, после чего всю биомассу осаждали, отмывали и выделяли матрикс. Не совсем ясно, действительно ли в этом случае получали чистые биопленки или же биопленки с планктонной культурой, поскольку, по нашему опыту работы с *C. acnes*, данные микроорганизмы образуют биопленки на дне пластиковых пробирок очень слабо.

В нашей работе проведено более глубокое и всестороннее исследование матрикса *C. acnes* RT5. Во-первых, мы получали зрелые (согласно Tyner, Patel, 2016) 7-дневные биопленки на поверхности фильтров на плотной среде, что исключало попадание материала питательной среды и позволяло выделять именно матрикс биопленок. Во-вторых, авторы обрабатывали биопленку дисперсином В и ДНКазой, что автоматически лишает возможности анализировать как минимум полисахаридный состав матрикса. В-третьих, внеклеточные гидролазы *C. acnes* были известны задолго до работы Okuda et al., 2018 (Holland et al., 2010). Наша методика позволяет без изменения химической структуры выделять именно матрикс биопленок. Также, мы впервые рассчитали количественное соотношение основных компонентов матрикса.

В выделенном по нашей методике матриксе *C. acnes* RT5 большая часть органического углерода (54%) принадлежит углеводной составляющей, Вторым компонентом по количеству являются пептиды: 11.9%. ДНК составляла порядка 2.8% от всего органического вещества матрикса. Оставшееся органическое вещество, предположительно, содержит в себе метаболиты и интермедиаты, в первую очередь, синтеза порфиринов. Анализ протеома матрикса биопленок показал, что в нем содержатся более 400 белков, очень разнообразно представлены ферменты, что говорит о высоком каталитическом потенциале матрикса *C. acnes*. Многие из белков являются белками цитозоля и, вероятно, попадают в матрикс вследствие автолиза части клеток, в норме происходящего в процессе роста биопленок. Однако, есть высокая вероятность того,

что эти внутриклеточные белки в составе матрикса обладают определенными неизвестными функциями, отличных от таковых внутри клетки и не являются «мертвым грузом». К примеру, несколько десятков гидролаз, специфичных к разным субстратам, вероятно, позволяют биопленкам *S. acnes* растворять полимеры окружающих тканей организма-хозяина, в частности, кожи человека, что обуславливает их патогенность и, вероятно, определяет роль *S. acnes* в развитии акне и других заболеваний. Шапероны и шаперонины могут участвовать в организации каркаса матрикса, совместно с частицами рибосом и целыми рибосомами. Мы не знаем, в каком виде рибосомы представлены в матриксе: в виде ли целых частиц, в виде отдельных субъединиц, агрегатов белков или белками по отдельности. Тем более, из более чем 50 рибосомных белков нами были обнаружены лишь 43. Мы можем предполагать, что рибосомы представлены в матриксе во всех состояниях, однако, потенциальная их роль и роль их белков в матриксе биопленок пока неясна.

Мы впервые провели SERS-анализ матрикса биопленок *S. acnes*. Анализ пиков SERS также подтверждает выделение именно матрикса биопленок, поскольку более 40 пиков в матриксе и биомассе клеток различаются. Наиболее интенсивные пики обеих фаз матрикса приходятся на 370-386 cm^{-1} . Однако сами по себе спектры SERS не несут информации о природе веществ матрикса, поскольку на сегодняшний день не существует базы данных SERS-спектров органических соединений. Поэтому, SERS выгодно применять в сочетании с другими методиками, такими как масс-спектрометрия и ЯМР. Тем не менее, мы можем утверждать, что нами впервые сделано типирование биопленок и матрикса *S. acnes* методом SERS, что поможет в будущем, к примеру, определять наличие *S. acnes* в сложных биологических образцах сравнительно быстрым и легким методом SERS.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что антибиотик азитромицин в субингибиторных концентрациях стимулирует рост биопленок сапротрофного штамма *P. chlororaphis* 449, и в этом процессе участвует АГЛ-зависимая система кворум-сенсинга. Этот факт свидетельствует о перспективности подавления ее функционирования для предотвращения стимулирующего эффекта антибиотика, представляющего опасность в случае патогенных бактерий. Установлено, что стимуляция роста биопленок азитромицином, в первую очередь, выражается в повышенном синтезе полисахаридов матрикса, что приводит к повышенной устойчивости предформированных в присутствии азитромицина биопленок к тепловому шоку.

2. Впервые обнаружен ингибиторный эффект антигельминтного агента никлозамида на рост планктонных культур и биопленок *S. aureus*, *M. luteus* C01 и *K. schroeteri* H01. При этом никлозамид снимает эффект стимуляции роста биопленок *S. aureus* 209P субингибиторными

концентрациями азитромицина, что делает его перспективным для использования в комплексных препаратах с этим антибиотиком.

3. Показано, что применяемые в косметике ТВУ™ и PS291® значительно подавляют рост биопленок *S. aureus* MFP03 и *C. acnes*, не проявляя при этом токсического эффекта. ТВУ смещает в бинарной биопленке *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 баланс жизнеспособных бактерий в сторону *S. epidermidis* MFP04, а в бинарной биопленке *S. aureus* MFP03 и *C. acnes* RT5 оба соединения смещают баланс в сторону *C. acnes* RT5, что благоприятно для состояния кожи, поскольку золотистый стафилококк является опасным патогеном.

4. Впервые установлена зависимость от условий культивирования эффекта НУП человека на рост биопленок *S. aureus*, *S. epidermidis* и *C. acnes* RT5, что может коррелировать с различным состоянием кожи. Показано, что НУП регулируют состав бинарных биопленок комменсалов кожи: усиливают конкурентные преимущества *S. epidermidis* и *C. acnes* RT5 перед *S. aureus*. Эти результаты создают перспективу для использования НУП в косметологии и дерматологии для нормализации баланса микробиоты кожи.

5. Разработана методика выделения матрикса биопленок грамположительных бактерий. Впервые исследовано соотношение биохимических компонентов матрикса биопленок *C. acnes* RT5. Показано, что доминирующим компонентом матрикса биопленок *C. acnes* RT5 являются полисахариды.

6. Впервые было проведено глубокое исследование тотального протеома матрикса *C. acnes* RT5. Показано наличие более 400 белков в матриксе, присутствие большого числа ферментов-гидролаз, специфичным к различным субстратам, и других ферментов, обеспечивающих высокий каталитический потенциал матрикса биопленок *C. acnes* RT5.

7. Впервые был проведен SERS-анализ биомассы и матрикса биопленок *C. acnes* RT5, составлен спектральный профиль клеток и матрикса *C. acnes* RT5, что позволит использовать его в дальнейшем для создания базы данных SERS спектров биологических образцов.

Список цитированной литературы

1. Веселова, М.А. Изучение quorum sensing систем регуляции у *Pseudomonas chlororaphis* и *Burkholderia cepacia*: дисс. ... канд. биол. наук: 06.06.01 / Веселова Марина Анатольевна. – М., ГосНИИГенетика, 2008. – 154 с.
2. Ганнесен, А.В., Журина, М.В., Веселова, М.А., Хмель, И.А., Плакунов, В.К. Регуляция процесса формирования биопленок *Pseudomonas chlororaphis* в системе *in vitro* // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 3. – 281-290.
3. Ганнесен, А.В., Лезуатъе, О., Нетрусов, А.И., Плакунов, В.К., Фейоле, М.Ж. Регуляция натрийуретическими пептидами формирования моновидовых и бинарных биопленок бактерии микробиоты кожи *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* // Микробиология. – 2018. – Т. 87. – № 5. – С. 1–14.
4. Журина, М.В., Ганнесен, А.В., Мартьянов, С. В., Тетенева, Н.А., Штратникова, В.Ю., Плакунов, В.К. Никлозамид как перспективный антибиопленочный агент // Микробиология. – 2017. – Т. 86, № 4. – С. 439–447.
5. Журина, М.В., Кострикина, Н.А., Паршина, Е.А., Стрелкова, Е.А., Юсипович, А.И., Максимов, Г.В., Плакунов, В.К. Визуализация внеклеточного полимерного матрикса биопленок *Chromobacterium violaceum* с помощью микроскопических методов // Микробиология. – 2013. – Т. 82. – № 4. – С. 502–509.
6. Липасова, В.А., Атамова, Е.Е., Веселова, М.А. Экспрессия гена *aiiA* N-ацилгомосеринлактоназы влияет на свойства ризосферного штамма *Pseudomonas chlororaphis* 449 // Генетика. – 2009. – Т. 45. – С. 38–42.
7. Мартьянов, С.В., Журина, М.В., Эль-Регистан, Г.И., Плакунов, В.К. Активирующее действие азитромицина на формирование бактериальных биопленок и борьба с этим явлением // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 1. – С. 27.
8. Никлозамид (Niclosamide) [Электронный ресурс] / Никлозамид // Регистр лекарственных средств России. – 2000–2018. – Режим доступа: https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_1313.html
9. Никитушкин, В.Д., Демина, Г.Р., Капрельянц, А.С. Влияние секретируемого белка Rfp на межклеточные контакты в культурах *Micrococcus luteus* и *Mycobacterium smegmatis* // Микробиология. – 2011. – Т. 80. – № 2. – С. 155–161.
10. Николаев, Ю.А., Плакунов, В.К. Биопленки – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – Т. 76. – № 2. – С. 149–163.
11. Ножевникова, А.Н., Бочкова, Е.А., Плакунов, В.К. Мультивидовые биопленки в экологии, медицине и биотехнологии // Микробиология. – 2015. – Т. 84. – № 6. – С. 623–644.

12. Плакунов, В.К., Журина, М.В., Беляев, С.С. Устойчивость нефтеокисляющего микроорганизма, *Dietzia* sp. к гиперосмотическому шоку в реконструированных биопленках // Микробиология. – 2008. – Т. 77. – № 5. – С. 581–589.
13. Плакунов, В.К., Мартьянов, С.В., Тетенева, Н.А., Журина, М.В. Управление формирование микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 4. – С. 402–420.
14. Плакунов, В.К., Мартьянов, С.В., Тетенева, Н.А., Журина, М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 4. – С. 484–480.
15. Плакунов, В.К., Стрелкова, Е.А., Журина, М.В. Персистенция и адаптивный мутагенез в биопленках // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – № 4. – С. 447–458.
16. Стрелкова, Е.А., Журина, М.В., Плакунов, В.К., Беляев, С.С. Стимуляция антибиотиками процесса формирования бактериальных биопленок // Микробиология. – 2012. – Т. 81. – С. 282–285.
17. Стрелкова, Е.А., Позднякова, Н.В., Журина, М.В. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды // Микробиология. – Т. 82. – С. 131–138.
18. ЦКП «Геном» [Электронный ресурс] / Центр коллективного пользования «Геном» // Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. – 2011. – Режим доступа: <http://genome-centre.ru>.
19. Шепелевич, В.В., Киприанова, Е.А., Ярошенко, Л.В., Авдеева, Л.В. Чувствительность *Pseudomonas chlorogaphis* к антибиотикам и химическим средствам защиты растений // Мікробіологічний журнал. – 2012. – Т. 74. – № 6. – С. 24–28.
20. Achermann, Y., Goldstein, E.J.C., Coenye, T., Shirtliff, M.E. *Propionibacterium acnes*: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen // Clinical microbiology reviews. – 2014. – V. 27. – № 3. – P. 419–440.
21. Adam, B., Baillie, G.S., Douglas, L.J. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis* // Journal of medical microbiology. – 2002. – V. 51. – № 4. – P. 344–349.
22. Aepinus, C., Adolph, E., von Eiff, C., Podbielski, A., Petzsch, M. *Kytococcus schroeteri*: a probably underdiagnosed pathogen involved in prosthetic valve endocarditis // Wiener klinische Wochenschrift. – 2008. – V. 120. – № 1-2. – P. 46–49.
23. Ahn, K.B., Baik, J.E., Yun, C.-H., Han, S.H. Lipoteichoic acid inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation // Frontiers in microbiology. – 2018. – V. 9. – 327.
24. Aiemsaard, J., Aiumlamai, S., Aromdee, C., Taweechaisupapong, S., Khunkitti, W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their

mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745 // Research in veterinary science. – 2011. – V. 91. – № 3. – E. 31–37.

25. Akanbi, O.E., Njom, H.A., Fri, J., Otigbu, A.C., & Clarke, A.M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from recreational waters and beach sand in eastern cape province of South Africa // International journal of environmental research and public health. – 2017. – V. 14. – № 9. – 1001.

26. Al-Mahrous, M., Sandiford, S.K., Tagg, J.R., Upton, M. Purification and characterization of a novel delta-lysin variant that inhibits *Staphylococcus aureus* and has limited hemolytic activity // Peptides. – 2010. – V. 31. – № 9. – P. 1661–1668.

27. Albertson, D., Natsios, G.A., Gleckman, R. Septic shock with *Micrococcus luteus* // Archives of internal medicine American Medical Association. – 1978. – V. 138. – № 3. – P. 487–488.

28. Allen, H.B., Vaze, N.D., Choi, C., Hailu, T., Tulbert, B.H., Cusack, C.A., Joshi, S.G. The presence and impact of biofilm-producing staphylococci in atopic dermatitis // JAMA Dermatology. – 2014. – V.150. – № 3. – P. 260–265.

29. Altegoer, F., Mukherjee, S., Steinchen, W., Bedrunka, P., Linne, U., Kearns, D. B., Bange, G. FliS/flagellin/FliW heterotrimer couples type III secretion and flagellin homeostasis // Scientific Reports. – 2018. – V. 8. – 11552.

30. Amaraneni, A., Malik, D., Jasra, S., Chandana, S.R., Garg, D. *Kytococcus schroeteri* bacteremia in a patient with hairy cell leukemia: a case report and review of the literature // Case reports in infectious diseases. – 2015. – 217307.

31. Andersen, J.L., He, G.-X., Kakarla, P., Ranjana, K.C., R., Kumar, S., Lakra, W.S., Mukherjee, M.M., Ranaweera, I., Shrestha, U., Tran, T., Varela, M.F. Multidrug efflux pumps from *Enterobacteriaceae*, *Vibrio cholerae* and *Staphylococcus aureus* bacterial food pathogens // International journal of environmental research and public health. – 2015. – V. 12. – № 2. – P. 1487–1547.

32. Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., Shirtliff, M.E. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease // Virulence. – 2011. – V. 2. – № 5. – P. 445–459.

33. Arciola, C.R., Hänsch, G.M., Visai, L., Testoni, F., Maurer, S., Campoccia, D., Selan, L., Montanaro, L. Interactions of staphylococci with osteoblasts and phagocytes in the pathogenesis of implant-associated osteomyelitis // The international journal of artificial organs. – 2012. – V. 35. – № 10. – 713–726.

34. Arenas, J., Nijland, R., Rodriguez, F.J., Bosma, T.N., Tommassen, J. Involvement of three meningococcal surface-exposed proteins, the heparin-binding protein NhbA, the a-peptide of IgA

protease and the autotransporter protease NalP, in initiation of biofilm formation // *Molecular microbiology*. – 2013. – V. 87. – P. 254–268.

35. Aubin, G.G., Portillo, M.E., Trampuz, A., Corvec, S. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: from acne to implant-infections, from phylotype to resistance // *Médecine et Maladies Infectieuses*. – 2014. – V. 44. – № 6. – P. 241–250.

36. Augustyniak, D., Nowak, J., Lundy, F. T. Direct and indirect antimicrobial activities of neuropeptides and their therapeutic potential // *Current protein & peptide science*. – V. 13. № – 8. – P. – 723–738.

37. Babauta, J.T., Nguyen, H.D., Harrington, T.D., Renslow. R., Beyenal. H. pH, redox potential and local biofilm potential microenvironments within *Geobacter sulfurreducens* biofilms and their roles in electron transfer // *Biotechnology and bioengineering*. – 2012. – V. 109. – № 10. – P. 2651–2662

38. Bahari, S., Zeighami, H., Mirshahabi, H., Roudashti, S., Haghi, F. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin // *Journal of global antimicrobial resistance*. – 2017. – V. 10. – P. 21–28.

39. Bakheit, A.H., Al-Hadiya, B.M., Abd-Elgalil, A.A. Azithromycin // *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*. – 2014. – V. 39. – P.1–40.

40. Balasubramanian, D., Harper, L., Shopsin, B., & Torres, V. J. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments // *Pathogens and disease*. – 2017. – V. 75. – № 1. – ftx005.

41. Barken, K.B., Pamp, S.J., Yang, L., Gjermansen, M., Bertrand, J.J., Klausen, M., Givskov, M., Whitchurch, C.B., Engel, J.N., Tolker-Nielsen, T. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Environmental microbiology*. – 2008. – V. 10. – P. 2331–2343.

42. Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., Guery, B. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections // *Drugs in Context*. – 2018. – V. 7. – 212527.

43. Bastús, N.G., Comenge, J., Puentes, V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus ostwald ripening // *Langmuir*. – 2011. – V. 27. – № 17. – P. 11098–11105.

44. Beasley, F.C., Marolda, C.L., Cheung, J., Buac, S., Heinrichs, D.E. *Staphylococcus aureus* transporters Hts, Sir, and Sst capture iron liberated from human transferrin by staphyloferrin A, staphyloferrin B, and catecholamine stress hormones, respectively, and contribute to virulence // *Infection and immunity*. – 2011. – V. 79. – № 6. – P. 2345–2355.

45. Becker, K., Schumann, P., Wüllenweber, J., Schulte, M., Weil, H.P., Stackebrandt, E., Peters, G., von Eiff, C. *Kytococcus schroeteri* sp. nov., a novel Gram-positive actinobacterium isolated

from a human clinical source // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2002. – V. 52. – Pt. 5. – P. 1609–1614.

46. Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., Van Oss, C. J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells // Colloids surfaces B: biointerfaces. – 1996. – V. 7. – P. 47–53.

47. Ben Hsouna, A., Hamdi, N., Miladi, R., Abdelkafi, S. *Myrtus communis* essential oil: chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens // Chemistry & biodiversity. – 2014. – V. 11. – № 4. – P. 571–580.

48. Bernal, P., Allsopp, L. P., Filloux, A., Llamas, M. A. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens // The ISME Journal. – 2017. – V. 11. – № 4. – P. 972–987. <http://doi.org/10.1038/ismej.2016.169>.

49. Berne, C., Kysela, D.T., Brun, Y.V. A bacterial extracellular DNA inhibits settling of motile progeny cells within a biofilm // Molecular microbiology. – 2010. – V. 77. – P. 815–829.

50. Bernier, S. P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A. S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Ghigo, J.-M., Beloin, C. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin // PLoS Genetics. – 2013. – V. 9. – № 1. – e1003144

51. Berridge, M.V., Tan, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction // Archives of biochemistry and biophysics. – 1993. – V. 303. – № 2. – P. 474–482.

52. Bhattacharya, M., Wozniak, D. J., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. Prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms // Expert review of anti-infective therapy. – 2015. – V. 13. – № 12. – P. 1499–1516.

53. Biaggini, K., Barbey, C., Borrel, V., Feuilloley, M., Déchelotte, P., Connil, N. The pathogenic potential of *Pseudomonas fluorescens* MFN1032 on enterocytes can be modulated by serotonin, substance P and epinephrine // Archives of microbiology. – 2015. – V. 197. – № 8. – P. 983–990

54. Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M.C., Tassani, S., Piva, F., Perez-Amodio, S., Strippoli, P., Canaider, S. An estimation of the number of cells in the human body // Annals of human biology. – 2013. – V. 40. – № 6. – P. 463–471.

55. Billings, N., Ramirez Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., Ribbeck, K. The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // PLoS Pathogens. – 2013. – V. 9. – № 8. – e1003526.

56. Blennow, O., Westling, K., Fröding, I., Özenci, V. Pneumonia and Bacteremia Due to *Kytococcus schroeteri* // Journal of clinical microbiology. – 2012. – V. 50. – № 2. – P. 522–524.
57. Blokesch, M., Schoolnik, G.K. The extracellular nuclease Dns and its role in natural transformation of *Vibrio cholerae* // Journal of bacteriology. – 2008. – V. 190, - P. 7232–7240
58. Boehm, A., Steiner, S., Zaehring, F. Second messenger signaling governs *Escherichia coli* biofilm induction upon ribosomal stress // Molecular Microbiology. – 2009. V. – 72. – P. 1500–1516.
59. Boles, B.R., Singh, P.K. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities // PNAS USA. – 2008. – V. 105. – № 34. – P. 12503–12508.
60. Bompard, Y., Lambert, T., Gantzer, A., Chastel, A., Voinnesson, A., Aufrant, C. Use of imipenem-cilastatin in neonatal septicemias caused by gram-negative bacilli multiresistant to beta-lactam antibiotics // Pathologie biologique (Paris). – 1988. – V. 36. – № 5. – P. 521–524.
61. Borrero, N.V., Bai, F., Perez, C., Duong, B.Q., Rocca, J.R., Jin, S., Huigens, R.W. 3rd. Phenazine antibiotic inspired discovery of potent bromophenazine antibacterial agents against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* // Organic & biomolecular chemistry. – 2014. – V. 12. – № 6. – P. 881–886.
62. Boutcher, S.H., Maw, G.J., Taylor, N.A. Forehead skin temperature and thermal sensation during exercise in cool and thermoneutral environments // Aviation, space, and environmental medicine. – 1995. – V. 66. – № 11. – P. 1058–1066.
63. Boyanova L. Stress hormone epinephrine (adrenaline) and norepinephrine (noradrenaline) effects on the anaerobic bacteria // Anaerobe. – 2017. – V. 44. – P. 13–19.
64. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical biochemistry. – 1976. – V. 72. – P. 248–254.
65. Brackman, G., Breyne, K., De Rycke, R., Vermote, A., Van Nieuwerburgh, F., Meyer, E., Van Calenbergh, S., Coenye, T. The quorum sensing inhibitor hamamelitannin increases antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms by affecting peptidoglycan biosynthesis and eDNA release // Scientific Reports. – 2016. – V. 6. – 20321.
66. Brown, A.F., Leech, J.M., Rogers, T.R., McLoughlin, R.M. *Staphylococcus aureus* colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design // Frontiers in immunology. – 2013. – V. 4. – 507.
67. Brzuszkiewicz, E., Weiner, J., Wollherr, A., Thürmer, A., Hüpeden, J., Lomholt, H.B., Kilian, M., Gottschalk, G., Daniel, R., Mollenkopf, H.-J., Meyer, T.F., Brüggemann, H. Comparative genomics and transcriptomics of *Propionibacterium acnes* // PLoS ONE. – 2011. – V. 6. – № 6. – e21581.

68. Budzyńska, A., Różalska, S., Sadowska, B., Różalska, B. *Candida albicans/Staphylococcus aureus* dual-species biofilm as a target for the combination of essential oils and fluconazole or mupirocin // *Mycopathologia*. – 2017. – V. 182. – № 11. – P. 989–995.
69. Burger, P., Landreau, A., Watson, M., Janci, L., Cassisa, V., Kempf, M., Azoulay, S., Fernandez, X. Vetiver essential oil in cosmetics: what is new // *Medicines*. – 2017. – V. 4. – № 2. – 41.
70. Büttner, H., Mack, D., Rohde, H. Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2015. – V. 5. – 14.
71. Camilli, A., Bassler, B.L. Bacterial small-molecule signaling pathways // *Science*. – 2006. – V. 311. – № 5764. – P. 1113–1116.
72. Campoccia, D., Montanaro, L., Ravaoli, S., Pirini, V., Cangini, I., Arciola, C.R. Exopolysaccharide production by *Staphylococcus epidermidis* and its relationship with biofilm extracellular DNA // *International journal of artificial organs*. – 2011. – V. 34. – № 9. – P. 832–839.
73. Cao, Y., Zhang, Z., Ling, N., Yuan, Y., Zheng, X., Shen, B., Shen, Q. *Bacillus subtilis* SQR9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots // *Biology and fertility of soils*. – 2011. – V. 47. – P. 495–506.
74. Caparrós-Martín, J. A., McCarthy-Suárez, I., Culiáñez-Macià, F. A. HAD hydrolase function unveiled by substrate screening: enzymatic characterization of *Arabidopsis thaliana* subclass I phosphosugar phosphatase AtSgpp // *Planta*. – 2013. – V. 237. – № 4. – P. 943–954.
75. Carey, R.M., Chen, B., Adappa, N.D., Palmer, J.N., Kennedy, D.W., Lee, R.J., Cohen, N. A. Human upper airway epithelium produces nitric oxide in response to *Staphylococcus epidermidis* // *International forum of allergy rhinology*. – 2016. – V. 6. – № 12. – P. 1238–1244.
76. Chagnot, C., Zorgani, M.A., Astruc, T., Desvaux, M. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective // *Frontiers in microbiology*. – 2013. – V. 4. – 303.
77. Chai, Y., Beauregard, P.B., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis* // *mBio*. – 2012. – V. 3. – e.00184–12
78. Chan, J.F.W., Wong, S.S.Y., Leung, S.S. M., Fan, R.Y.Y., Ngan, A.H.Y., To, K.K. W., Lau, S.K., Yuen, K.Y., Woo, P.C.Y. First report of chronic implant-related septic arthritis and osteomyelitis due to *Kytococcus schroeteri* and a review of human *K. schroeteri* infections // *Infection*. – 2012. – V. 40. – № 5. – P. 567–573.
79. Chang, W.-S., van de Mortel, M., Nielsen, L., Nino de Guzman, G., Li, X., & Halverson, L. J. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions // *Journal of bacteriology*. – 2007. – V. 189. – 22. – P. 8290–8299.

80. Chao, E.S., Dunbar, D., Kaminsky, L.S. Intracellular lactate dehydrogenase concentration as an index of cytotoxicity in rat hepatocyte primary culture // *Cell biology and toxicology*. – 1988. – V. 4. – № 1. – P. 1–11.
81. Chen, Y., Shen, X., Peng, H., Hu, H., Wang, W., Zhang, X. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium // *Genomics Data*. – 2015a. – V. 4. – P. 33–42.
82. Chen, Y., Wang, X.Y., Huang, Y.C., Zhao, G.Q., Lei, Y.J., Ye, L.H., Huang, Q.B., Duan, W.S. Study on the structure of *Candida albicans-Staphylococcus epidermidis* mixed species biofilm on polyvinyl chloride biomaterial // *Cell biochemistry and biophysics*. – 2015. – V. 73. – № 2. – P. 461–468.
83. Cheung, G.Y.C., Rigby, K., Wang, R., Queck, S.Y., Braughton, K.R., Whitney, A.R., Teintze, M., DeLeo, F.R., Otto, M. *Staphylococcus epidermidis* strategies to avoid killing by human neutrophils // *PLoS Pathogens*. – 2010. – V. 6. – № 10. – e1001133.
84. Chiba, A., Sugimoto, S., Sato, F., Hori, S., Mizunoe, Y. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability // *Microbial biotechnology*. – 2015. – V. 8. – № 3. – P. 392–403.
85. Chiller, K., Selkin, B.A., Murakawa, G. J. Skin microflora and bacterial infections of the skin // *Journal of investigative dermatology symposium proceedings*. – 2001. – V. 6. – 3. – P. 170–174a.
86. Chiriac, A., Brzezinski, P., Foia, L., Marincu, I. Chloronychia: green nail syndrome caused by *Pseudomonas aeruginosa* in elderly persons // *Clinical interventions in aging*. – 2015. – V. 10. – P. 265–267.
87. Chong, J., Quach, C., Blanchard, A.C., Poliquin, P.G., Golding, G.R., Laferrière, C., Lévesque, S. Molecular epidemiology of a vancomycin-intermediate heteroresistant *Staphylococcus epidermidis* outbreak in a neonatal intensive care unit // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2016. – V. 60. – № 10. – P. 5673–5681.
88. Christensen, G.J., Brüggemann, H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians // *Beneficial microbes*. – 2014. – V. 5. – № 2. – P. 201–215.
89. Christensen, G.J.M., Scholz, C.F.P., Enghild, J., Rohde, H., Kilian, M., Thürmer, A., Brzuszkiewicz, E., Lomholt, H.B., Brüggemann, H. Antagonism between *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* and its genomic basis // *BMC Genomics*. – V. 17. – 152.
90. Coenye, T., Peeters E., Nelis, H.J. Biofilm formation by *Propionibacterium acnes* is associated with increased resistance to antimicrobial agents and increased production of putative virulence factors // *Research in microbiology*. – 2007. – V. 158. – № 4. – P. 386–392.

91. Coates, P., Vyakrnam, S., Eady, E.A., Jones, C.E., Cove, J.H., Cunliffe, W.J. Prevalence of antibiotic-resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study // *British journal of dermatology*. – 2002. – V. 146. – № 5. – P. 840–848.
92. Cole, S.J., Records, A.R., Orr, M.W., Linden, S.B., Lee, V.T. Catheter-associated urinary tract infection by *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by exopolysaccharide-independent biofilms // *Infection and immunity*. – 2014. – V. 82. – № 5. – P. 2048–2058.
93. Counotte, G.H., de Groot, M., Prins, R.A. Kinetic parameters of lactate dehydrogenases of some rumen bacterial species, the anaerobic ciliate *Isotricha prostoma* and mixed rumen microorganisms // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1980. – V. 46. – № 4. – P. 363–381.
94. Crane, J. K., Hohman, D. W., Nodzo, S. R., Duquin, T. R. Antimicrobial Susceptibility of Propionibacterium acnes Isolates from Shoulder Surgery // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – V. 57. – № 7. – P. 3424–3426.
95. CytoTox96® [Электронный ресурс] / CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Technical Bulletin // Promega. – 2018. – Режим доступа: <https://france.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol>
96. Daeschlein, G., Scholz, S., Ahmed, R., von Woedtke, T., Haase, H., Niggemeier, M., Kindel, E., Brandenburg, R., Weltmann, K.D., Juenger M. Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma // *Journal of hospital infections*. – 2012. – V. 81. – № 3. – P. 177–183.
97. Dai L., Yang L., Parsons C., Findlay, V.J., Molin, S., Qin, Z. *Staphylococcus epidermidis* recovered from indwelling catheters exhibit enhanced biofilm dispersal and “self-renewal” through downregulation of *agr* // *BMC Microbiology*. – 2012. – V. 12. – P. 1–9.
98. Dagorn, A., Chapalain, A., Mijouin, L., Hillion, M., Duclairoir-Poc, C., Chevalier, S., Taupin, L., Orange, N., Feuilleley, M. G. J. Effect of GABA, a bacterial metabolite, on *Pseudomonas fluorescens* surface properties and cytotoxicity // *International journal of molecular sciences*. – 2013. – V. 14. – № 6. – P. 12186–12204.
99. Das, T., Krom, B.P., van der Mei, H.C., Bussher, H.J., Sharma, P.K. DNA-mediated bacterial aggregation is dictated by acid-base interactions // *Soft Matter*. – 2011. – V. 7. – P. 2927–2935.
100. Das, M. C., Sandhu, P., Gupta, P., Rudrapaul, P., De, U.C., Tribedi, P., Akhter, Y., Bhattacharjee, S. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Vitexin: A combinatorial study with azithromycin and gentamicin // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6. – P. 23347.

101. Davis, S.C., Ricotti, C., Cazzaniga, A., Welsh, E., Eaglstein, W.H., Mertz, P.M. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization *in vivo* // Wound repair and regeneration. – 2008. – V. 16. – № 1. – P. 23–29.
102. de Kievit, T.R. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Environmental microbiology – V. 11. – 2. – P. 279–288.
103. Debois, D., Hamze, K., Guérineau, V., Le Caër, J.P., Holland, I.B., Lopes, P., Ouazzani, J., Séror, S.J., Brunelle, A., Laprévote, O. *In situ* localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry // Proteomics. – 2008. – V. 8. – P. 3682–3691
104. DeLeon, S., Clinton, A., Fowler, H., Everett, J., Horswill, A.R., Rumbaugh, K.P. Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* wound model // Infection and immunity. – 2014. – V. 82. – № 11. – P. 4718–4728.
105. Deredjian, A., Colinon, C., Hien, E., Brothier, E., Youenou, B., Cournoyer, B., Dequiedt, S., Hartmann, A., Jolivet, C., Houot, S., Ranjard, L., Saby, N.P.A., Nazaret, S. Low occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in agricultural soils with and without organic amendment // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2014. – V. 4. – 53.
106. Desbois, A.P., Lawlor, K.C. Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus* // Marine drugs. – V. 11. – № 11. – P. 4544–4557. <http://doi.org/10.3390/md11114544>
107. Dessinioti, C., Katsambas, A. *Propionibacterium acnes* and antimicrobial resistance in acne // Clinics in dermatology. – 2016. – V. 35. – № 2. – P. 163–167.
108. Dische, Z. New color reactions for determination of sugars in polysaccharides // Methods in biochemical analysis. – 1955. – V. 2. – P. 313–358.
109. Dogsa, I., Brložnik, M., Stopar, D., Mandić-Mulec, I. Exopolymer diversity and the role of levan in *Bacillus subtilis* biofilms // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – 4. – e62044.
110. Doroshenko, N., Tseng, B.S., Howlin, R.P., Deacon, J., Wharton, J.A., Thurner, P.J., Gilmore, B.F., Parsek, M.R., Stoodley, P. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2014. – V. 58. – № 12. – P. 7273–7282.
111. Dreno, B., Martin, R., Moyal, D., Henley, J. B., Khammari, A., Seité, S. Skin microbiome and acne vulgaris: *Staphylococcus*, a new actor in acne // Experimental dermatology. – 2017. – V. 26. – № 9. – P. 798–803.
112. Dreywood, R. Qualitative test for carbohydrate material // Industrial & engineering chemistry analytical edition. – 1946. – V. 18. – № 8. – P. 499.

113. Dutta, D., Cole, N., Willcox, M. Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses // *Molecular vision*. – 2012. – V. 18. – P. 14–21.
114. Eau thermal d'Uriage [Электронный ресурс] / Eau thermal Uriage // Uriage ©. – 2018. – Режим доступа: <https://www.uriage.com/FR/fr/produits/eau-thermale-d-uriage>
115. Edwards, B.S., Zimmerman, R.S., Schwab, T.R., Heublein, D.M., Burnett, Jr. J.C. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor // *Circulation research*. – 1988. – V. 62. – P. 191–195.
116. El Karim, I.A., Linden, G.J., Orr, D.F., Lundy, F.T. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of micro-organisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites // *Journal of neuroimmunology*. – 2008. – V. 200 – № 1 – 2. – P. 11 – 16.
117. El-Halfawy, O. M., Valvano, M.A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity // *Clinical microbiology reviews*. – 2015. – V. 28. – № 1. – P. 191–207.
118. Elfatoiki, F.Z., El Azhari, M., El Kettani, A., Serhier, Z., Othmani, M.B., Timinouni, M., Benchikhi, H., Chileb, S., Fellah, H. Psoriasis and *Staphylococcus aureus* skin colonization in Moroccan patients // *The pan african medical journal*. – 2016. – V. 23. – 33.
119. Emmadi, N.R., Atmakur, K., Bingi, C., Godumagadda, N.R., Chityal, G.K., Nanubolu, J.B. Regioselective synthesis of 3-benzyl substituted pyrimidino chromen-2-ones and evaluation of anti-microbial and anti-biofilm activities // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2014. – V. 24. – № 2. – P. 485–489.
120. Enault, J., Saguet, T., Yvergnaux, F., Feuilloley, M.G.J. PS291®, a rhamnose-rich polysaccharide obtained by fermentation, is reducing *Propionibacterium acnes* adhesion and biofilm formation activity // *IFSCC 2014 conference proceedings*. – 2014. – P.2801–2810.
121. Eroshenko, D., Polyudova, T., Korobov, V. N-acetylcysteine inhibits growth, adhesion and biofilm formation of Gram-positive skin pathogens // *Microbial pathogenesis*. – 2017. – V. 105. – P. 145–152.
122. Estes, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. Impacting patient care // *Critical care nursing quarterly*. – 2011. – V. 34. – № 2. – P. 101–109
123. Federman, C., Ma, C., Biswas, D. Major components of orange oil inhibit *Staphylococcus aureus* growth and biofilm formation, and alter its virulence factors // *Journal of medical microbiology*. – 2016. – V. 65. – № 7. – P. 688–695.
124. Fedtke, I., Mader, D., Kohler, T., Moll, H., Nicholson, G., Biswas, R., Henseler, K., Gotz, F., Zahringer, U., Peschel, A. A *Staphylococcus aureus* *ypfP* mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity // *Molecular microbiology*. – 2007. – V. 65. – № 4. – P. 1078–1091.

125. Feraco, D., Blaha, M., Khan, S., Green, J.M., Plotkin, B.J. Host environmental signals and effects on biofilm formation // *Microbial pathogenesis*. – 2016. – V. 99. – P. 253–263.
126. Fernández, L., Álvarez-Ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Kocíncová, D., Lam, J.S., Martínez, J.L., Hancock, R.E.W. Characterization of the polymyxin B resistome of *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – V. 57. – № 1. – P. 110–119.
127. Fernández, M., Porcel, M., de la Torre, J., Molina-Henares, M. A., Daddaoua, A., Llamas, M. A., Roca, A., Carriel, V., Garzon, I., Ramos, J.L., Alaminos, M., Duque, E. Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – V. 6. – P. 871.
128. Ferreira, C., Pereira, A.M., Pereira, M.C., Melo, L.F., Simões, M. Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyltrimethylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens* // *Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2011. – V. 66. – № 5. – P. 1036–1043.
129. Feuerstein, R., Kolter, J., Henneke P. Dynamic interactions between dermal macrophages and *Staphylococcus aureus* // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2017. – V. 101. – № 1. – P. 99–106.
130. Feuillolay, C., Pecastaings, S., Le Gac, C., Fiorini-Puybaret, C., Luc, J., Joulia, P., Roques, C. A *Myrtus communis* extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of *Propionibacterium acnes* biofilms to antibiotics used in acne vulgaris // *Phytomedicine*. – 2016. – V. 23. – № 3. – P. 307–315.
131. FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain. [Электронный ресурс] / Invitrogen: FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain // Thermo fisher scientific. – 3 – March–2009. – Режим доступа: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp10318.pdf>
132. Fitz-Gibbon, S., Tomida, S., Chiu, B. H., Nguyen, L., Du, C., Liu, M., Elashoff, D., Erfé, M. C., Loncaric, A., Kim, J., Modlin, R. L., Miller, J. F., Sodergren, E., Craft, N., Weinstock, G. M., Li, H. *Propionibacterium acnes* strain populations in the human skin microbiome associated with acne // *Journal of investigative dermatology*. – 2013. – V. 133. – № 9. – P. 2152–2160.
133. Flemming, H.C., Neu, T.R., Wozniak, D.J., 2007. The EPS matrix: the ‘house of biofilm cells’ // *Journal of bacteriology*. – 2007. – V. 189. – P. 7945–7947
134. Forbes, S., Latimer, J., Bazaid, A., McBain, A. J. Altered competitive fitness, antimicrobial susceptibility, and cellular morphology in a triclosan-induced small-colony variant of *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2015. – V. 59. – № 8. – P. 4809–4816.
135. Fowler, J.F. Jr., Stege, G.C. 3rd. Hot tub (*Pseudomonas*) folliculitis // *The journal of the Kentucky medical association*. – 1990. – V. 88. – № 2, – P. 66–68.

136. Furiga, A., Lajoie, B., El Hage, S., Baziard, G., Roques, C. Impairment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to antibiotics by combining the drugs with a new quorum-densing inhibitor // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2016. – V. 60. – № 3. – P. 1676–1686.
137. Furustrand Tafin, U., Corvec, S., Betrisey, B., Zimmerli, W., Trampuz, A. Role of Rifampin against *Propionibacterium acnes* Biofilm *In Vitro* and in an Experimental Foreign-Body Infection Model // Antimicrobial agents and chemotherapy. – V. 56. – № 4. – P. 1885–1891.
138. Gallique, M., Decoin, V., Barbey, C., Rosay, T., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Merieau, A. Contribution of the *Pseudomonas fluorescens* MFE01 type VI secretion system to biofilm formation // PLoS ONE. – V. 12. – № 1. – e0170770.
139. Gannesen, A.V., Borrel, V., Lefeuvre, L., Netrusov, A.I., Plakunov, V.K., Feuilloley, M.G.J. Effect of two cosmetic compounds on the growth, biofilm formation activity, and surface properties of acneic strains of *Cutibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus* // MicrobiologyOpen. – 2018. – e00659.
140. Garrido-Sanz, D., Meier-Kolthoff, J. P., Göker, M., Martín, M., Rivilla, R., Redondo-Nieto, M. Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex // PLoS ONE. – 2016. – V. 11. – № 2. – e0150183.
141. Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., Nychas, G.-J. Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – № 10. – e77276. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0077276>
142. Gillis, R.J., White, K.G., Choi, K.-H., Wagner, V., Schweizer, H.P., Iglewski, B.H. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2005. – V. 49. – № 9. – P. 3858–3867.
143. Gillis, R.J., Iglewski, B.H. Azithromycin retards *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation // Journal of clinical microbiology. – 2004. – V. 42. – № 12. – P. 5842–5845.
144. Goggin, R., Jardeleza, C., Wormald, P.J., Vreugde, S. Corticosteroids directly reduce *Staphylococcus aureus* biofilm growth: an in vitro study // Laryngoscope. – 2014. – V. 124. – № 3. – P. 602–607.
145. Gökçen, A., Vilcinskas, A., & Wiesner, J. Methods to identify enzymes that degrade the main extracellular polysaccharide component of *Staphylococcus epidermidis* biofilms // Virulence – 2013. – V. 4. – 3. – P. 260–270.
146. Gong, J.Q., Lin, L., Lin, T., Hao, F., Zeng, F.Q., Bi, Z.G., Yi, D., Zhao, B. Skin colonization by *Staphylococcus aureus* in patients with eczema and atopic dermatitis and relevant combined topical therapy: a double-blind multicentre randomized controlled trial // British journal of dermatology. – 2006. – V. 155. – № 4. – P. 680–687.

147. González, S., Fernández, L., Campelo, A. B., Gutiérrez, D., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P. The behavior of *Staphylococcus aureus* dual-species biofilms treated with bacteriophage phiIPLA-RODI depends on the accompanying microorganism // Applied and environmental microbiology. – 2017. – V. 83. – 3. – e02821–16.
148. Green, B.N., Johnson, C.D., Egan, J.T., Rosenthal, M., Griffith, E.A., Evans, M.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists // Journal of chiropractic medicine. – 2012. – V. 11. – № 1. – P. 64–76.
149. Grice, E.A., Kong, H.H., Conlan, S., Deming, C.B., Davis, J., Young, A.C.; NISC Comparative Sequencing Program, Bouffard, G.G., Blakesley, R.W., Murray, P.R., Green, E.D., Turner, M.L., Segre, J.A. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome // Science. – 2009. – V. 324. – № 5931. – P. 1190–1192.
150. Gross, M., Cramton, S. E., Götz, F., Peschel, A. Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces // Infection and immunity. – 2001. – V. 69. – № 5. – P. 3423–3426.
151. Gui, Z., Wang, H., Ding, T., Zhu, W., Zhuang, X., Chu, W. Azithromycin reduces the production of α -hemolysin and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* // Indian journal of microbiology. – 2014. – V. 54. – № 1. – P. 114–117.
152. Gunther, N.W., Nuñez, A., Fett, W., Solaiman, D.K.Y. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium // Applied and environmental microbiology. – 2005. – V. 71. – 5. – P. 2288–2293.
153. Gutiérrez, D., Briers, Y., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R., & García, P. Role of the pre-neck appendage protein (Dpo7) from phage vB_SepiS-phiIPLA7 as an anti-biofilm agent in *Staphylococcal* Species // Frontiers in microbiology. 2015. – V. 6. – 1315.
154. Gwisai, T., Hollingsworth, N. R., Cowles, S., Tharmalingam, N., Mylonakis, E., Fuchs, B. B., Shukla, A. Repurposing niclosamide as a versatile antimicrobial surface coating against device-associated, hospital-acquired bacterial infections // Biomedical materials (Bristol, England). – 2017. – V. 12. – № 4. – 045010.
155. Hanafy, R.A., Couger, M.B., Baker, K., Murphy, C., O’Kane, S.D., Budd, C., French, D.P., Youssef, N. Draft genome sequence of *Micrococcus luteus* strain O’Kane implicates metabolic versatility and the potential to degrade polyhydroxybutyrates // Genomics Data. – 2016. – V. 9. – P. 148–153.
156. Hara, T., Matsui, H., Shimizu, H. Suppression of microbial metabolic pathways inhibits the generation of the human body odor component diacetyl by *Staphylococcus* spp // PLoS ONE. – 2014. – V. 9. – № 11. - e111833.

157. Hansen, C.J., Burnell, K.K., Brogden, K.A. Antimicrobial activity of Substance P and Neuropeptide Y against laboratory strains of bacteria and oral microorganisms // *Journal of neuroimmunology*. – 2006. – V. 177. – № 1–2. – P. 215–218.
158. Hardjo Lugito, N. P., Nawangsih, C., Moksidy, J.C., Kurniawan, A., Tjiang, M.M. Diabetic foot gangrene patient with multi-drug resistant *Pseudomonas Putida* infection in Karawaci district, Indonesia // *Journal of global infectious diseases*. – 2015. – V. 7. – № 1. – P. 37–39. <http://doi.org/10.4103/0974-777X.146378>
159. Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S.J., Tolker-Nielsen, T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation tolerance, and dispersal // *FEMS immunology and medical microbiology*. – 2010. – V. 59. – № 3. – P. 253–268.
160. Heijstra, B., Pichler, F., Liang, Q., Blaza, R.G., Turner, S.J. Extracellular DNA and Type IV pili mediate surface attachment by *Acidovorax temperans* // *Antonie van Leeuwenhoek*. 2009. – V. 95. – P. 343–349.
161. Herman, A., Herman, A.P., Domagalska, B.W., Młynarczyk, A. Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion // *Indian journal of microbiology*. – 2013. – V. 53. – № 2. – P. 232–237.
162. Hess, D.J., Henry-Stanley, M.J., Wells, C.L. The natural surfactant glycerol monolaurate significantly reduces development of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* biofilms // *Surgical infections*. – 2015. – V. 16. – № 5. – P. 538–542.
163. Hesse, C., Schulz, F., Bull, C.T., Shaffer, B.T., Yan, Q., Shapiro, N., Hassan, K.A., Varghese, N., Elbourne, L.D. H., Paulsen I.T., Kyrpides N., Woyke T., Loper J.E. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas spp* // *Environmental microbiology*. – 2018. – doi: 10.1111/1462-2920.14130
164. Hillion, M., Mijouin, L., Jaouen, T., Barreau, M., Meunier, P., Lefeuvre, L., Lati, E., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J. Comparative study of normal and sensitive skin aerobic bacterial populations // *MicrobiologyOpen*. – 2013. – V. 2. – № 6. – P. 953–961.
165. Hobley, L., Ostrowski, A., Rao, F.V., Bromley, K.M., Porter, M., Prescott, A.R., MacPhee, C.E., van Aalten, D.M., Stanley-Wall, N.R. BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm // *PNAS USA*. – 2013. – V. 110. – № 33. – P. 13600-13605
166. Holland, C., Mak, T. N., Zimny-Arndt, U., Schmid, M., Meyer, T. F., Jungblut, P. R., Brüggemann, H. Proteomic identification of secreted proteins of *Propionibacterium acnes* // *BMC Microbiology*. – 2010. – V. 10. – 230.
167. Hon, K.L., Tsang, Y.C., Pong, N.H., Leung, T.F., Ip, M. Exploring *Staphylococcus epidermidis* in atopic eczema: friend or foe? // *Clinical and experimental dermatology*. – 2010. – V. 41. – № 6. – P. – 659–663.

168. Hong, S.-W., Kim, M.-R., Lee, E.-Y., Kim, J. H., Kim, Y.-S., Jeon, S. G., Yang, J.M., Lee, B.-J., Pyun, B.-Y., Gho, Y.S., Kim, Y.-K. Extracellular vesicles derived from *Staphylococcus aureus* induce atopic dermatitis-like skin inflammation // *Allergy*. – 2011. – V. 66. – M3. – P. 351–359.
169. Hu W., Li L., Sharma S., McHardy, I., Lux, R., Yang, Z., He, X., Gimzewski, J.K., Li, Y., Shi, W. DNA builds and strengthens the extracellular matrix in *Myxococcus xanthus* biofilms by interacting with exopolysaccharides // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – № 12. – e51905.
170. Huang, R., Li, M., Gregory, R.L. Bacterial interactions in dental biofilm // *Virulence*. – 2011. – V. 2. – 5. – P. 435–444.
171. Imperi, F., Massai, F., Pillai, C.R., Longo, F., Zennaro, E., Rampioni, G., Visca, P., Leoni, L. New life for an old drug: the anthelmintic drug niclosamide inhibits *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2013. – V. 57. – P. 996–1005.
172. Inbaraj, B.S., Chiu, C.P., Ho, G.H., Yang, J., Chen, B.H. Effects of temperature and pH on adsorption of basic brown 1 by the bacterial biopolymer poly(γ -glutamic acid) // *Bioresource technology*. – 2008. – V. 99. – P. 1026–1035
173. Iñiguez-Moreno, M., Gutiérrez-Lomelí, M., Guerrero-Medina, P.J., Avila-Novoa, M.G. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite // *Brazilian journal of microbiology*. – 2018. – V. 49. – № 2. – P. 310–319.
174. Iorio, N.L., Caboclo, R.F., Azevedo, M.B., Barcellos, A.G., Neves, F.P., Domingues, R.M., dos Santos, K.R. Characteristics related to antimicrobial resistance and biofilm formation of widespread methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* ST2 and ST23 lineages in Rio de Janeiro hospitals, Brazil // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2012. – V. – V. 72. – № 1. – P. 32–40.
175. Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., Mizunoe Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization // *Nature*. – 2010. – V. 465. – № 7296. – P. 346–349.
176. Isard, O., Knol, A.-C., Castex-Rizzi, N., Khammari, A., Charveron, M., & Dréno, B. Cutaneous induction of corticotropin releasing hormone by *Propionibacterium acnes* extracts // *Dermato-endocrinology*. – 2009. – V. 1. – № 2. – P. 96–99.
177. Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B., Kaplan, J.B. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms // *Applied and environmental microbiology*. – 2008. – V. 74. – 2. – P. 470–476.

178. Jahns, A.C., Alexeyev, O.A. Three dimensional distribution of *Propionibacterium acnes* biofilms in human skin // *Experimental dermatology*. – 2014. – V. 23. – P. 687–689.
179. Jahns, A.C., Eilers, H., Alexeyev, O.A. Transcriptomic analysis of *Propionibacterium acnes* biofilms in vitro // *Anaerobe*. – 2016. – V. 42. – P. 111–118.
180. Jahns, A. C., Lundskog, B., Ganceviciene, R., Palmer, R. H., Golovleva, I., Zouboulis C. C., McDowell A., Patrick S., Alexeyev O. A. An increased incidence of *Propionibacterium acnes* biofilms in acne vulgaris: a case-control study // *British journal of dermatology*. – 2012. – V. 167. – № 1. – P. 50-58.
181. Janek, T., Lukaszewicz, M., Krasowska, A., 2012. Antiadhesive activity of the biosurfactant pseudofactin II secreted by the Arctic bacterium *Pseudomonas fluorescens* BD5 // *BMC Microbiology*. – 2012. – V. 23. – P. 12–24.
182. Joo, H.-S., Chan, J.L., Cheung, G.Y.C., Otto, M. (2010). Subinhibitory concentrations of protein synthesis-inhibiting antibiotics promote increased expression of the *agr* virulence regulator and production of phenol-soluble modulins and cytolysins in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – V. 54. – № 11. – P. 4942–4944.
183. Kalia, V.C. Quorum sensing vs quorum quenching: a battle with no end in sight / V.C. Kalia. – New Delhi : Springer, 2009. – 391 p.
184. Kang, M., Ko, Y.-P., Liang, X., Ross, C. L., Liu, Q., Murray, B.E., Höök, M. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway // *The journal of biological chemistry*. – 2013. – V. 288. – № 28. – P. 20520–20531.
185. Kania, R.E., Lamers, G.E., van de Laar, N., Dijkhuizen, M., Lagendijk, E., Huy, P.T., Herman, P., Hiemstra, P., Grote, J.J., Frijns, J., Bloemberg, G.V. Biofilms on tracheoesophageal voice prostheses: a confocal laser scanning microscopy demonstration of mixed bacterial and yeast biofilms // *Biofouling*. – 2010. – V. 26. – 5. – P. 519–526.
186. Kaplan, J.B., Jabbouri, S., Sadovskaya, I. Extracellular DNA-dependent biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* RP62A in response to subminimal inhibitory concentrations of antibiotics // *Research in microbiology*. – 2011. – V. 162. – 5. – P. 535–541
187. Karna, S. L. R., D'Arpa, P., Chen, T., Qian, L.-W., Fourcaudot, A. B., Yamane, K., Chen, P., Abercrombie, J.J., You, T., Leung, K. P. RNA-Seq transcriptomic responses of full-thickness dermal excision wounds to *Pseudomonas aeruginosa* acute and biofilm infection // *PLoS ONE*. – 2016. – V. 11. – № 10. – e0165312.
188. Kean, R., Rajendran, R., Haggarty, J., Townsend, E. M., Short, B., Burgess, K. E., Lang, S., Millington, O., Mackay, W.G., Williams, C., Ramage, G. *Candida albicans* mycofilms

support *Staphylococcus aureus* colonization and enhances miconazole resistance in dual-species interactions // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – V. 8. – 258.

189. Khorvash, F., Abdi, F., Kashani, H. H., Naeini, F.F., Narimani, T. *Staphylococcus aureus* in acne pathogenesis: a case-control study // *North American journal of medical sciences*. – 2012. – V. 4. – № 1. – P. 573–576.

190. Kim, J.-H., Yu, D., Eom, S.-H., Kim, S.-H., Oh, J., Jung, W.-K., Kim, Y.-M. Synergistic antibacterial effects of chitosan-caffeic acid conjugate against antibiotic-resistant acne-related bacteria // *Marine Drugs*. – 2017a. – V. 15. – № 6. – 167.

191. Kim, M.K., Zhao, A., Wang, A., Brown, Z.Z., Muir, T.W., Stone, H.A., Bassler, B. L. Surface-attached molecules control *Staphylococcus aureus* quorum sensing and biofilm development // *Nature microbiology*. – 2017. – V. 2. – 17080.

192. Kleinschmidt, S., Huygens, F., Faoagali, J., Rathnayake, I.U., Hafner, L.M. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia // *Future microbiology*. – 2015. – V. 10. – 11. – P. 1859–1879.

193. Kloos, W.E., Tornabene, T.G., Schleifer, K.H. Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus lylae* and *Micrococcus kristinae* // *International journal of systematic bacteriology*. – 1974. – V. 24. – № 1. – P. 79–101.

194. Knowles, J. R., Roller, S., Murray, D. B., Naidu, A. S. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* // *Applied and environmental microbiology*. 2005. – V. 71. – № 2. – P. 797–803.

195. Köhler, T., Dumas, J.L., Van Delden, C. Ribosome protection prevents azithromycin-mediated quorum-sensing modulation and stationary phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2007. – V. 51. – № 12. – P. 4243–4248.

196. Kondakova, T., Catovic, C., Barreau, M., Nusser, M., Brenner-Weiss, G., Chevalier, S., Dionnet, F., Orange, N., Poc, C.D. Response to gaseous NO₂ air pollutant of *P. fluorescens* airborne strain MFAF76a and clinical strain MFN1032 // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 7. – 379.

197. Kong, E.F., Tsui, C., Kucharíková, S., Van Dijck, P., Jabra-Rizk, M.A. Modulation of *Staphylococcus aureus* response to antimicrobials by the *Candida albicans* quorum sensing molecule farnesol // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2017. – V. 61. – № 12. – e01573–17.

198. Kong, E.F., Tsui, C., Kucharíková, S., Andes, D., Van Dijck, P., Jabra-Rizk, M.A. Commensal protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobials by *Candida albicans* biofilm matrix // *mBio*. – 2016. – V. 7. – № 5. – e01365–16.

199. Koniarová, I. Biochemical and physiologic properties of strains of *Propionibacterium acnes* isolated from the rumen of calves and lambs // *Veterinarni medicina (Praha)*. – 1993. – V. 38. – № 1. – P. 43–52.
200. Krause, J., Geginat, G., & Tammer, I. Prostaglandin E₂ from *Candida albicans* stimulates the growth of *Staphylococcus aureus* in mixed biofilms // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. – 8. – e0135404.
201. Kreger, B.E., Craven, D.E., Carling, P.C., McCabe, W.R. Gram-negative bacteremia. III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients // *The American journal of medicine*. – 1980. – V. 68. – № 3. – P. 332–343.
202. Kremmydas, G.F., Tampakaki, A.P., & Georgakopoulos, D.G. Characterization of the biocontrol activity of *Pseudomonas fluorescens* strain X reveals novel genes regulated by glucose // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – № 4. – e61808.
203. Kumita, W., Saito, R., Sato, K., Ode, T., Moriya, K., Koike, K., Chida, T., Okamura, N. Molecular characterizations of carbapenem and ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas putida* // *Journal of infection and chemotherapy*. – 2009. – V. 15. – № 1. – P. 6–12.
204. Kuroda, H., Kuroda, M., Cui, L., Hiramatsu, K. Subinhibitory concentrations of beta-lactam induce haemolytic activity in *Staphylococcus aureus* through the SaeRS two-component system // *FEMS Microbiology letters*. – 2007. – V. 268. – № 1. – P. 98–105.
205. Laba, W., Choinska, A., Rodziewicz, A., Piegza, M. Keratinolytic abilities of *Micrococcus luteus* from poultry waste // *Brazilian journal of microbiology*. – 2015. – V. 46. – № 3. – P. 691–700.
206. Lacey, K.A., Geoghegan, J.A., McLoughlin, R.M. The role of *Staphylococcus aureus* virulence factors in skin infection and their potential as caccine Antigens // Young L.S. edited *Pathogens*. – 2016. – V. 5. – № 1. – 22
207. Lai, Y., Cogen, A. L., Radek, K. A., Park, H. J., MacLeod, D. T., Leichtle, A., Ryan, A.F., Di Nardo, A., Gallo, R. L. Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections // *The Journal of Investigative Dermatology*. – 2010. – V. 130. – № 9. – P. 2211–2221.
208. Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. / Lane D.J. // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt E., and Goodfellow M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY – 1991. – P. 115–175.
209. Lange-Asschenfeldt, B., Marenbach, D., Lang, C., Patzelt, A., Ulrich, M., Maltusch, A., Terhorst D., Stockfleth E., Sterry W., Lademann J. Distribution of bacteria in the epidermal layers and hair follicles of the human skin // *Skin pharmacology and physiology*. – 2011. – V. 24. – № 6. – P. 305-311.

210. Lazarevic, V., Soldo, B., Médico, N., Pooley, H., Bron, S., Karamata, D. *Bacillus subtilis* alpha-phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation // Applied and environmental microbiology. – 2005. – V. 71. – № 1. – P. 39–45.
211. Lázaro-Díez, M., Remuzgo-Martínez, S., Rodríguez-Mirones, C., Acosta, F., Icardo, J. M., Martínez-Martínez, L., Ramos-Vivas, J. Effects of subinhibitory concentrations of ceftaroline on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms // PLoS ONE. – 2007. – V. 11. – № 1. – e0147569.
212. Lee, H.J., Jeong, S.E., Lee, S., Kim, S., Han, H., Jeon, C.O. Effects of cosmetics on the skin microbiome of facial cheeks with different hydration levels // MicrobiologyOpen. – 2018a. – V. 7. – № 2. – e00557.
213. Lee, S.W., Kim, S.G., Park, Y.W., Kweon, H., Kim, J.Y., Rotaru, H. Cisplatin and 4-hexylresorcinol synergise to decrease metastasis and increase survival rate in an oral mucosal melanoma xenograft model: a preliminary study // Tumour biology. – 2013. – V. 34. – № 3. – P. 1595-1603.
214. Lee, W. J., Kim, S. L., Lee, K. C., Sohn, M. Y., Jang, Y. H., Lee, S.-J., & Kim, D. W. Effects of magnesium ascorbyl phosphate on the expression of inflammatory biomarkers after treatment of cultured sebocytes with *Propionibacterium acnes* or ultraviolet B radiation // Annals of dermatology. – 2016. – V. 28. – № 1. – P. 129–132.
215. Lee, K., Lee, K.-M., Kim, D., Yoon, S.S. Molecular determinants of the thickened matrix in a dual-species *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* biofilm // Applied and environmental microbiology. – 2017. – V. 83. – 21. – e01182–17.
216. Lee, Y., Liu, L., Yi, Y. Inhibitory effect of berberine from *Coptidis rhizoma* on melanin synthesis of murine malignant melanoma // Pharmazie. – 2018. – V. 73. – № 5. – P. 300–303.
217. Lee, W.L., Shalita, A.R., Suntharalingam, K., Fikrig, S.M. Neutrophil chemotaxis by *Propionibacterium acnes* lipase and its inhibition // Infection and immunity. – 1982. – V. 35. – № 1. – P. 71–78.
218. Leoni, L., Rampioni, G. Quorum sensing, methods and protocols / L. Leoni, G. Rampioni. – New York, NY : Humana Press, 2018. – 375 P.
219. Lesouhaitier, O., Veron, W., Chapalain, A., Madi, A., Blier, A.-S., Dagorn, A., Connil, N., Chevalier, S., Orange, N., Feuilloley, M. Gram-Negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules // Sensors (Basel, Switzerland). – 2009. – V. 9. – № 9. – P. 6967–6990.
220. Leung, M.H.Y., Tong, X., Wilkins, D., Cheung, H.H.L., Lee, P.K.H. Individual and household attributes influence the dynamics of the personal skin microbiota and its association network // Microbiome. – 2018. – V. 6. – 26.

221. Li, Y.H., Tang, N., Aspiras, M.B., Lau, P.C., Lee, J.H., Ellen, R.P., Cvitkovitch, D.G. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation // *Journal of bacteriology*. – 2002. – V. 184. – P. 2699–2708.
222. Li, J., Yang, Y., Dubern, J.F., Li, H., Halliday, N., Chernin, L., Gao, K., Cámara, M., Liu, X. Regulation of GacA in *Pseudomonas chlororaphis* strains shows a niche specificity // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. – № 9. – e0137553.
223. Li, Y., Huang, J., Li, L., Liu, L. Synergistic activity of berberine with azithromycin against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis of lung *in vitro* and *in vivo* // *Cellular physiology and biochemistry*. – 2017. – V. 42. – № 4. – P. 1657–1669.
224. Li, M., Huang, R., Zhou, X., Zhang, K., Zheng, X. and Gregory, R.L. Effect of nicotine on dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* // *FEMS Microbiology letters*. – 2014. – V. 350. – P. 125–132.
225. Li, G., Young, K. D. Isolation and identification of new inner membrane-associated proteins that localize to cell poles in *Escherichia coli* // *Molecular microbiology*. – 2012. – V. 84. – № 2. – P. 276–295.
226. Liebl, W., Kloos, W.E., Ludwig, W. Plasmid-borne macrolide resistance in *Micrococcus luteus* // *Microbiology*. – 2002. – V. 148. – Pt. 8. – P. 2479–2487.
227. Lin, T.P., Chen, C.L., Chang, L.K., Tschén, J.S., Liu, S.T. Functional and transcriptional analyses of a fengycin synthetase gene, *fenC*, from *Bacillus subtilis*. // *Journal of bacteriology*. – 1999. – V. 181. – P. 5060–5067.
228. Lin, H., Muramatsu, R., Maedera, N., Tsunematsu, H., Hamaguchi, M., Koyama, Y., Kuroda, M., Ono, K., Sawada, M., Yamashita, T. Extracellular lactate dehydrogenase A release from damaged neurons drives central nervous system angiogenesis // *EBioMedicine*. – 2018. – V. 27. – P. 71–85.
229. Linares, J.F., Gustafsson, I., Baquero, F. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *PNAS USA*. – 2006. – V. 103. – № 51. – P. 19484–19489.
230. Lister, J.L., Horswill, A.R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2014. – V. 4. – 178.
231. Liu, J., He, D., Li, X.Z., Gao, S., Wu, H., Liu, W., Gao, X., Zhou, T. Gamma-polyglutamic acid (gamma-PGA) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* C06 promoting its colonization on fruit surface // *International journal of food microbiology*. – 2010. – V. 142. – 1–2. – P. 190–197
232. Liu, N.T., Nou, X., Bauchan, G.R., Murphy, C., Lefcourt, A.M., Shelton, D.R., Lo, Y.M. Effects of environmental parameters on the dual-species biofilms formed by *Escherichia coli*

O157:H7 and *Ralstonia insidiosus*, a strong biofilm producer isolated from a fresh-cut produce processing plant // Journal of food protection. – 2015. – V. 78. – № 1. – P. 121–127.

233. Liu, J., Ma, X., Wang, Y., Liu, F., Qiao, J., Li, X.Z., Gao, X., Zhou, T. Depressed biofilm production in *Bacillus amyloliquefaciens* C06 causes γ -polyglutamic acid (γ -PGA) overproduction // Current microbiology. – 2011. – V. 62. – № 1. – P. 235–241.

234. Liu, Z., Wang, W., Zhu, Y. Antibiotics at subinhibitory concentrations improve the quorum sensing behavior of *Chromobacterium violaceum* // FEMS Microbiology letters. – 2013. – V. 341. – P. 37–44.

235. Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R. Biofilms // Cold Spring Harbor Perspectives in biology. – 2010. – V. 2. – 7. – a.000398

236. López, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. Paracrine signaling in a bacterium // Genes & development. – 2009. – V. 23. – P. 1631–1638

237. Loveday H.P., Wilson J.A., Kerr K., Pitchers R., Walker J.T., Browne J. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review // Journal of hospital infection. – 2014. – V. 86. – № 1. – P. 7–15.

238. Luckey, T.D. Introduction to intestinal microecology // The american journal of clinical nutrition. – 1972. – V. 25. – № 12. – P. 1292–1294.

239. Luczkiewicz, A., Kotlarska, E., Artichowicz, W., Tarasewicz, K., Fudala-Ksiazek, S. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone // Environmental science and pollution research international. – 2015. – V. 22. – P. 19823–19834.

240. Lyte, M., Freestone, P.P., Neal, C.P., Olson, B.A., Haigh, R.D., Bayston, R., Williams, P.H. Stimulation of *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation by catecholamine inotropes // Lancet. – 2003. – V. 361. – 9352. – № P. 130–135.

241. Ma, L., Wang, J., Wang, S., Anderson, E. M., Lam, J. S., Parsek, M. R., & Wozniak, D. J. Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated // Environmental microbiology. – 2012. – V. 14. – № 8. – P. 1995–2005.

242. Makovcova, J., Babak, V., Kulich, P., Masek, J., Slany, M., Cincarova, L. Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria // Microbial biotechnology. – 2017. – V. 10. – № 4. – P. 819–832.

243. Madhuri, Shireen, T., Venugopal, S.K., Ghosh, D., Gadepalli, R., Dhawan, B., Mukhopadhyay, K. In vitro antimicrobial activity of alpha-melanocyte stimulating hormone against major human pathogen *Staphylococcus aureus* // Peptides. – 2009. – V. 30. – № 9. – P. 1627–1635.

244. Madi, A., Alnabhani, Z., Leneuve, C., Mijouin, L., Feuilloley, M., Connil, N. *Pseudomonas fluorescens* can induce and divert the human β -defensin-2 secretion in intestinal

epithelial cells to enhance its virulence // Archives of microbiology. – 2013. – V. 195. – № 3. – P. 189–195.

245. Maezono, H., Noiri, Y., Asahi, Y. Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – V. 55. – № 12. – P. 5887–5892.

246. Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance // Clinical microbiology and infection. – 2012. – V. 12. – № 3. – P. 268–281.

247. Mahboubi, M., Haghi, G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil // Journal of ethnopharmacology. – 2008. – V. 119. – № 2. – P. 325–327.

248. Majidpour, A., Fathizadeh, S., Afshar, M., Rahbar, M., Boustanshena, M., Heidarzade, M., Arbabi, L., Soleymanzadeh Moghadam, S. Dose-dependent effects of common antibiotics used to treat *Staphylococcus aureus* on biofilm formation // Iranian journal of pathology. – 2017. – V. 12. – № 4. – P. 362–370.

249. Maleki, S., Almaas, E., Zotchev, S., Valla, S., Ertesvåg, H. Alginate biosynthesis factories in *Pseudomonas fluorescens*: localization and correlation with alginate production level // Applied and environmental microbiology. – 2016. – V. 82. – 4. – P. 1227–1236.

250. Malic, S., Hill, K.E., Playle, R., Thomas, D.W., Williams, D.W. *In vitro* interaction of chronic wound bacteria in biofilms // Journal of wound care. – 2011. – V. 20. – № 12. – 569–570.

251. Mann, E.E., Rice, K.C., Boles, B.R., Endres, J.L., Ranjit, D., Chandramohan, L., Tsang, L.H., Smeltzer, M.S., Horswill, A.R., Bayles, K.W. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation // PLoS ONE. – 2009. – V. 4. – e5822.

252. Mann, E.E., Wozniak, D.J. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology // FEMS Microbiology reviews. – 2012. – V. 36. – № 4. – P. 893–916.

253. Marr, A.K., Overhage, J., Bains, M. The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility // Microbiology. – 2007. – V. 153. – № 2. – P. 474–482.

254. Marvasi, M., Visscher, P.T., Casillas Martinez, L. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis // FEMS Microbiology letters. – 2010. – V. 313. – № 1. – P. 1–9

255. Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., Cohen, G. Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide

reductase genes in response to oxygen // *Journal of Bacteriology*. – 2001. – V. 183. – № 24. – P. 7260–7272.

256. Matard, B., Meylheuc, T., Briandet, R., Casin, I., Assouly, P., Cavelier-balloy, B., Reygagne, P. First evidence of bacterial biofilms in the anaerobe part of scalp hair follicles: a pilot comparative study in folliculitis decalvans // *Journal of the European academy of dermatology and venereology*. – 2013. – V. 27. – № 7. – P. 853-860.

257. Matsuura, K., Asano, Y., Yamada, A., Naruse, K. Detection of *Micrococcus luteus* biofilm formation in microfluidic environments by pH measurement using an ion-sensitive field-effect transistor // *Sensors (Basel, Switzerland)*. – 2013. – V. 13. – № 2. – P. – 2484–2493.

258. Mattei, M.R., Frunzo, L., D'Acunto, B., Pechaud, Y., Pirozzi, F., Esposito, G. Continuum and discrete approach in modeling biofilm development and structure: a review // *Journal of mathematical biology*. – 2018. – V. 76. – № 4. – P. 945–1003.

259. Mauclaire, L., Egli, M. Effect of simulated microgravity on growth and production of exopolymeric substances of *Micrococcus luteus* space and earth isolates // *FEMS immunology and medical microbiology*. – 2010. – V. 59. – № 3. – P. 350–356.

260. McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal // *Nature reviews microbiology*. – 2012. – V. 10. – № 1. – P. 39–50.

261. Michiels, J., Fauvart, M. Bacterial persistence, methods and protocols / J. Michiels, M. Fauvart. –New York, NY : Humana Press, 2016. – 244 p.

262. Mijouin, L., Hillion, M., Ramdani, Y., Jaouen, T., Duclairoir-Poc, C., Follet-Gueye, M.L., Lati, E., Yvergnaux, F., Driouich, A., Lefeuvre, L., Farmer, C., Misery, L., Feuilloley, M.G. Effects of a skin neuropeptide (substance p) on cutaneous microflora // *PLoS ONE*. – 2013. – V. 8. – № 11. – e78773.

263. Miller, C.L., Van Laar, T.A., Chen, T., Karna, S.L.R., Chen, P., You, T., Leung, K.P. Global transcriptome responses including small RNAs during mixed-species interactions with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* // *MicrobiologyOpen*. – 2017. – V. 6. – № 3. – e00427.

264. Miltiadous, G., Elisaf, M. Native valve endocarditis due to *Micrococcus luteus*: a case report and review of the literature // *Journal of medical case reports*. – 2013. – V. 5. – 251.

265. Min, K.R., Rickard, A.H. Coaggregation by the freshwater bacterium *Sphingomonas natatoria* alters dual-species biofilm formation // *Applied and environmental microbiology*. – 2009. – V. 75. – № 12. – P. 3987–3997.

266. Mishra, P.K., Mishra, S., Bisht, S.C., Selvakumar, G., Kundu, S., Bisht, J.K., Gupta, H.S. Isolation, molecular characterization and growth-promotion activities of a cold tolerant bacterium

Pseudomonas sp. NARs9 (MTCC9002) from the Indian Himalayas // Biological research. – 2009. – V. 42. – № 3. – P.305-313.

267. Molina, L., Udaondo, Z., Duque, E., Fernández, M., Molina-Santiago, C., Roca, A., Porcel, M., de la Torre, J., Segura, A., Plesiat, P., Jeannot, K., Ramos, J.L. Antibiotic resistance determinants in a *Pseudomonas putida* strain isolated from a hospital // PLoS One. – 2014. – V. 9. – № 1. – e81604.

268. Molloy, E.M., Cotter, P.D., Hill, C., Mitchell, D.A., Ross, R.P.. Streptolysin S-like virulence factors: the continuing saga // Nature Reviews. Microbiology. – 2011. – V. 9. – № 9. – P. 670–681.

269. Morikawa, M., Kagihiro, S., Haruki, M., Takano, K., Branda, S., Kolter, R., Kanaya, S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate // Microbiology. – 2006. – V. 152. – P. 2801–2807.

270. Moscoso, M., Claverys, J.P. Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA // Molecular microbiology. – 2004. – V. 54. – P. 783–794.

271. Mull, C.C., Scarfone, R.J., Conway, D. Ecthyma gangrenosum as a manifestation of *Pseudomonas* sepsis in a previously healthy child // Annals of emergency medicine. – 2000. – V. 36. – № 4. – P. 383–387.

272. N'Diaye, A., Gannesen, A., Borrel, V., Maillot, O., Enault, J., Racine, P.-J., Plakunov, V., Chevalier, S., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J. Substance P and calcitonin gene-related peptide: key regulators of cutaneous microbiota homeostasis // Frontiers in endocrinology. – 2016a. – V. 8. – 15.

273. N'Diaye, A.R., Leclerc, C., Kentache, T., Hardouin, J., Poc, C. D., Konto-Ghiorgi, Y., Chevalier, S., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. J. Skin-bacteria communication: involvement of the neurohormone Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) in the regulation of *Staphylococcus epidermidis* virulence // Nature scientific reports. – 2016. – V. 6. – 35379

274. Nabavi, S. F., Di Lorenzo, A., Izadi, M., Sobarzo-Sánchez, E., Daglia, M., Nabavi, S. M. Antibacterial effects of cinnamon: from farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries // Nutrients. – 2015. – V. 7. – № 9. – P. 7729–7748.

275. Nadell, C.D., Bucci, V., Drescher, K., Levin, S.A., Bassler, B.L., Xavier, J.B. Cutting through the complexity of cell collectives // Proceedings of the Royal Society B: biological sciences. – 2013. – V. 280. – № 1755. – ID 20122770.

276. Nagler, A.R., Wanat, K.A., Bachman, M.A., Elder, D., Edelstein, P.H., Schuster, M.G., Rosenbach M. Fatal *Kytococcus schroeteri* infection with crusted papules and distinctive histologic plump tetrads // Archives of dermatology. – 2011. – V. 147. – № 9. – P. 1119–1121.

277. Nagy, I., Pivarcsi, A., Kis, K., Koreck, A., Bodai, L., McDowell, A., Seltmann, H., Patrick, S., Zouboulis, C.C., Kemény, L. *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes // *Microbes and infection*. – 2006. – V. 8. – № 8. – P. 2195–2205.
278. Nakatsuji, T., Chen, T.H., Butcher, A.M., Trzoss, L.L., Nam, S.-J., Shirakawa, K.T., Zhou W., Oh J., Otto M., Fenical W., Gallo, R.L. A commensal strain of *Staphylococcus epidermidis* protects against skin neoplasia // *Science advances*. – 2018. – V. 4. – № 2. – eaao4502.
279. Nalca, Y., Jansch, L., Bredenbruch, F., Geffers, R., Buer, J., & Häussler, S. Quorum-Sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2006. – V. 50. – № 5. – P. 1680–1688.
280. National center for biotechnology information [электронный ресурс] / NCBI // U.S. National Library of medicine. – 2018. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
281. Nielsen, C.K., Kjems, J., Mygind, T., Snabe, T., Meyer, R.L. Effects of tween 80 on growth and biofilm formation in laboratory media // *Frontiers in microbiology*. 2016. – V. 7. – 1878.
282. Nistico, L., Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. Imaging bacteria and biofilms on hardware and periprosthetic tissue in orthopedic infections / Nistico, L., Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. // Gianfranco Donelli (ed.), *Microbial biofilms: methods and protocols*, *Methods in molecular biology*. Springer Science+Business Media New York. – 2014. – V. 1147.
283. Nodake, Y., Matsumoto, S., Miura, R., Honda, H., Ishibashi, G., Matsumoto, S., Dekio, I., Sakakibara, R. Pilot study on novel skin care method by augmentation with *Staphylococcus epidermidis*, an autologous skin microbe -- A blinded randomized clinical trial // *Journal of dermatological science*. – 2015. – V. 79. – № 2. – P. 119–126.
284. Nostro, A., Blanco, A.R., Cannatelli, M.A., Enea, V., Flamini, G., Morelli, I., Sudano Roccaro, A., Alonzo, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol // *FEMS Microbiology letters*. – 2004. – V. 230. – № 2. – P. 191–195.
285. Nostro, A., Sudano Roccaro, A., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., Blanco, A.R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms // *Journal of medical microbiology*. – 2007. – V. 56. – Pt. 4. – P. 519–523.
286. Nucleo, E., Steffanoni, L., Fugazza, G. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* // *BMC Microbiology*. – 2009. – V. 9. – 270.
287. O'Toole, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay // *Journal of visualized experiments*. – 2011. – V. 47. – P. 2437.

288. Ochoa-Repáraz, J., Kasper, L. H. The second brain: is the gut microbiota a link between obesity and central nervous system disorders? // *Current obesity reports*. – 2016. – V. 5. – № 1. – P. 51–64.
289. Okshevsky M., Meyer R.L. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms // *Critical reviews in microbiology*. – 2013. – V. 41. – № 3. – P. 341–352.
290. Okuda, K.I., Nagahori, R., Yamada, S., Sugimoto, S., Sato, C., Sato, M., Iwase, T., Hashimoto, K., Mizunoe, Y. The composition and structure of biofilms developed by *Propionibacterium acnes* isolated from cardiac pacemaker devices // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – V. 9. – 182.
291. Otto, M. *Staphylococcal biofilms* // *Current topics in microbiology and immunology*. – 2008. – V. 322. – P. 207–228.
292. Otto, M. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides // *Expert review of dermatology*. – 2010. – V. 5. – № 2. – P. 183–195.
293. Otto, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections // *Seminars in immunopathology*. – 2012. – V. 34. – 2. – P. 201–214.
294. Pammi, M., Liang, R., Hicks, J., Mistretta, T.-A., Versalovic, J. Biofilm extracellular DNA enhances mixed species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* // *BMC Microbiology*. – 2013. – V. 13. – 257.
295. Pannu, J., McCarthy, A., Martin, A., Hamouda, T., Ciotti, S., Ma, L., Sutcliffe, J.R. Baker, J.R. In vitro antibacterial activity of NB-003 against *Propionibacterium acnes* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2011. – V. 55. – № 9. – P. 4211–4217.
296. Peces, R., Gago, E., Tejada, F., Laures, A.S., Alvarez-Grande, J. Relapsing bacteraemia due to *Micrococcus luteus* in a haemodialysis patient with a Perm-Cath catheter // *Nephrology dialysis transplantation*. – 1997. – V. 12. – № 11. – P. 2428–2429.
297. Peeters, E., Nelis, H.J., Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates // *Journal of microbiological methods*. – 2008. – V. 72. – P. 157–165.
298. Peng, H., Ouyang, Y., Bilal, M., Wang, W., Hu, H., Zhang X. Identification, synthesis and regulatory function of the N-acylated homoserine lactone signals produced by *Pseudomonas chlororaphis* HT66 // *Microbial cell factories*. – 2018. – V. 17. – № 1. – 9.
299. Pereira, Y., Petit-Glatron, M.F., Chambert, R. *yveB*, encoding endolevanase LevB, is part of the *sacB-yveB-yveA* levansucrase tricistronic operon in *Bacillus subtilis* // *Microbiology*. – 2001. – V. 147. – P. 3413–3419.

300. Perni, S., Preedy, E.C., Prokopovich, P. Success and failure of colloidal approaches in adhesion of microorganisms to surfaces // *Advances in colloid and interface science*. – 2013. – pii: S0001-8686(13)00161-9.
301. Perry, A., Lambert, P. *Propionibacterium acnes*: infection beyond the skin // *Expert Review of anti-infective therapy*. – 2011. – V. 9. – № 12. P. 1149–1156.
302. Petersson, F., Kilsgård, O., Shannon, O., Lood, R. Platelet activation and aggregation by the opportunistic pathogen *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes* // *PLoS ONE*. – 2018. – V. 13. – № 1. – e0192051.
303. Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., Weindl, G. Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – V. 9. – 281.
304. Phelan, V.V., Fang, J., Dorrestein, P.C. Mass spectrometry analysis of *Pseudomonas aeruginosa* treated with azithromycin // *Journal of the American society for mass spectrometry*. – 2015. – V. 26. – № 6. – P. 873–877.
305. Pillai, D.K., Cha, E., Mosier, D. Role of the stress-associated chemicals norepinephrine, epinephrine and substance P in dispersal of *Mannheimia haemolytica* from biofilms // *Veterinary microbiology*. – 2018. – V. 2015. – P. 11-17.
306. Poppert, S., Riecker, M., Essig, A. Rapid identification of *Propionibacterium acnes* from food cultures by fluorescence *in situ* hybridization // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2010. – V. 66. – P. 214–216.
307. Potron, A., Poirel, L., Nordmann, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology // *International journal of antimicrobial agents*. – 2015. – V. 45. – № 6. – P. 568–585.
308. Presterl, E., Hajdu, S., Lassnigg, A.M., Hirschl, A.M., Holinka, J., Graninger, W. Effects of azithromycin in combination with vancomycin, daptomycin, fosfomicin, tigecycline, and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2009. – V. 53. – 8. – P. 3205–3210.
309. Protein BLAST [Электронный ресурс] / Basic Local Alignment Search Tool // National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. – Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
310. Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T., Bennett, B. C. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Journal of ethnopharmacology*. – 2008. – V. 118. – № 3. – P. 418–428.
311. Rabasco Alvarez, A.M., Gonzalez Rodriguez M.L. Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations // *Grasas y Aceites*. – 2000. – V. 51. – № 1–2. – P. 74–96.

312. Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2000. – V. 44. – 12. – P. 3357–3363.
313. Ramírez Granillo, A., Canales, M.G.M., Espíndola, M.E.S., Martínez Rivera, M.A., de Lucio, V.M.B., Tovar, A.V.R. Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigatus* assessed in vitro by mixed biofilm formation // BMC Microbiology. – 2015. – V. 15. – 33.
314. Ramos, J.-L., Goldberg, J.B., Filloux, A. *Pseudomonas*. Volume 7: New Aspects of *Pseudomonas* Biology / J.-L. Ramos, J.B. Goldberg, A. Filloux. – London: Springer Dordrecht Heidelberg New York, 2015. – 316p.
315. Ribeiro, M., Monteiro, F.J., Ferraz, M.P. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions // Biomatter. – 2012. – V. 2. – № 4. – P. 176–194.
316. Roberts, A.P., Pratten, J., Wilson, M., Mullany, P. Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm // FEMS Microbiology letters. – 2006. – V. 177. – P. 63–66.
317. Romeo, T. Bacterial biofilms / T. Romeo – Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008. – 300 P.
318. Romero, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms // Molecular microbiology. – 2011. – V. 80. – P. 1155–1168
319. Rosay, T., Bazire, A., Diaz, S., Clamens, T., Blier, A.S., Mijouin, L., Hoffmann, B., Sergent, J.A., Bouffartigues, E., Boireau, W., Vieillard, J., Hulen, C., Dufour, A., Harmer, N.J., Feuilloley, M.G., Lesouhaitier, O. *Pseudomonas aeruginosa* expresses a functional human natriuretic peptide receptor ortholog: involvement in biofilm formation // mBio. – 2015. – V. 6. – № 4. – e01033-15.
320. Rosner, J.L. Ten times more microbial cells than body cells in humans? // Microbe. – 2014. – V. 9. – № 2. – P. 47.
321. Ross, J.I., Snelling, A.M., Eady, E.A., Cove, J.H., Cunliffe, W.J., Leyden, J.J., Collignon, P., Dréno, B., Reynaud, A., Fluhr, J., Oshima, S. Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes* isolated from acne patients attending dermatology clinics in Europe, the U.S.A., Japan and Australia // British journal of dermatology. – 2001. – V. 144. – № 2. – P. 339–346.
322. Ryder C., Byrd M., Wozniak D.J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Current opinion in microbiology. – 2007. – V. 10. – P. 644–648.

323. Sabaté Brescó, M., Harris, L.G., Thompson, K., Stanic, B., Morgenstern, M., O'Mahony, L., Richards, G.R., Moriarty, T.F. Pathogenic mechanisms and host interactions in *Staphylococcus epidermidis* device-related infection // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – V. 8. – 1401.
324. Saffari, F., Widerström, M., Gurram, B.K., Edebro, H., Hojabri, Z., Monsen, T. Molecular and phenotypic characterization of multidrug-resistant clones of *Staphylococcus epidermidis* in Iranian hospitals: clonal relatedness to healthcare-associated methicillin-resistant isolates in Northern Europe // *Microbial drug resistance*. – 2016. – V. 22. – № 7. – P. 570–577.
325. Saini, H., Vadekeetil, A., Chhibber, S., Harjai, K. Azithromycin-ciprofloxacin-impregnated urinary catheters avert bacterial colonization, biofilm formation, and inflammation in a murine model of foreign-body-associated urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2017. – V. 61. – № 3. – e01906–16.
326. Salgado-Pabón, W., Du, Y., Hackett, K.T., Lyons, K.M., Arvidson, C.G., Dillard, J.P. Increased expression of the type IV secretion system in piliated *Neisseria gonorrhoeae* variants // *Journal of bacteriology*. – 2010. – V. 192. – 7. – P. 1912–1920
327. Salgueiro, V.C., Iorio, N.L.P., Ferreira, M.C., Chamon, R.C., dos Santos, K.R.N. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates // *BMC Microbiology*. – 2017. – V. 17. – 15.
328. SanMiguel, A., Grice, E. A. Interactions between host factors and the skin microbiome // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. – 2015. – V. 72. – № 8. – P. 1499–1515.
329. Sannasiddappa, T.H., Costabile, A., Gibson, G.R., Clarke, S.R. The influence of *Staphylococcus aureus* on gut microbial ecology in an *in vitro* continuous culture human colonic model system // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – 8. – e23227.
330. Sardana, K., Gupta, T., Kumar, B., Gautam, H. K., & Garg, V. K. Cross-sectional pilot study of antibiotic resistance in *Propionibacterium acnes* strains in Indian acne patients using 16S-RNA polymerase chain reaction: a comparison among treatment modalities including antibiotics, benzoyl peroxide, and isotretinoin // *Indian journal of dermatology*. – 2016. – V. 61. – № 1. – P. 45–52.
331. Sarkisova S., Patrauchan M.A., Berglund D.6 Nivens, D.E., Franklin, M.J. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Journal of bacteriology*. – 2005. – V. 187. – 13. – P. 4327–4337.
332. Sastalla I., Chim K., Cheung G. Y. C., Pomerantsev A. P., Leppla S. H. Codon-optimized fluorescent proteins designed for expression in low-GC Gram-positive bacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2009. – V. 75. – №7. – P. 2099–2110.

333. Scales, B.S., Dickson, R.P., LiPuma, J.J., & Huffnagle, G.B. Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans // *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 927–948.
334. Schaeffer, C.R., Woods, K.M., Longo, G.M., Kiedrowski, M.R., Paharik, A.E., Büttner, H., Christner, M., Boissy, R.J., Horswill, A.R., Rohde, H., Fey, P.D. Accumulation-associated protein enhances *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation under dynamic conditions and is required for infection in a rat catheter model // *Infection and immunity*. – 2015. – V. 83. – № 1. – P. 214–226.
335. Schaumburg, F., Schmalstieg, C., Fiedler, B., Brentrup, A., Omran, H., Becker, K. A bumpy road to the diagnosis of a *Kytococcus schroeteri* shunt infection // *Journal of medical microbiology*. – 2013. – V. 62. – Pt. 1. – P. 165–168.
336. Schilcher, K., Andreoni, F., Dengler Haunreiter, V., Seidl, K., Hasse, B., Zinkernagel, A. S. Modulation of *Staphylococcus aureus* biofilm matrix by subinhibitory concentrations of clindamycin // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2016. – V. 60. – № 10. – P. 5957–5967.
337. Schlievert, P.M., Peterson, M.L. Glycerol monolaurate antibacterial activity in broth and biofilm cultures // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7. – 7. – e40350.
338. Scholz, C., Kilian, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2016. – V. 66. – P. 4422–4432.
339. Schommer, N.N., Christner, M., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., Aepfelbacher, M., Rohde, H. *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1 // *Infection and immunity*. – 2011. – V. 79. – № 6. – P. 2267–2276.
340. Schooling, S.R., Beveridge, T.J. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms // *Journal of bacteriology*. – 2006. – V. 188. – 16. – P. 5945–5957
341. Schwiertz, A, Rusch, V. A short definition of terms // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2016. – V. 902. – P. 1–3.
342. Seper, A., Fengler, V.H.I., Roier, S., Wolinski, H., Kohlwein, S.D., Bishop, A.L., Camilli, A., Reidl, J., Schild, S. Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation // *Molecular microbiology*. – 2011. – V. 82. – P. 1015–1037.
343. Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans // *Cell*. – 2016. – V. 164. – № 3. – 337–340.
344. Severini, C., Improta, G., Falconieri-Erspamer, G., Salvadori, S., Erspamer, V. The tachykinin peptide family // *Pharmacological reviews*. – 2002. – V. 54. – 2. – P. 285–322.

345. Shafiei, Z., Haji Abdul Rahim, Z., Philip, K., Thurairajah, N. (2016). Antibacterial and anti-adherence effects of a plant extract mixture (PEM) and its individual constituent extracts (*Psidium* sp., *Mangifera* sp., and *Mentha* sp.) on single- and dual-species biofilms // PeerJ. – 2016. – V. 4. – e2519.
346. Shih, I.L., Chen, L.D., Wu, J.Y. Levan production using *Bacillus subtilis* natto cells immobilized on alginate // Carbohydrate polymers. – 2010. – V. 82. – P. 111–117.
347. Shimotsu, H., Henner, D.J. Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase gene expression by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by *sacU* and *sacQ* genes // Journal of bacteriology. – 1986. – V. 168. – P. 380–388.
348. Simões, M., Pereira, M.O., Machado, I., Simões, L.C., Vieira, M.J. Comparative antibacterial potential of selected aldehyde-based biocides and surfactants against planktonic *Pseudomonas fluorescens* // Journal of industrial microbiology & biotechnology. – 2006. – V. 33. – № 9. – P. 741-749.
349. Snider, R.M., Strycharz-Glaven, S.M., Tsoi, S.D., Erickson, J.S., Tender, L.M. Long-range electron transport in *Geobacter sulfurreducens* biofilms is redox gradient-driven // PNAS USA. – 2012. – V. 109. – 38. – V. 15467–15472
350. Soares, R.C., Zani, MB., Arruda, A.C.B.B., de Arruda, L.H.F., Paulino, L.C. *Malassezia* intra-specific diversity and potentially new species in the skin microbiota from brazilian healthy subjects and seborrheic dermatitis patients // PLoS ONE. – 2015. – V. 10. – № 2. – e0117921.
351. Speziale, P., Pietrocola, G., Foster, T. J., Geoghegan, J. A. Protein-based biofilm matrices in Staphylococci // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2014. – V. 4. – 171.
352. Stingo, A.J., Clavell, A.L., Heublein, D.M., Wei, C.M., Pittelkow, M.R., Burnett, Jr. J.C. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma // Am. The journal of physiology. – 1992. – V. 263. – P. 1318–1321.
353. Su, X.-M., Liu, Y.-D., Hashmi, M.Z., Ding, L.-X., Shen, C.-F. Culture-dependent and culture-independent characterization of potentially functional biphenyl-degrading bacterial community in response to extracellular organic matter from *Micrococcus luteus* // Microbial biotechnology. – 2015. – V. 8. – № 3. – P. 569–578.
354. Sugimoto, S., Iwamoto, T., Takada, K., Okuda, K., Tajima, A., Iwase, T., Mizunoe, Y. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades dpecific proteins associated with *Staphylococcus aureus* biofilm formation and host-pathogen interaction // Journal of bacteriology. – 2013. – V. 195. – № 8. – P. 1645-1655.
355. Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., Schumann, P. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus*

gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend // International journal of systematic bacteriology. – 1995. – V. 45. – № 4. – P. 682–692

356. Stewart, P. S., Franklin, M. J., Williamson, K. S., Folsom, J. P., Boegli, L., & James, G. A. (2015). Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015. – V. 59. – № 7. – P. 3838–3847.

357. Stratford, A.F., Zoutman, D.E., Davidson, J.S. Effect of lidocaine and epinephrine on *Staphylococcus aureus* in a guinea pig model of surgical wound infection // Plastic and reconstructive surgery. – 2002. – V. 110. – № 5. – P. 1275–1279.

358. Sully, E.K., Malachowa, N., Elmore, B.O., Alexander, S.M., Femling, J.K., Gray, B.M., DeLeo, F.R., Otto, M., Cheung, A.L., Edwards, B.S., Sklar, L.A., Horswill, A.R., Hall, P.R., Gresham, H.D. Selective chemical inhibition of *agr* quorum sensing in *Staphylococcus aureus* promotes host defense with minimal impact on resistance // PLoS Pathogens. – 2014. – V. 10. – № 6. – e1004174.

359. Surger, M.J., Angelov, A., Stier, P., Übelacker, M., Liebl, W. Impact of branched-chain amino acid catabolism on fatty acid and alkene biosynthesis in *Micrococcus luteus* // Frontiers in microbiology. – 2018. – V. 9. – 374.

360. Szafranski, S.P., Deng, Z.-L., Tomasch, J., Jarek, M., Bhujju, S., Rohde, M., Sztajer, H., Wagner-Döbler, I. Quorum sensing of *Streptococcus mutans* is activated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and by the periodontal microbiome // BMC Genomics. – 2017. – V. 18. – 238.

361. Szczuka, E., Jabłońska, L., Kaznowski, A. Effect of subinhibitory concentrations of tigecycline and ciprofloxacin on the expression of biofilm-associated genes and biofilm structure of *Staphylococcus epidermidis* // Microbiology. – 2017. – V. 163. – 5. – P. 712–718.

362. Sztajer, H., Szafranski, S.P., Tomasch, J., Reck, M., Nimtz, M., Rohde, M., Wagner-Döbler, I. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* // The ISME Journal. – 2014. – V. 8. – 11. – P. 2256–2271.

363. Taglialegna, A., Navarro, S., Ventura, S., Garnett, J.A., Matthews, S., Penades, J.R., Lasa, I., Valle, J. Staphylococcal bap proteins build amyloid scaffold biofilm matrices in response to environmental signals // PLoS Pathogens. – 2016. – V. 12. – № 6. – e1005711.

364. Tajbakhsh, E., Tajbakhsh, S., Khamesipour, F. Isolation and molecular detection of gram negative bacteria causing urinary tract infection in patients referred to shahrekord hospitals, Iran // Iranian red crescent medical journal. – 2015. – V. 17. – № 5. - e24779.

365. Talib, W.H., Saleh, S. *Propionibacterium acnes* augments antitumor, anti-angiogenesis and immunomodulatory effects of melatonin on breast cancer implanted in mice // PLoS ONE. – 2015. – V. 10. – № 4. – e0124384.

366. Tan, Y., Leonhard, M., Schneider-Stickler, B. Evaluation of culture conditions for mixed biofilm formation with clinically isolated non-albicans *Candida* species and *Staphylococcus epidermidis* on silicone // Microbial pathogenesis. – 2017. – V. 112. – P. 215–220.
367. Tan, H., Zhang, L., Weng, Y., Chen, R., Zhu, F., Jin, Y., Zhihui, C., Shouguang, J., Wu, W. PA3297 Counteracts antimicrobial effects of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* // Frontiers in microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 317.
368. Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H., Nomura, N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms // Microbes and environments. – 2013. – V. 28. – № 1. – P. 13–24
369. Tateda, K., Comte, R., Pechere, J.-C., Köhler, T., Yamaguchi, K., Van Delden, C. Azithromycin inhibits quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2001. – V. 45. – № 6. – P. 1930–1933
370. Teflose® [Электронный ресурс] / Teflose® // Solabia Group ©. – 2016. – Режим доступа: http://www.solabia.com/Produto_16,1/Cosmetique/Teflose.html.
371. Ten Broeke-Smits, N.J., Kummer, J.A., Bleys, R.L., Fluit, A.C., Boel, C.H. Hair follicles as a niche of *Staphylococcus aureus* in the nose; is a more effective decolonisation strategy needed? // Journal of hospital infection. – 2010. – V. 76. – № 3. – P. 211–214.
372. Thomas, V.C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J., Hancock, L.E. 2009. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis* // Molecular microbiology. – 2009. – V. 72. – P. 1022–1036.
373. Tiwari, V., Patel, V., Tiwari, M. *In silico* screening and experimental validation reveal L-Adrenaline as anti-biofilm molecule against biofilm-associated protein (Bap) producing *Acinetobacter baumannii* // International journal of biological macromolecules. – 2018. – V. 107. – Pt. A. – P. – 1242–1252.
374. Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J.D.H., Braun, P.G., Darmon, E., Dorenbos, R., Dubois, J.Y., Westers, H., Zanen, G., Quax, W.J., Kuipers, O.P., Bron, S., Hecker, M., van Dijl, J.M. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the ‘secrets’ of the secretome // Microbiology and molecular biology reviews. – 2004. – V. 68. – P. 207–233
375. Thomas, S., Izard, J., Walsh, E., Batich, K., Chongsathidkiet, P., Clarke, G., Sela, D.A., Muller, A.J., Mullin, J.M., Albert, K., Gilligan, J.P., DiGuilio, K., Dilbarova, R., Alexander, W., Prendergast, G.C. The host microbiome regulates and maintains human health: a primer and perspective for non-microbiologists // Cancer research. – 2017. – V. 77. – № 8. – P. 1783–1812.
376. Thursby, E., Juge, N. Introduction to the human gut microbiota // Biochemical Journal. – 2017. – V. 474. – № 11. – P. 1823–1836.

377. Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management // *Clinical microbiology reviews*. – 2015. – V. 28. – № 3. – P. 603–661.
378. Torres, N. S., Abercrombie, J. J., Srinivasan, A., Lopez-Ribot, J. L., Ramasubramanian, A. K., Leung, K.P. Screening a commercial library of pharmacologically active small molecules against *Staphylococcus aureus* biofilms // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016. – V. 60. – № 10. – P. 5663–5672.
379. Torricelli, C., Capurro, E., Santucci, A., Paffetti, A., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. Multiple plasma proteins control atrial natriuretic peptide (ANP) aggregation // *Journal of molecular endocrinology*. – 2004. – V. 33. – № 2. – P. 335–341.
380. Toté, K., Berghe, D.V., Deschacht, M., de Wit, K., Maes, L., Cos, P. Inhibitory efficacy of various antibiotics on matrix and viable mass of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *International journal of antimicrobial agents*. – 2009. – V. 53. – № 9. – P. 3855–3859.
381. Totté, J.E., van der Feltz, W.T., Bode, L.G., van Belkum, A., van Zuuren, E.J., Pasmans, S.G. A systematic review and meta-analysis on *Staphylococcus aureus* carriage in psoriasis, acne and rosacea // *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*. – 2016. – V. 35. – № 7. – P. 1069–1077.
382. Toutain-Kidd, C.M., Kadivar, S.C., Bramante, C.T., Bobin, S. A., Zegans, M.E. Polysorbate 80 inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its cleavage by the secreted lipase LipA // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2009. – V. 53. – № 1. – P. 136–145.
383. Tran, P. V., Georgieff, M. K., Engeland, W. C. Sodium depletion increases sympathetic neurite outgrowth and expression of a novel TMEM35 gene-derived protein (TUF1) in the rat adrenal zona glomerulosa // *Endocrinology*. 2010. – V. 151. – № 10. – P. 4852–4860.
384. Tran, P.L., Lowry, N., Campbell, T., Reid, T.W., Webster, D.R., Tobin, E., Aslani, A., Mosley, T., Dertien, J., Colmer-Hamood, J.A., Hamood, A. N. An organoselenium compound inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms on hemodialysis catheters *in vivo* // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2012. – V. 56. – № 2. – P. 972–978.
385. Trentin Dda, S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., da Silva, A.G., da Silva, M.V., Correia, M.T., Baumvol, I.J., Macedo, A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles // *Journal of ethnopharmacology*. – 2011. – V. 137. – № 1. – P. 327–335.
386. Treviño, M., Moldes, L., Hernández, M., Martínez-Lamas, L., García-Riestra, C., Regueiro, B.J. Nosocomial infection by VIM-2 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* // *Journal of medical microbiology*. – 2010. – V. 59. – Pt. 7. – P. 853–5

387. Trompezinski, S., Weber, S., Cadars, B., Larue, F., Ardiet, N., Chavagnac-Bonneville, M., Sayag, M., Jourdan, E. Assessment of a new biological complex efficacy on dysseborrhea, inflammation, and *Propionibacterium acnes* proliferation // Clinical, cosmetic and investigational dermatology. – 2016. – V. 9. – P. 233–239.
388. Tsai, T.-H., Chuang, L.-T., Lien, T.-J., Liing, Y.-R., Chen, W.-Y., Tsai, P.-J. *Rosmarinus officinalis* extract suppresses *Propionibacterium acnes*-induced inflammatory responses // Journal of medicinal food. – 2013. – V. 16. – 4. – P. 324–333.
389. Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. // Journal of eukaryotic microbiology. – 1999. – V. 46. – P. 327–338.
390. Tyner, H., Patel, R. *Propionibacterium acnes* biofilm - A sanctuary for *Staphylococcus aureus*? // Anaerobe. – 2016. – V. 40. – P. 63–67.
391. UniProt [электронный ресурс] / UniProt // UniProt Consortium. – 2018. – Режим доступа: <https://www.uniprot.org>
392. van de Belt, H., Neut, D., Schenk, W., van Horn, J.R., van Der Mei, H.C., Busscher, H.J. *Staphylococcus aureus* biofilm formation on different gentamicin-loaded polymethylmethacrylate bone cements // Biomaterials. – 2001. – V. 22. – № 12. – P. 1607–1611.
393. van Hal, S.J., Fowler, V.G. Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections? // Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious diseases society of America. - 2013. – V. 56. – № 12. – P. 1779–1788.
394. Vandecandelaere, I., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Coenye, T. Metabolic activity, urease production, antibiotic resistance and virulence in dual species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* // Rohde, H. edited PLoS ONE. – 2017. – V. 12. – № 3. – e0172700.
395. Verhoeven, A.B., Durham-Colleran, M.W., Pierson, T., Boswell, W.T., Van Hoek, M.L. *Francisella philomiragia* biofilm formation and interaction with the aquatic protist *Acanthamoeba castellanii* // The biological bulletin. – 2010. – V. 219. – № 2. – P. 178–188.
396. Veron, W., Orange, N., Feuilloley, M.G., Lesouhaitier O. Natriuretic peptides modify *Pseudomonas fluorescens* cytotoxicity by regulating cyclic nucleotides and modifying LPS structure // BMC Microbiology. – 2008. – V. 8. – № 114.
397. Vijayabaskar, P., Babinastarlin, S., Shankar, T., Sivakumar, T., Anandapandian, K.T. Quantification and characterization of exopolysaccharides from *Bacillus subtilis* (MTCC 121) // Advances in biological research (Rennes). – 2013. – P. 71–76.
398. Vijayalakshmi, S., Hancock, L. Deletion of _54 (rpoN) alters the rate of autolysis and biofilm formation in *Enterococcus faecalis* // Journal of bacteriology. – 2012. – V. 194. – P. 368–375.

399. Virgin, H.W. The virome in mammalian physiology and disease // *Cell*. – 2014. – V. 157. – № 1. – P. 142–150.
400. Visnapuu, T., Mardo, K., Mosoarca, C., Zamfir, A.D., Vigants, A., Alamäe, T. Levansucrases from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*: substrate specificity, polymerizing properties and usage of different acceptors for fructosylation // *Journal of biotechnology*. – 2011. – V. 155. – 3. – P. 338–349.
401. Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugregard, P., Losick, R., Kolter, R.. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way // *Nature reviews microbiology*. – 2013. – V. 11. – № 3. – P. 157–168.
402. Vornhagen, J., Stevens, M., McCormick, D., Dowd, S. E., Eisenberg, J. N. S., Boles, B. R., & Rickard, A. H. (2013). Coaggregation occurs amongst bacteria within and between domestic showerhead biofilms // *Biofouling*. – 2013. – V. 29. – № 1. – P. 53–68.
403. Wakabayashi, G., Gelfand, J.A., Jung, W.K., Connolly, R.J., Burke, J.F., Dinarello, C.A. *Staphylococcus epidermidis* induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to *Escherichia coli* // *Journal of clinical investigation*. – 1991. – V. 87. – 6. – P. 1925–1935.
404. Walker, A.W. Studying the human microbiota // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2016. – V. 902. – P. 5–32.
405. Walkley, A. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon in soils: effect of variation in digestion conditions and of inorganic soil constituents // *Soil science*. – 1947. – V. 63. – 1947. – P. 251-263.
406. Wang, Y., Kuo, S., Shu, M., Yu, J., Huang, S., Dai, A., Two, A., Gallo, R.L., Huang, C.-M. *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes*: implications of probiotics in acne vulgaris // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2014. – V. 98. – № 1. – P. 411–424.
407. Wang, X., Chen, Y., Huang, Y., Zhou, Y., Zhao, G., Ye, L., Lei, Y., Tang, Q. Function of intercellular adhesion A, fibrinogen binding protein, and accumulation-associated protein genes in formation of *Staphylococcus epidermidis*-*Candida albicans* mixed species biofilms // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. – 2015. – V. 29. – № 1. – P. 63–68.
408. Wang, M.C., Liu, C.Y., Shiao, A.S., Wang, T. Ear problems in swimmers // *Journal of the chinese medical association*. – 2005. – V. 68. – № 8. – P. 347–352.
409. Wang, X., Qiu, S., Yao, X., Tang, T., Dai, K., Zhu, Z. Berberine inhibits *Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation on the surface of titanium alloy // *Journal of orthopaedic research*. – 2009. – V. 27. – № 11. – P. 1487–1492.

410. Wang, Q., Sun, F.J., Liu, Y., 2010. Enhancement of biofilm formation by subinhibitory concentrations of macrolides in icaADBC-positive and -negative clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2010. – V. 54. – № 6. – P. 2707–2711.
411. Wang, Y., Wilks, J.C., Danhom, T., Ramos, I., Croal, L., Newman, D.K. Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition // Journal of bacteriology. – 2011. – V. 193. – № 14. – P. 3606–3617
412. Wang, X., Yao, X., Zhu, Z., Tang, T., Dai, K., Sadovskaya, I., Flahaut, S., Jabbouri, S. Effect of berberine on *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation // International journal of antimicrobial agents. – 2009a. – V. 34. – № 1. – P. 60-66.
413. Wang, D., Yu, J. M., Dorosky, R. J., Pierson, L. S., Pierson, E. A. The phenazine 2-hydroxy-phenazine-1-carboxylic acid promotes extracellular DNA release and has broad transcriptomic consequences in *Pseudomonas chlororaphis* 30–84 // PLoS ONE. – 2016. – V. 11. – № 1. – e0148003.
414. Weidenmaier, C., Kokai-Kun, J.F., Kulauzovic, E., Kohler, T., Thumm, G., Stoll, H., Götz, F., Peschel, A. Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* nasal colonization // International journal of medical microbiology. – 2008. – V.298. – № 5–6. – P. 505–513.
415. Wendel, S.O., Menon, S., Alshetaiwi, H., Shrestha, T.B., Chlebanowski, L., Hsu, W.-W., Bossmann, S.H., Narayanan, S., Troyer, D. L. Cell based drug delivery: *Micrococcus luteus* loaded neutrophils as chlorhexidine delivery vehicles in a mouse model of liver abscesses in cattle // PLoS ONE. – 2015. – V. 10. – 5. – e0128144.
416. Widerström, M., McCullough, C.A., Coombs, G.W., Monsen, T., Christiansen, K.J. A multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* clone (ST2) is an ongoing cause of hospital-acquired infection in a western australian hospital // Journal of clinical microbiology. – 2012. – V. 50. – № 6. – P. 2147–2151. Winkler, J., Block, C., Leibovici, L., Faktor, J., Pitlik, S.D. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: correlation with hormonal status in women // The journal of infectious diseases. – 1990. – V. 162. – № 6. – P. 1400–1402.
417. Williams, H.C., Dellavalle, R.P., Garner S. Acne vulgaris // Lancet. – 2012. – V. 379. – № 9813. – P. 361–372.
418. Wilson, S., Drew, R. Cloning and DNA sequence of *amiC*, a new gene regulating expression of the *Pseudomonas aeruginosa* aliphatic amidase, and purification of the *amiC* product // Journal of bacteriology. – 1991. – V. 173. – № 16. – P. 4914-4921.
419. Wollenberg, M.S., Claesen, J., Escapa, I.F., Aldridge, K.L., Fischbach, M.A., Lemon, K. P. *Propionibacterium*-produced coproporphyrin III induces *Staphylococcus aureus* aggregation and biofilm formation // mBio. – 2014. – V. 5. – № 4. – e01286–14.

420. Worthington, R.J., Richards, J.J., Melander, C. Small molecule control of bacterial biofilms // *Organic & biomolecular chemistry*. – 2012. – V. 10. – № 37. – P. 7457–7474.
421. Wu, D.C., Chan, W.W., Metelitsa, A.I., Fiorillo, L., Lin, A.N. *Pseudomonas* skin infection: clinical features, epidemiology, and management // *American journal of clinical dermatology*. – 2011. – V. 12. – № 3. – 157–169.
422. Wu, E.C., Kowalski, R.P., Romanowski, E.G., Mah, F.S., Gordon, Y.J., Shanks, R.M. Q. AzaSite[®] inhibits *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* biofilm formation *in vitro* // *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*. – 2010. – V. 26. – № 6. – P. 557–562.
423. Xiao, Y., Woo, W.-M., Nagao, K., Li, W., Terunuma, A., Mukoyama, Y.S., Oro, A.E., Vogel, J.C., Brownell I. Perivascular hair follicle stem cells associate with a venule annulus // *The Journal of investigative dermatology*. – 2013. – V. 133. – № 10. – P. 2324–2331.
424. Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., Zhang, R. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation // *Applied and environmental microbiology*. – 2013. – V. 79. – 3. – P. 808–815.
425. Xu, Z., Wang, Z., Yuan, C., Liu, X., Yang, F., Wang, T., Wang J., Manabe K., Qin O., Wang X., Zhanh Y., Zhang, M. Dandruff is associated with the conjoined interactions between host and microorganisms // *Scientific reports*. – 2016. – V. 6. – 24877.
426. Yadav, M.K., Chae, S.-W., Im, G.J., Chung, J.-W., Song, J.-J. Eugenol: A phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms // *PLoS ONE*. – 2015. – V. 10. – 3. – e0119564.
427. Yadav, M.K., Chae, S.-W., Go, Y.Y., Im, G.J., & Song, J.-J. *In vitro* multi-species biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and their host interaction during *in vivo* colonization of an otitis media rat model // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2017. – V. 7. – 125.
428. Yang, D., Pornpattananangkul, D., Nakatsuji, T., Chan, M., Carson, D., Huang, C.-M., & Zhang, L. The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes* // *Biomaterials*. – 2009. – V. 30. – № 30. – P. 6035–6040.
429. Yin, S., Jiang, B., Huang, G., Zhang, Y., You, B., Chen, Y., Gong, Y., Chen, J., Yuan, Z., Zhao, Y., Li, M., Hu, F., Yang, Z., Peng, Y. The interaction N-acetylcysteine and serum transferrin promotes bacterial biofilm formation // *Cellular physiology and biochemistry*. - 2018. – V. 45. – P. 1399–1409.
430. Young, M., Artsatbanov, V., Beller, H.R., Chandra, G., Chater, K.F., Dover, L.G., Goh, E.B., Kahan, T., Kaprelyants, A.S., Kyrpides, N., Lapidus, A., Lowry, S.R., Lykidis, A., Mahillon, J., Markowitz, V., Mavromatis, K., Mukamolova, G.V., Oren, A., Rokem, J.S., Smith, M.C., Young, D.I.,

Greenblatt, C.L. Genome sequence of the fleming strain of *Micrococcus luteus*, a simple free-living actinobacterium // Journal of Bacteriology. – 2009. – V. 192. – № 3. – P. 841–860.

431. Yousri, T., Hawari, M., Saad, R., Langley, S. *Kytococcus schroeteri* prosthetic valve endocarditis // BMJ Case Reports. – 2010. – bcr0620103064.

432. Yu, J.M., Wang, D., Ries, T. R., Pierson, L.S., Pierson, E.A. An upstream sequence modulates phenazine production at the level of transcription and translation in the biological control strain *Pseudomonas chlororaphis* 30-84. PLoS ONE. – V. 13. – № 2. – e0193063.

433. Zanger, P., Nurjadi, D., Gaile, M., Gabrysch, S., Kremsner, P.G. Hormonal contraceptive use and persistent *Staphylococcus aureus* nasal carriage // Clinical infectious diseases. – 2012. – V. 55. – № 12. – P. – 1625–1632.

434. Zhao J., Wang Q., Li M., Heijstra, B.D., Wang, S., Liang, Q., Qi, Q. *Escherichia coli* toxin gene *hipA* affects biofilm formation and DNA release // Microbiology. – 2013. – V. 159. – P. 633–640.

435. Zheng, L., Chen, Z., Itzek, A., Ashby, M., Kreth, J. Catabolite control protein a controls hydrogen peroxide production and cell death in *Streptococcus sanguinis* // Journal of bacteriology. – 2011. – V. 193. – P. 516–526.

436. Zhurina, M.V., Gannesen, A.V., Zdorovenko, E.L., Plakunov, V.K. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms // Microbiology. – 2014. – V. 83. – № 6. – P. 713–722

437. Zweerink, M.M., Edison, A. Inhibition of *Micrococcus luteus* DNA gyrase by norfloxacin and 10 other quinolone carboxylic acids // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1986. – V. 29. – № 4. – P. 598–601.

ПРИЛОЖЕНИЕ

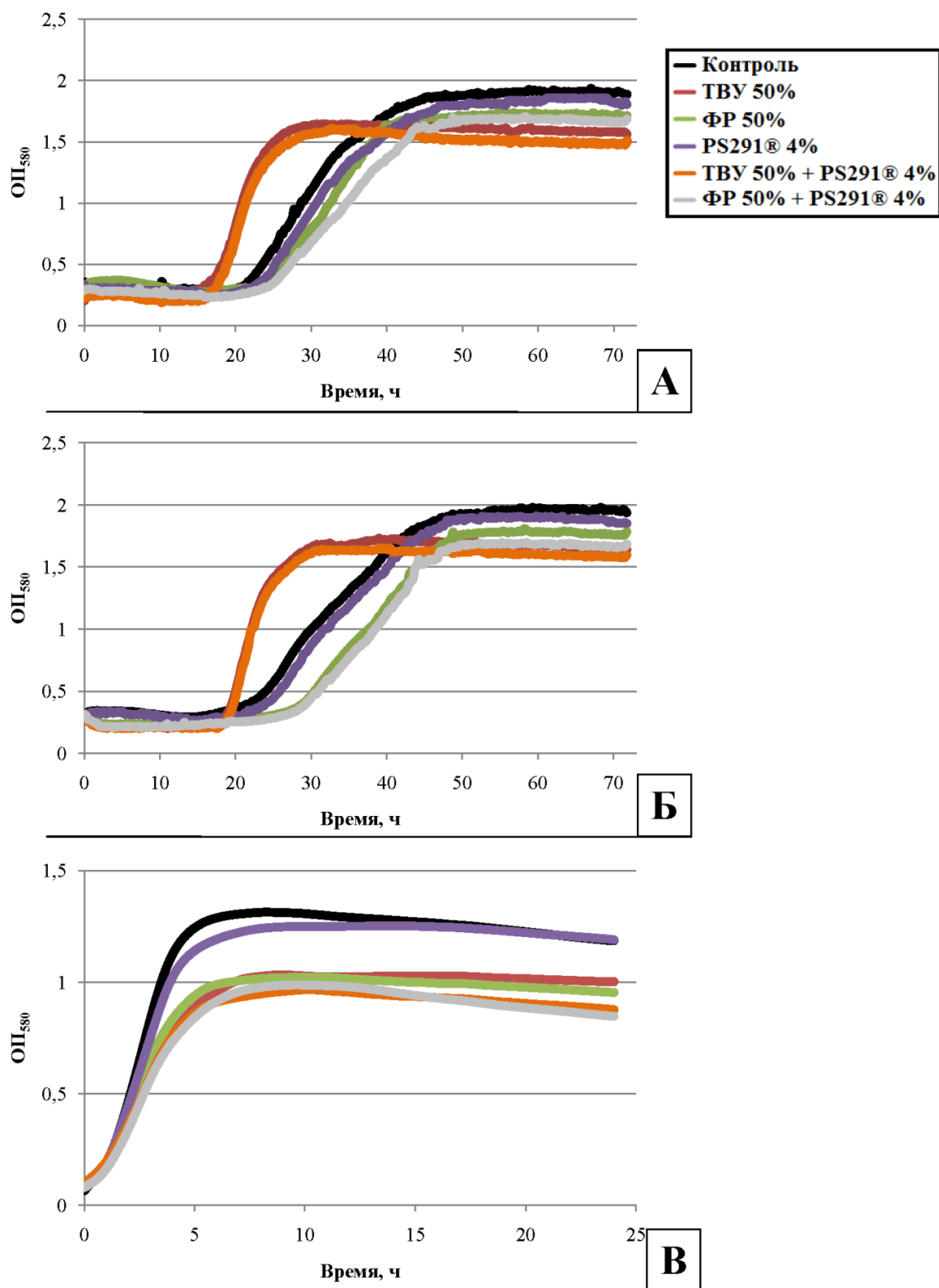


Рис. 1П. Динамика роста культур микроорганизмов-комменсалов кожи человека в присутствии компонентов косметических препаратов. А – *S. acnes* RT5, Б – *S. acnes* RT4, В – *S. aureus* MFP03.

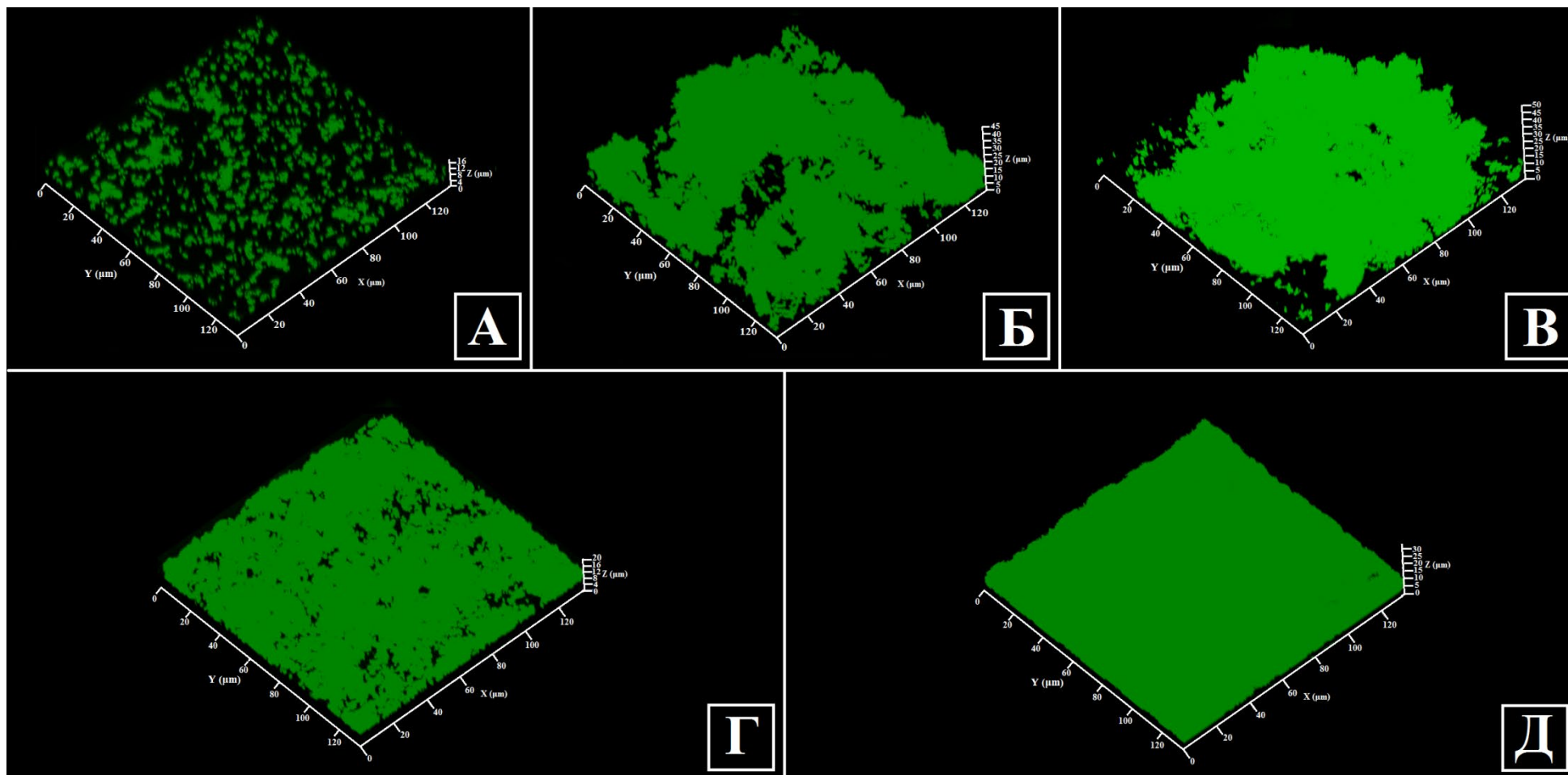


Рис. 2П. Визуализация биопленок *C. acnes* RT5, выращенных в присутствии компонентов косметических препаратов, при помощи КЛСМ. Окраска Syto9 Green. А – контроль начальной адгезии клеток. Б – контрольный образец после 72 ч инкубации. В – биопленки в присутствии 50% ФР. Г – биопленки в присутствии 50% ТВУ. Д – биопленки в присутствии PS291 4%.

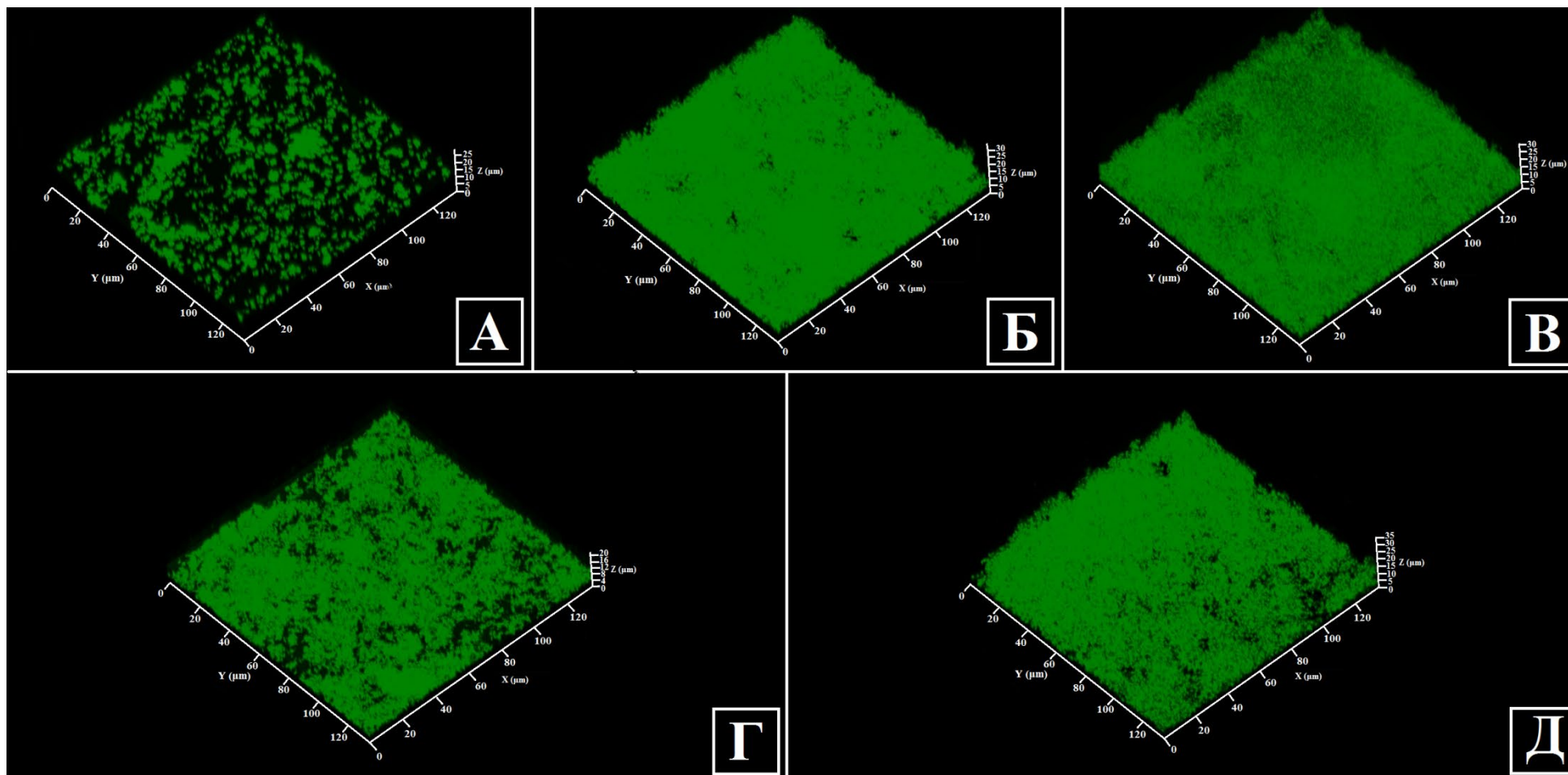


Рис. 3П. Визуализация биопленок *C. acnes* RT4, выращенных в присутствии компонентов косметических препаратов, при помощи КЛСМ. Окраска Syto9 Green. А – контроль начальной адгезии клеток. Б – контрольный образец после 72 ч инкубации. В – биопленки в присутствии 50% ФР. Г – биопленки в присутствии 50% ТВУ. Д – биопленки в присутствии PS291 4%.

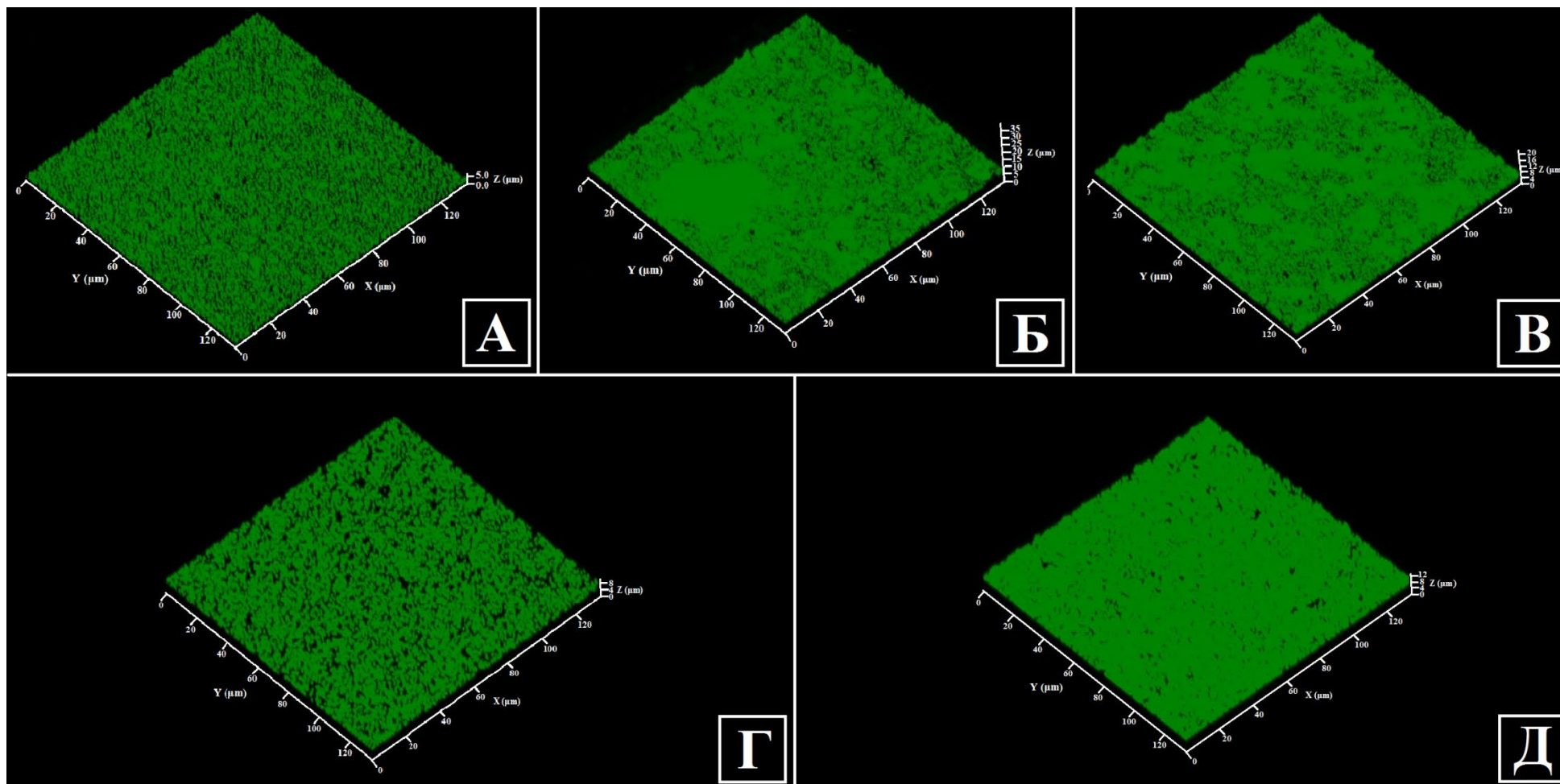


Рис. 4П. Визуализация биопленок *S. aureus* MFP03, выращенных в присутствии компонентов косметических препаратов, при помощи КЛСМ. Окраска Syto9 Green. А – контроль начальной адгезии клеток. Б – контрольный образец после 72 ч инкубации. В – биопленки в присутствии 50% ФР. Г – биопленки в присутствии 50% ТВУ. Д – биопленки в присутствии PS291 4%.

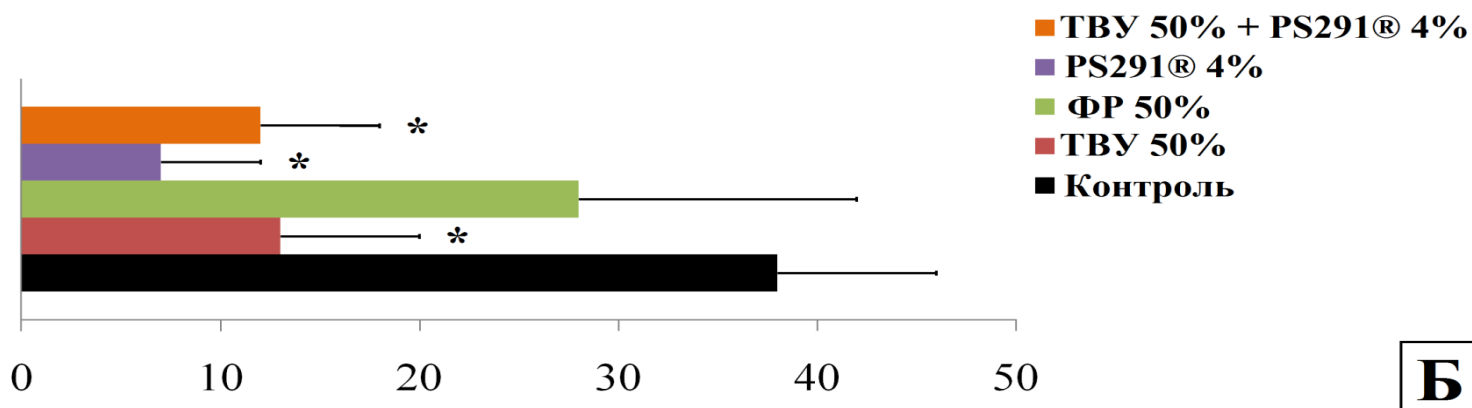
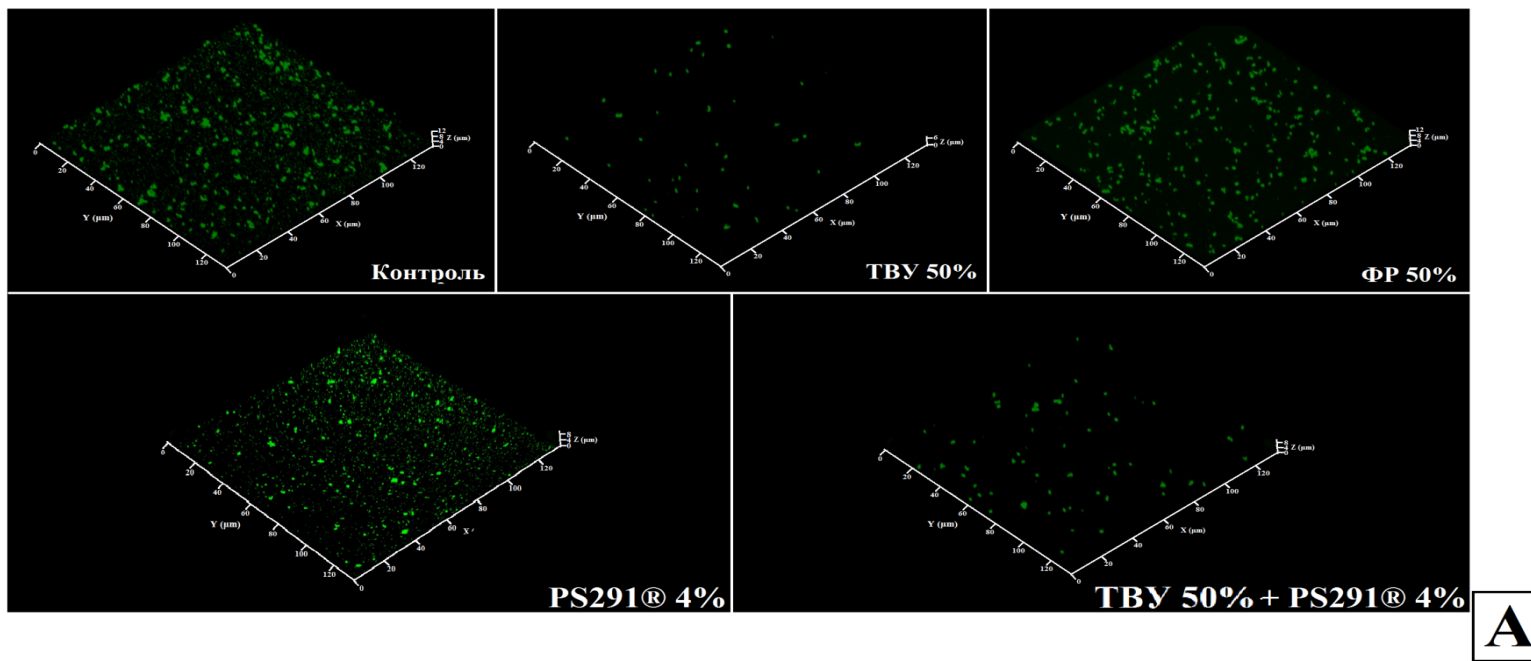


Рис. 5П. Влияние ТВУ и PS291® на формирование микроколоний *S. aureus* MFP03. А – КЛСМ-изображения микроколоний *S. aureus* в присутствии исследуемых соединений, окрашивание SYTO9 Green. Б – количество микроколоний в поле зрения. * - различие достоверно при $p=0.05$.

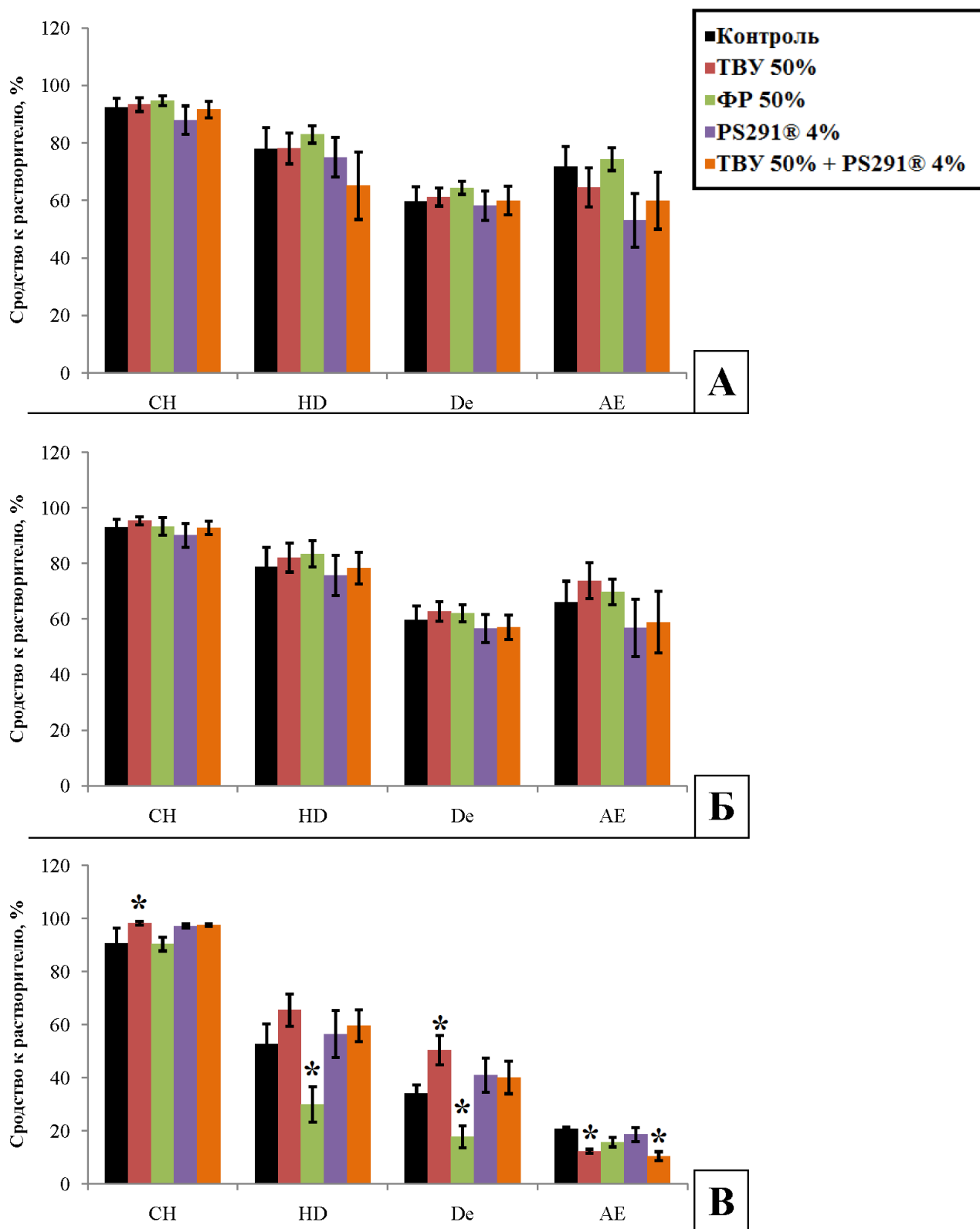


Рис. 6П. Изменение сродства клеток к растворителям: CH – хлороформу, HD – гексадекану, De – декану, AE - этилацетату. А – *C. acnes* RT5, Б – *C. acnes* RT4, В – *S. aureus* MFP03. * - различие достоверно при $p=0.05$.

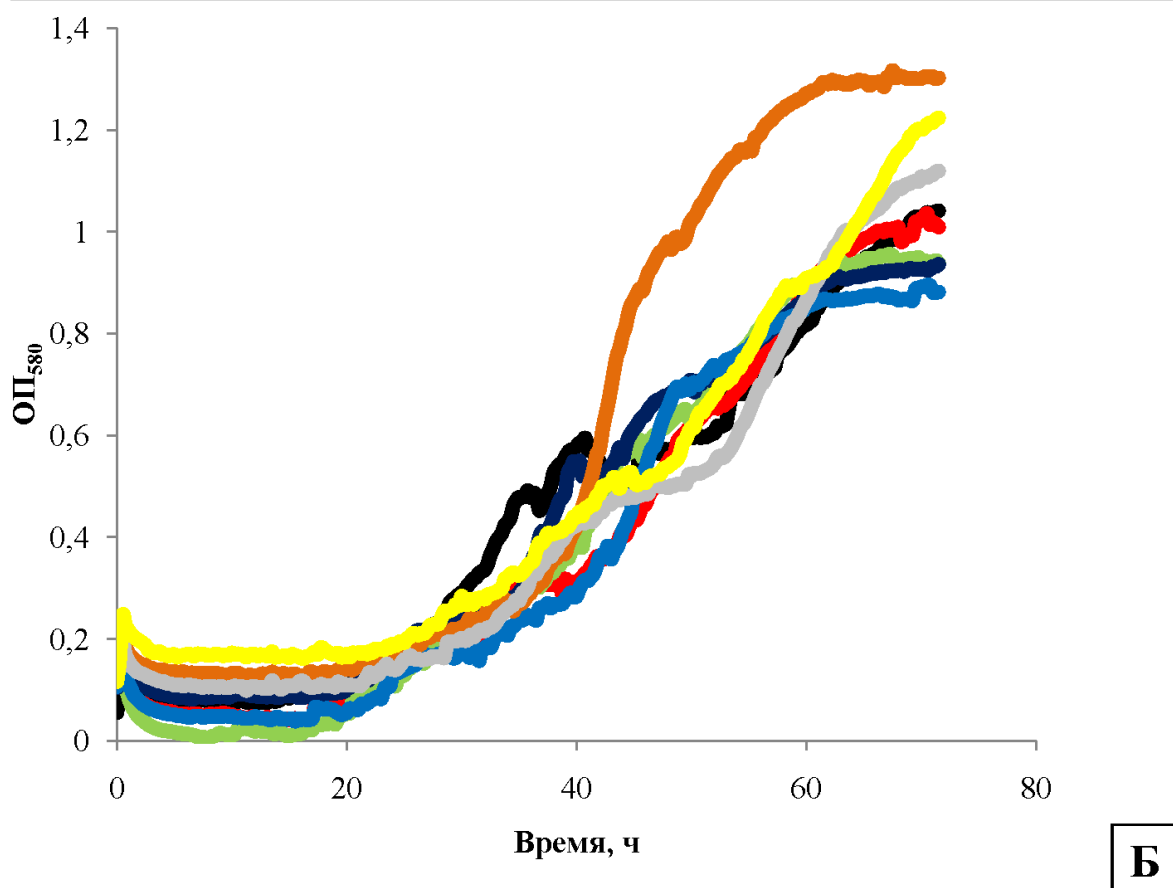
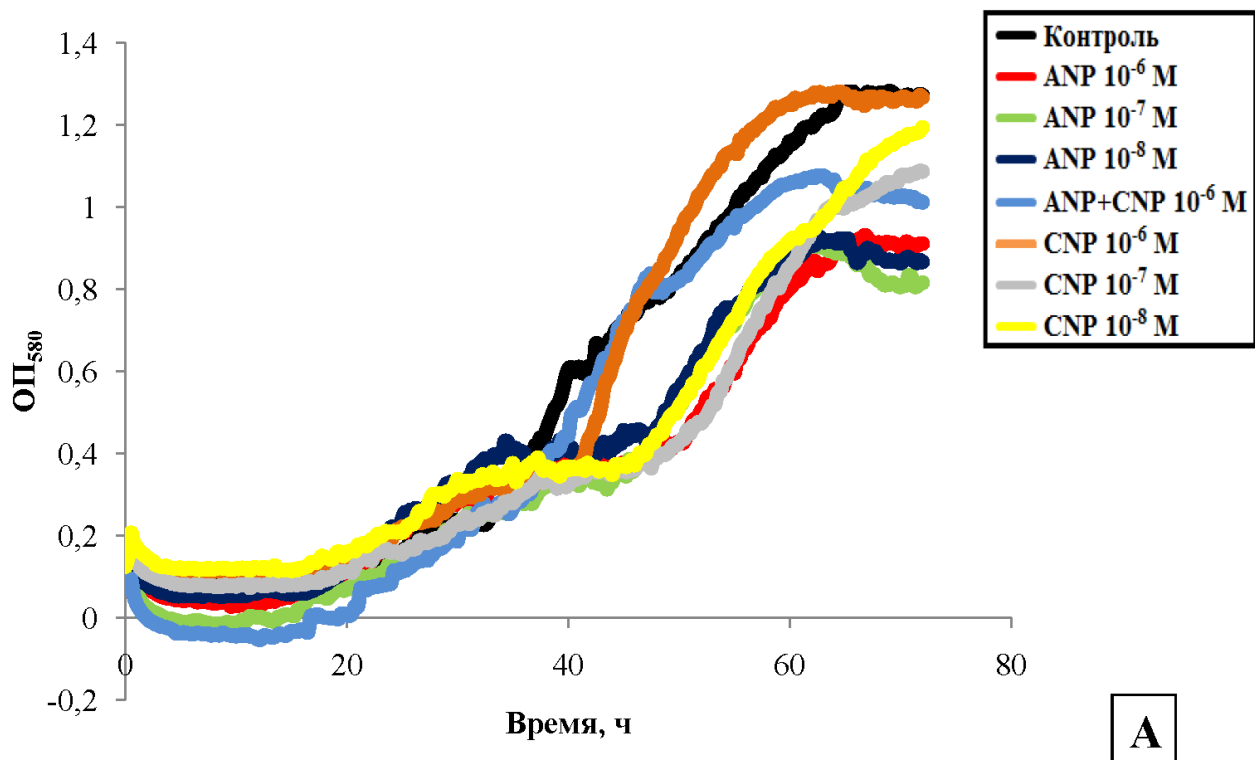


Рис. 7П. Динамика роста культур *C. acnes* в присутствии НУП. А – *C. acnes* RT5, Б – *C. acnes* RT4.

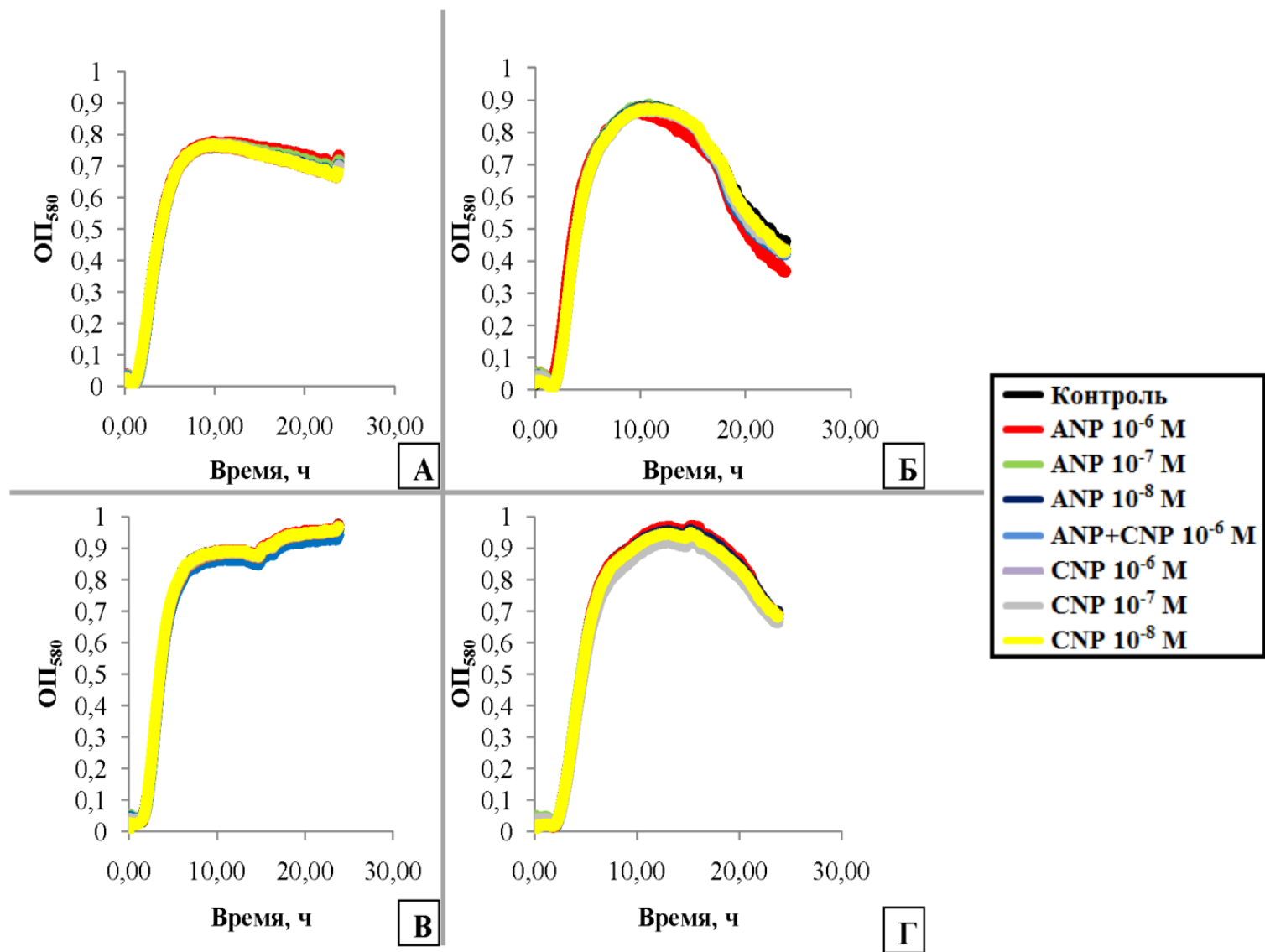


Рис. 8П. Динамика роста *S. aureus* МФР03 и *S. epidermidis* МФР04 в присутствии НУП. А – *S. aureus* при 37°C. Б – *S. epidermidis* при 37°C. В – *S. aureus* при 33°C, Г – *S. epidermidis* при 33°C.

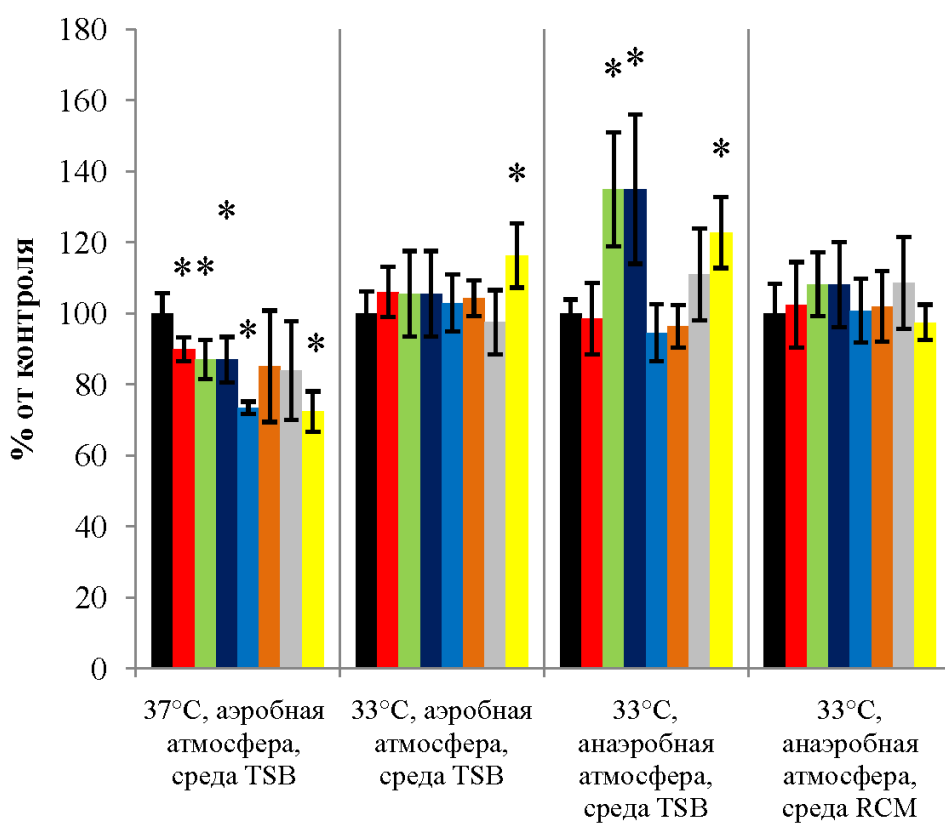
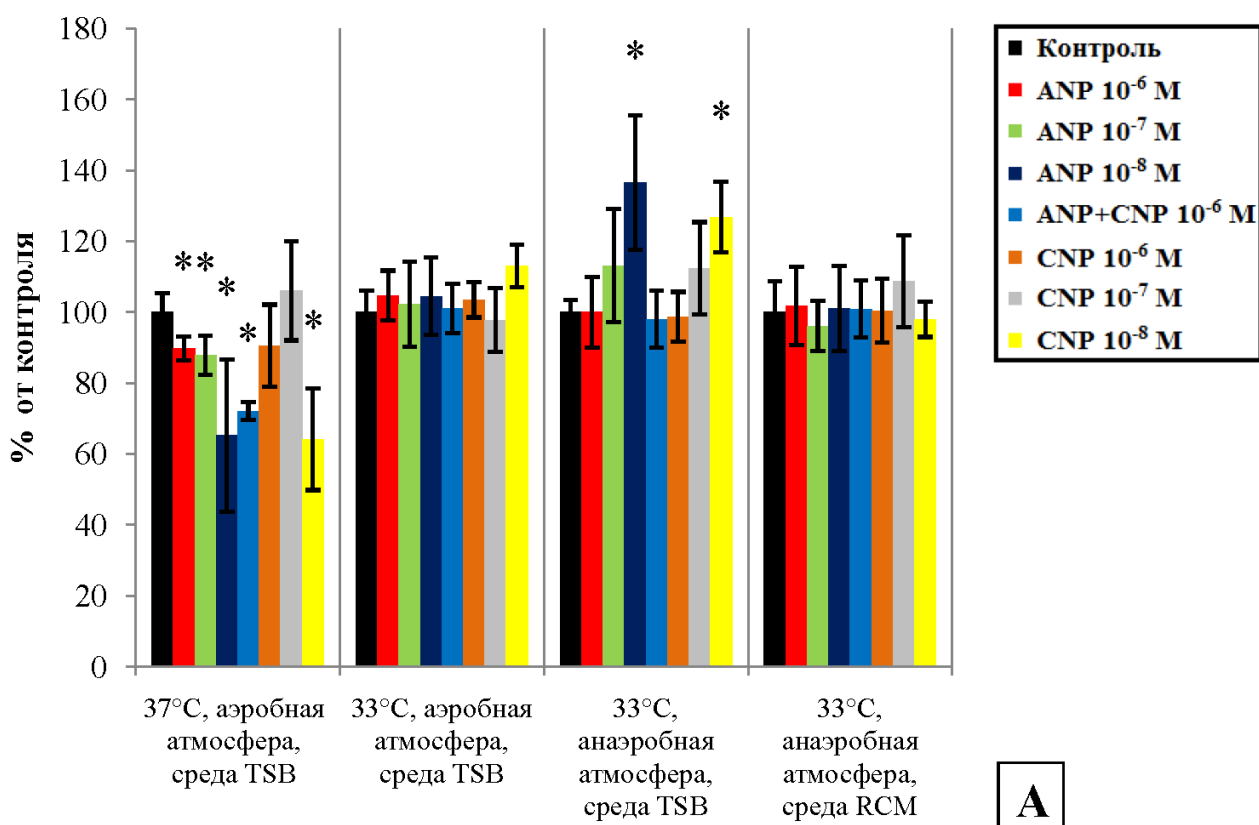


Рис. 9П. КЛСМ моновидовых биопленок *S. aureus* MFP03, выращенных в присутствии НУП. А – средняя плотность биомассы биопленок, Б – средняя толщина биопленок. * - различие достоверно при $p=0.05$.

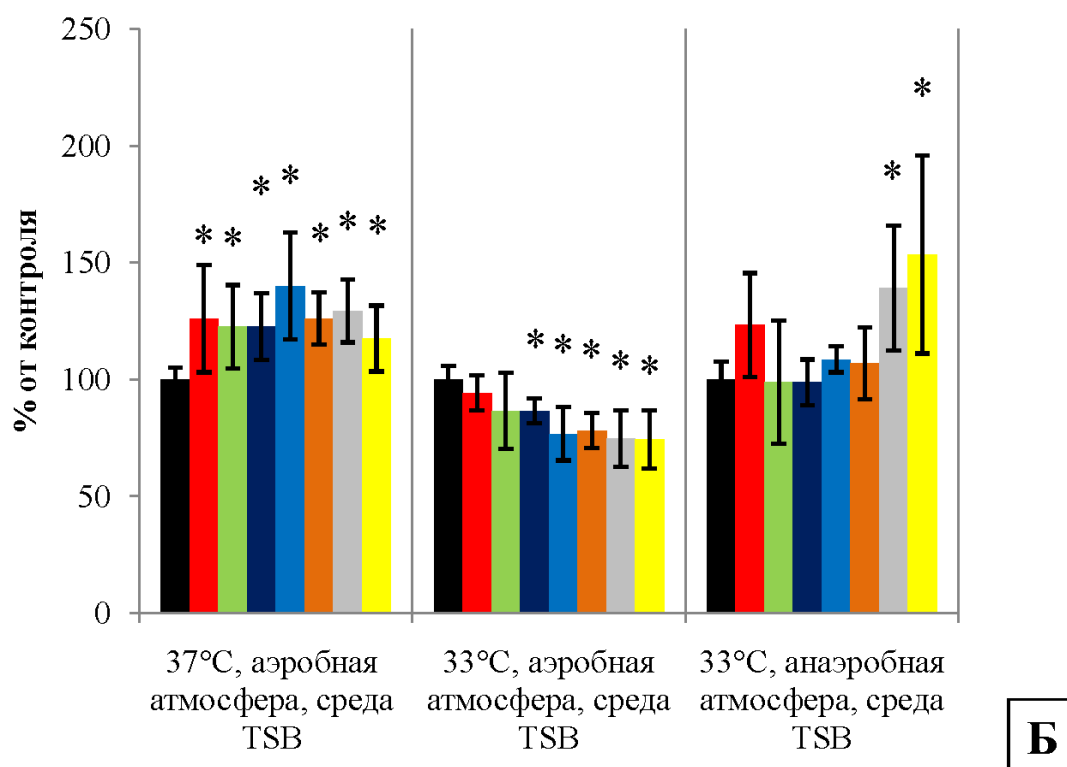
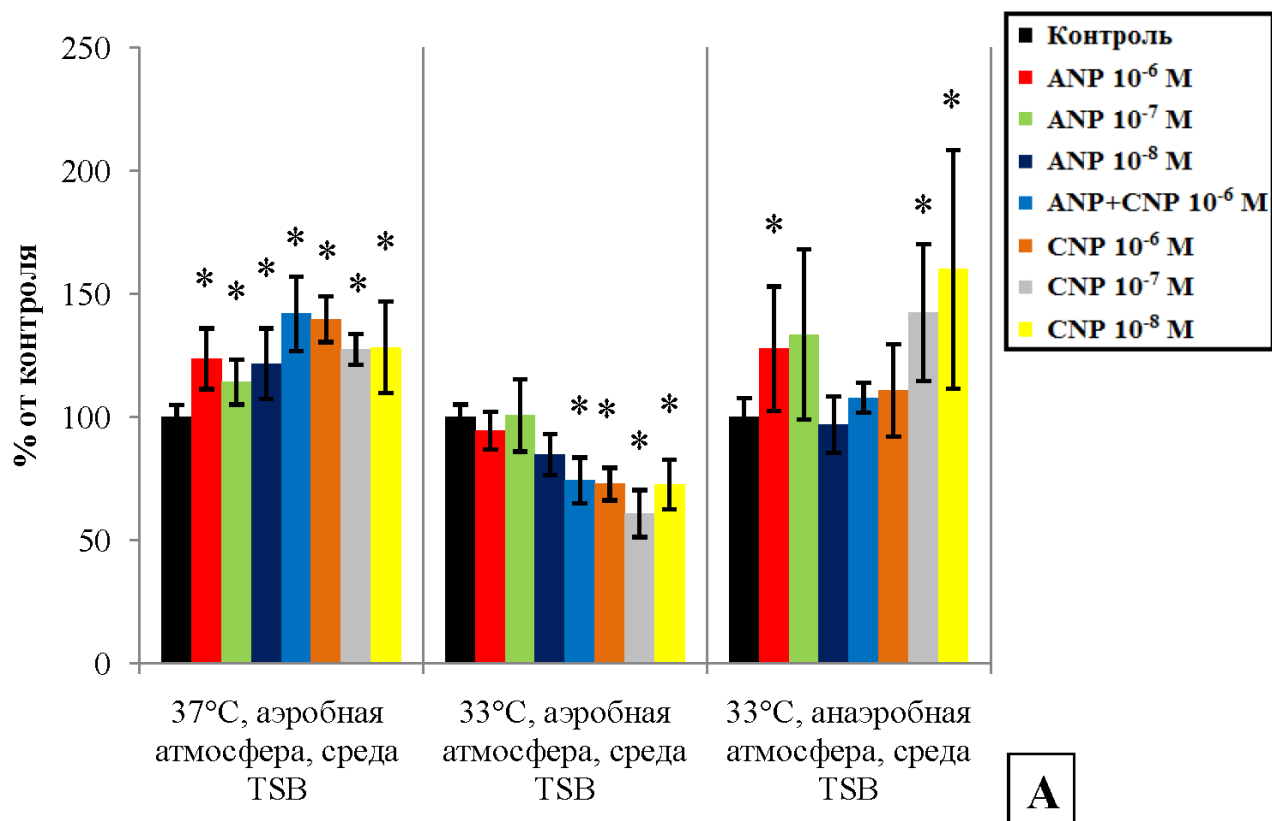


Рис. 10П. КЛСМ моновидовых биопленок *S. epidermidis* MFP04, выращенных в присутствии НУП. А – средняя толщина биопленок, Б – средняя плотность биомассы биопленок. * - различие достоверно при $p=0.05$.

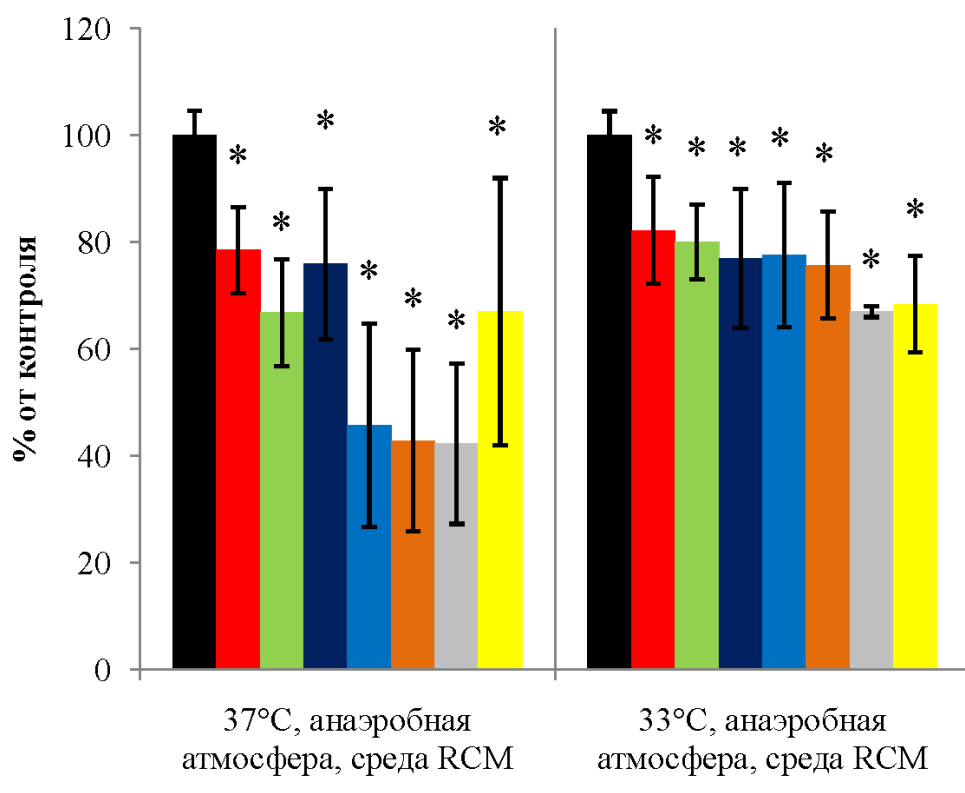
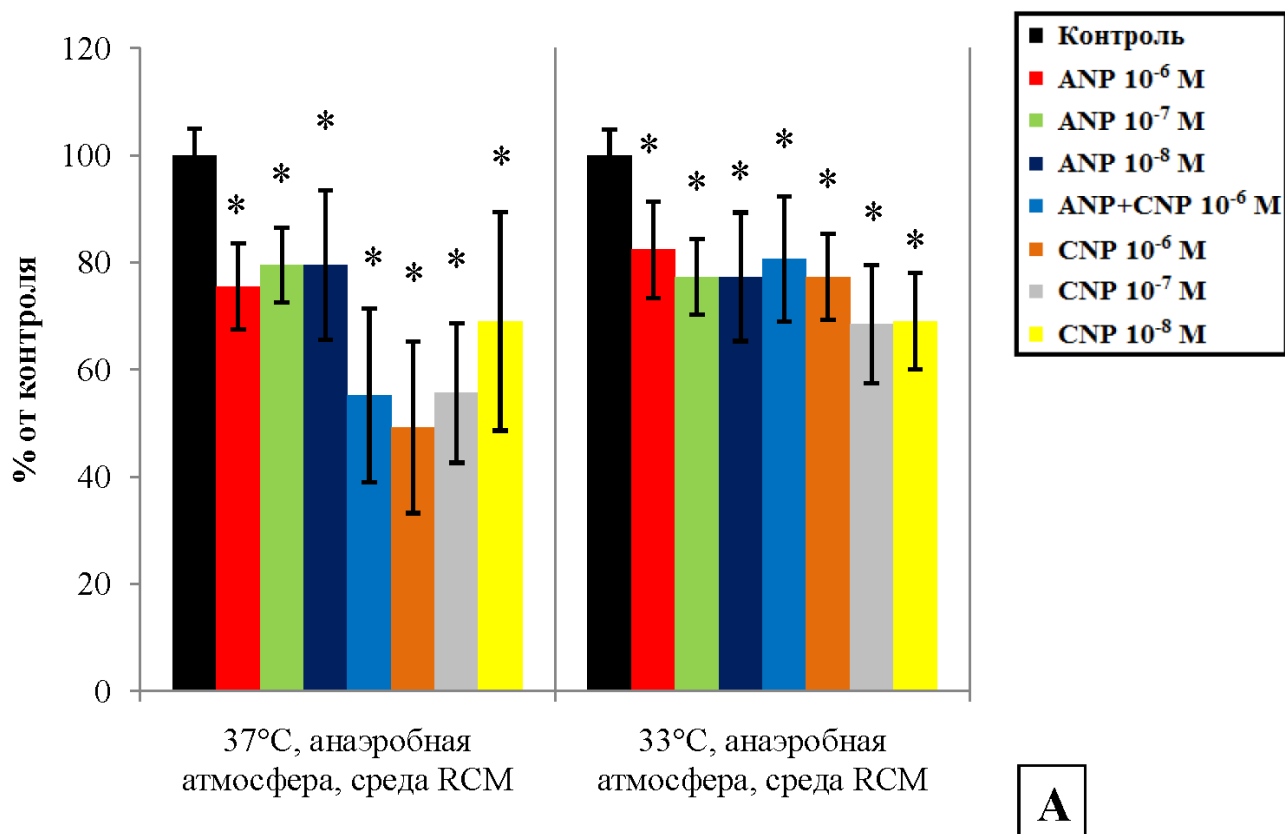
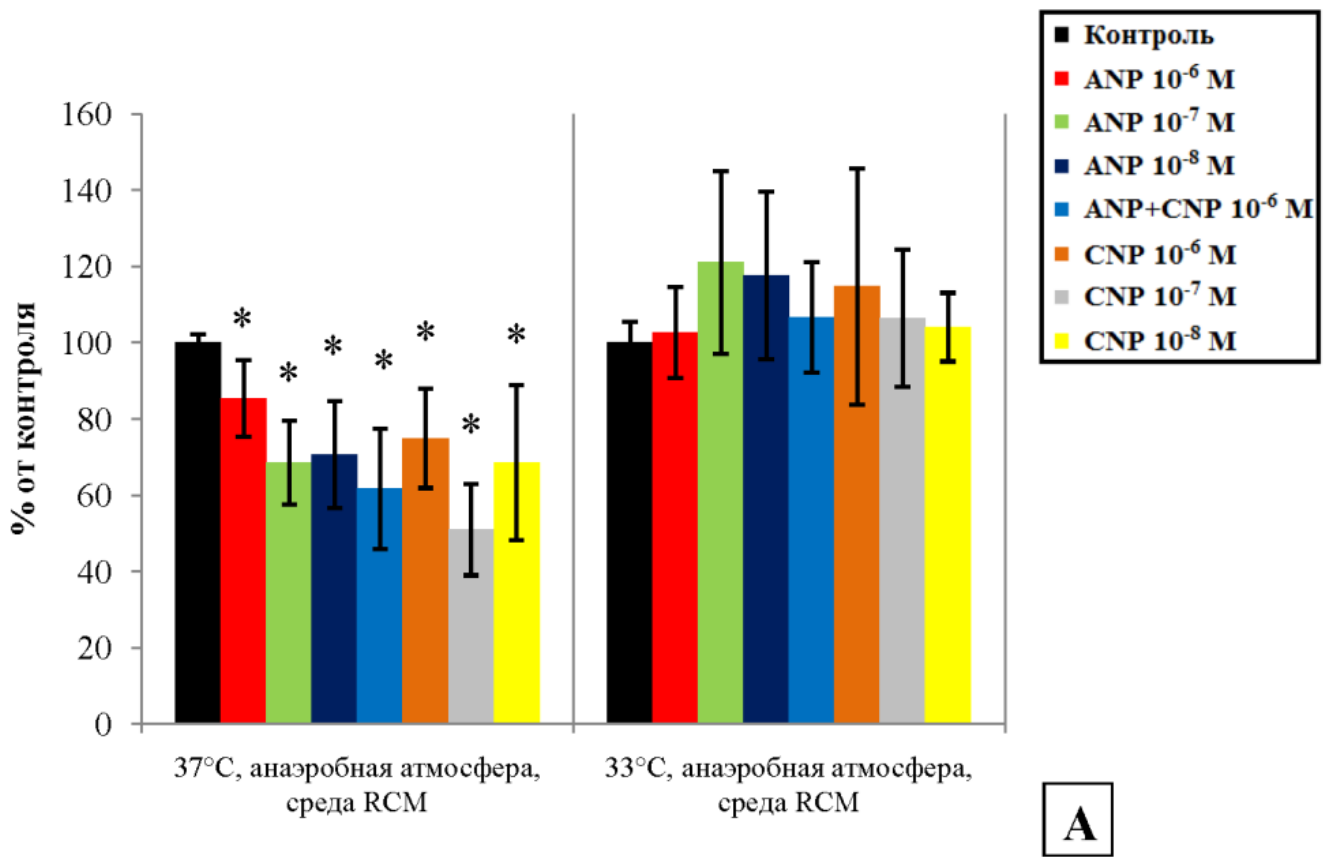
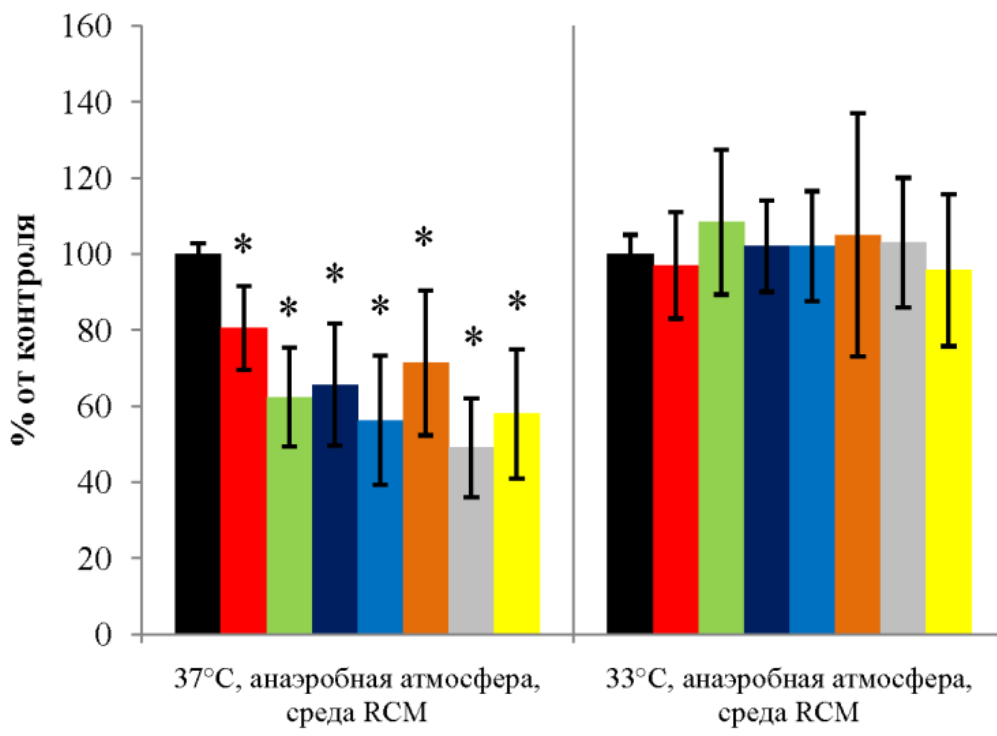


Рис. 11П. КЛСМ моновидовых биопленок *S. acnes* RT5, выращенных в присутствии НУП. А – средняя толщина биопленок, Б – средняя плотность биомассы биопленок. * - различие достоверно при $p=0.05$.



A



B

Рис. 12П. КЛСМ моновидовых биопленок *S. acnes* RT4, выращенных в присутствии НУП. А – средняя толщина биопленок, Б – средняя плотность биомассы биопленок. * - различие достоверно при $p=0.05$.

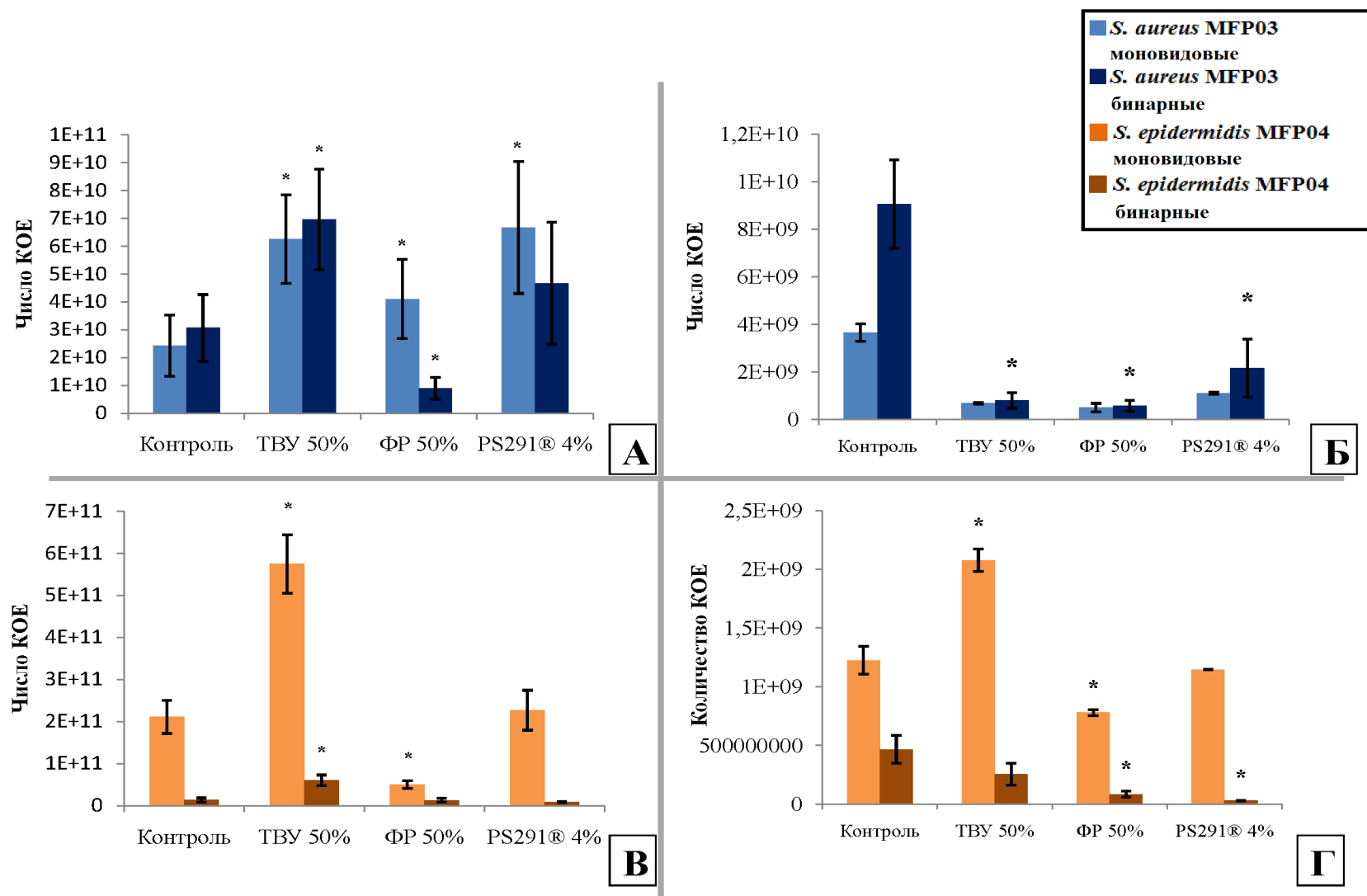


Рис. 13П. Сравнение числа КОЕ *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 в моновидовых и бинарных планктонных культурах и биопленках в присутствии компонентов косметики. А – число КОЕ *S. aureus* MFP03 в планктонных культурах; Б – число КОЕ *S. aureus* MFP03 в биопленках; В – число КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в планктонных культурах; Г число КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в биопленках.

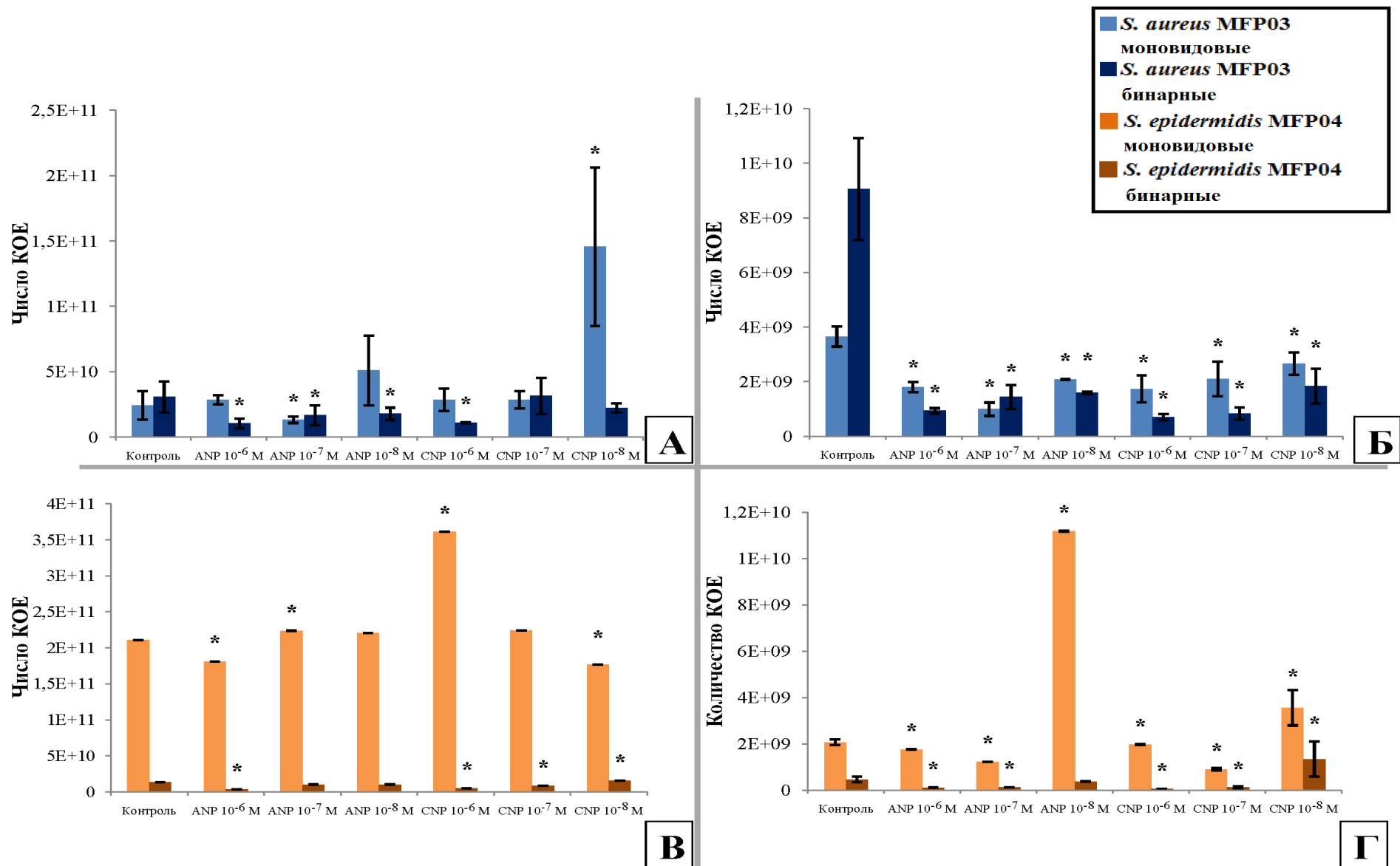


Рис. 14П. Сравнение числа КОЕ *S. aureus* MFP03 и *S. epidermidis* MFP04 в монокультурных и бинарных планктонных культурах и биопленках в присутствии НУП. А – число КОЕ *S. aureus* MFP03 в планктонных культурах; Б – число КОЕ *S. aureus* MFP03 в биопленках; В – число КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в планктонных культурах; Г – число КОЕ *S. epidermidis* MFP04 в биопленках.

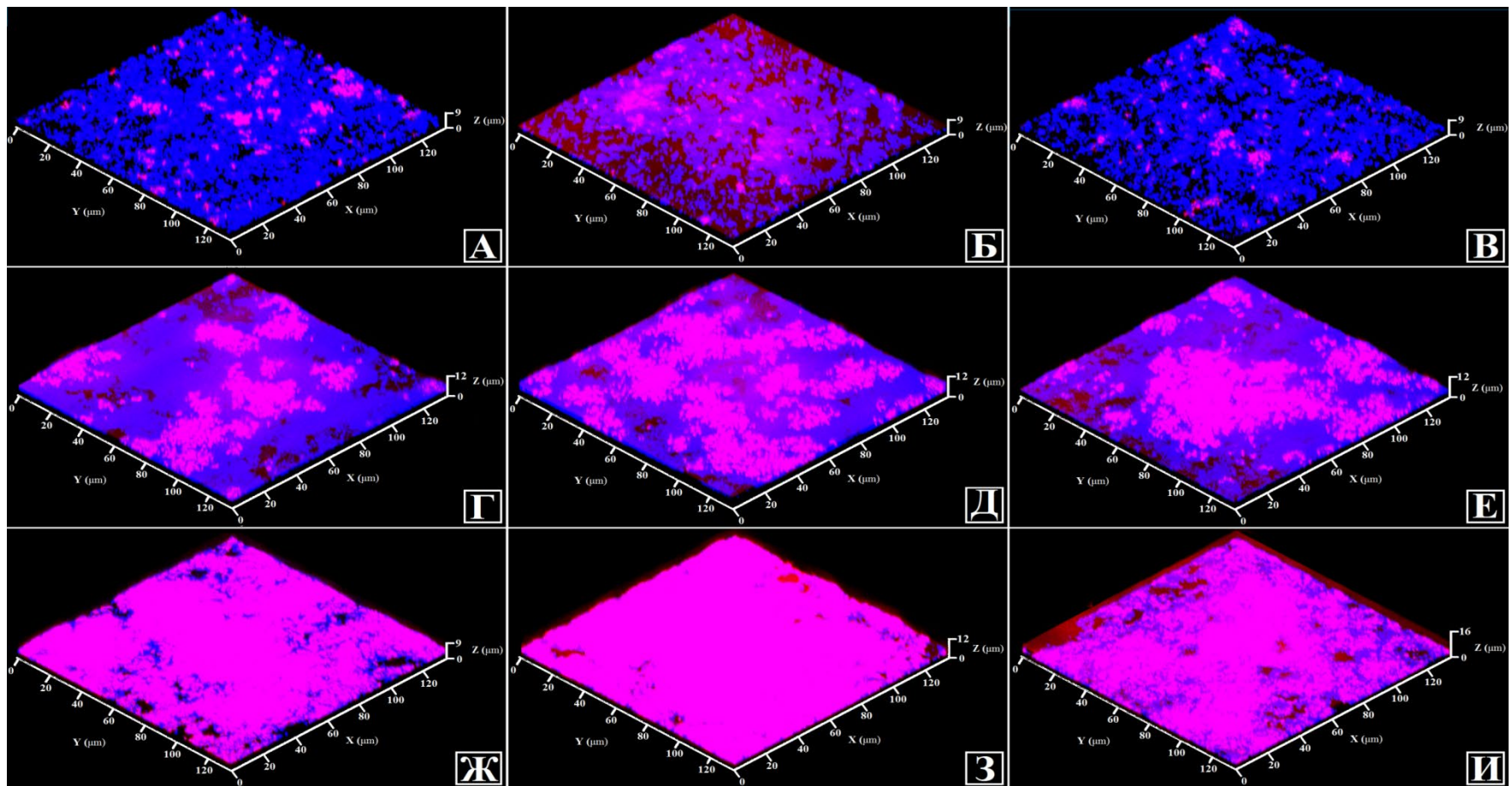


Рис. 15П. КJСМ бинарных биопленок *C. acnes* RT5 и *S. aureus* MFP03, маркированных зондом для *C. acnes* и окрашенных DAPI. А – одновременно формируемые биопленки, контроль; Б – одновременно формируемые биопленки, ANP 1×10^{-8} М; В – одновременно формируемые биопленки, CNP 1×10^{-7} М; Г – бинарные биопленки на основе предформированных биопленок *S. aureus* MFP03, контроль; Д – бинарные биопленки на основе предформированных биопленок *S. aureus* MFP03, ANP 1×10^{-8} М; Е – бинарные биопленки на основе предформированных биопленок *S. aureus* MFP03, CNP 1×10^{-7} М; Ж – бинарные биопленки на основе предформированных биопленок *C. acnes* RT5, контроль; З – бинарные биопленки на основе предформированных биопленок *C. acnes* RT5, ANP 1×10^{-8} М; И – бинарные биопленки на основе предформированных биопленок *C. acnes* RT5, CNP 1×10^{-7} М.

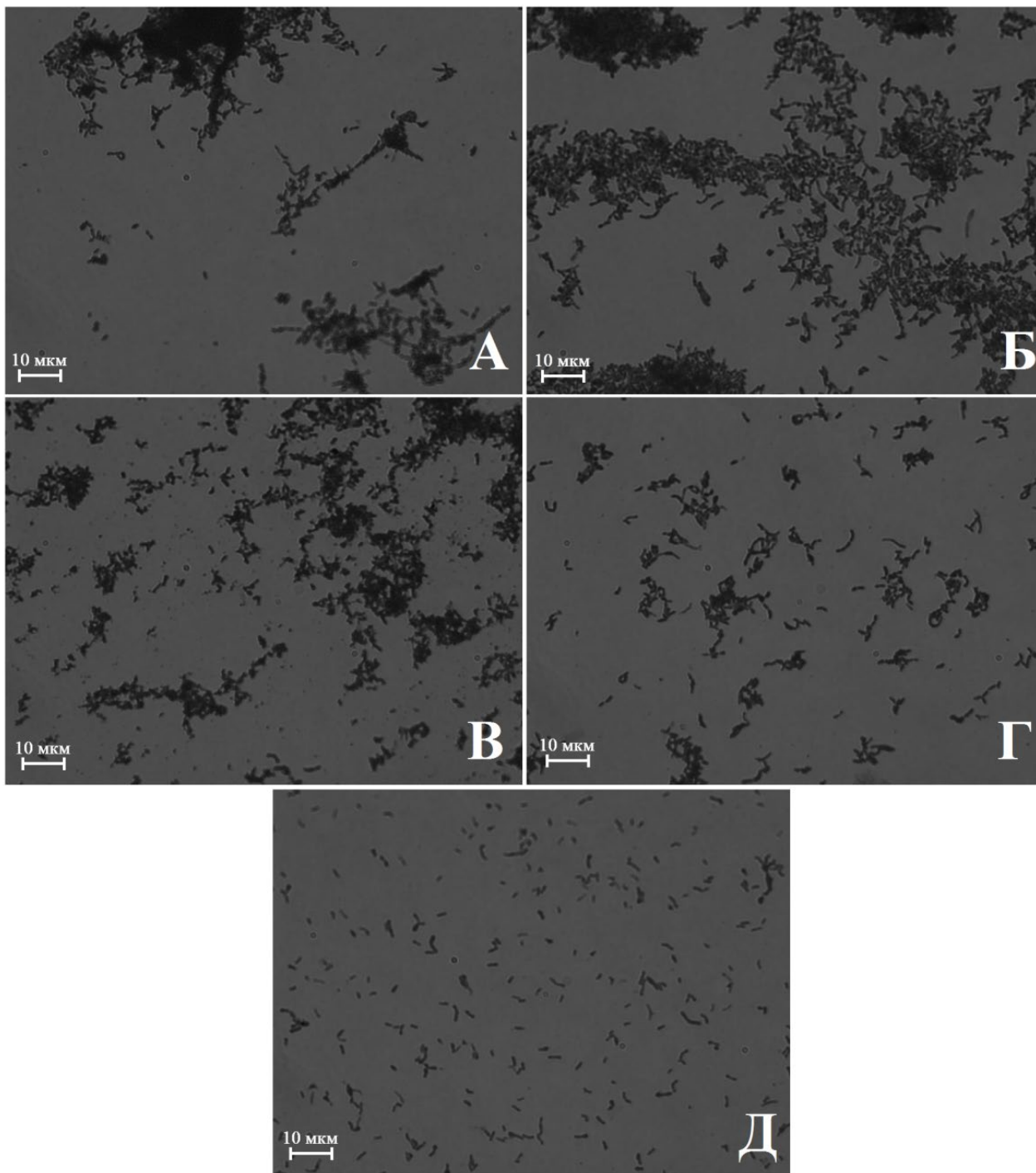


Рис. 16П. Микроскопия образцов суспензий клеток *C. acnes* RT5, обработанных разными методиками разрушения клеток. А - интактные клетки (контроль); Б – 1х литический буфер, 40 мин, комнатная температура; В - лизоцим 0.01 мг/мл, 1х литический буфер, 30 минут при 37°C; Г - лизоцим 1 мг/мл в буфере (0.1 М Трис-НСl и 0.05 М ЭДТА), 30 минут при 37°C, ультразвук; Д – лизоцим 2 мг/мл в буфере (0.1 М Трис-НСl и 0.05 М ЭДТА), 30 минут при 37°C, 5х литический буфер 40 минут при комнатной температуре, ультразвук со стеклянными бусинками. Окрасивание КФ.

Таблица 1П. Белки, идентифицированные в матриксе *C. acnes* RT5 Красным выделены белки, обнаруженные только в нижней фазе матрикса, синим – в верхней.

№ изолята	Описание	Молярная масса (кДа)	Покрытие	# АК
327443705	бактериальная НАД-глутаматдегидрогеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	172,238	3,82	1569
327446964	РНК-полимераза, β -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	143,329	10,67	1293
327445677	Оксоглутаратдегидрогеназа (сукцинил-трансферная активность), компонент E1 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	136,695	3,24	1236
327450411	Пируватсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	131,812	12,13	1204
327446963	РНК-полимераза, β -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	131,21	7,17	1185
327445932	Аденозилкобаламин-зависимая рибонуклеотиддифосфатредуктаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	103,873	8,84	950
327443701	Белковая транслоказа, субъединица SecA [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	101,327	2,9	898
327445767	Аланин-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	95,7476	5,49	892
327445892	Аконитатгидратаза 1 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	96,3455	3,49	888
327447637	Пируватфосфатдикиназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	96,4148	25,93	883
327444294	Мембранная аланиламинопептидаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	96,6945	4,25	870
327444263	Антикодон-связывающий белковый домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	97,2608	1,84	870
327449698	АТФаза (AAA) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	93,2526	2,73	844
327444364	Фенилаланин-тРНА-лигаза, β -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	89,1879	2,98	839

327446071	Лейцин-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	92,3907	5,45	826
327442870	НАДН-дегидрогеназа (хиноновая), G-субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	86,5539	3,33	812
327446134	S1 РНК-связывающий белковый домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	88,6422	3,11	803
327444160	Гуанозинпентафосфатсинтетаза I/полирибонуклеотид нуклеотидилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	78,8514	13,64	733
327445140	метилмалонил-Коа-мутаза, большая субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	80,1163	22,22	729
327446014	Флавопротеиновая субъединица сукцинат дегидрогеназы или фумаратредуктазы [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	78,0746	5,35	710
327444579	Трансляционный G-фактор элонгации [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	76,5564	9,47	697
327445877	Треонин-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	77,2639	6,82	689
327444113	Флавопротеиновая субъединица сукцинат дегидрогеназы или фумаратредуктазы [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	75,7144	12,59	675
327446943	2-оксокислотоакцепторная оксидоредуктаза, α -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	70,328	7,18	655
327449725	Феррохелатаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	70,614	11,54	650
327445141	Метилмалонил-КоА-мутаза, малая субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	69,0733	32,7	636
327444300	АМФ-связывающий фермент [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	69,5205	5,83	635
327448387	ГТФ-связывающий белок ТурА [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	68,4269	5,48	620
327447627	Шаперон DnaK [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	66,3225	41,49	617
327449464	Изомеризирующая глутаминфруктозо-6-фосфаттрансаминаза (isomerizing) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	66,994	8,13	615

327449171	АМФ-связывающий фермент [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	66,2291	11,53	607
327445770	Аспарат-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	66,4973	18,98	606
327450412	пиридиннуклеотиддисульфид оксидоредуктаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	66,4245	12,23	605
327444157	тиаминпирофосфатаза, N-концевой TPP-связывающий домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	64,089	13,9	597
327444184	Фактор инициации трансляции IF-2 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	62,9378	6	583
327447714	Аргинин-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	63,9594	31,1	582
327444193	Пролин-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	63,6595	32,36	581
327446077	Малатдегидрогеназа, НАД-связывающий домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	61,7616	26,23	568
327446586	АВС-транспортер, АТФ-связывающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	61,9042	5,49	565
327443867	ЦТФ-синтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	60,6502	8,01	562
327444155	Гипотетический белок HMPREF9571_02286 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	60,8078	3,95	557
327449770	фосфоенолпируватфосфотрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	57,6929	6,46	557
327449865	Никотиннуклеотид-диметилбензимидазол-фосфорибозилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	58,6391	5,58	556
327445697	АТФ-синтаза F1, α -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	58,872	24,22	545
327449885	Шаперонин GroL [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	56,8047	44,3	544
327445845	Фосфоглюкомутаза, α -D-глюкофосфатспецифичная [<i>Cutibacterium acnes</i>	58,451	7,55	543

	HL043PA2]			
327449490	Шаперонин GroL [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	56,3943	62,52	531
327444272	Триггерный фактор [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	57,6801	16,42	530
327444120	SPR-белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	57,0852	10,8	528
327448391	Метилмалонил-КоА-карбоксилтрансфераза, 12S-субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	56,4265	33,97	524
327447533	Домен ГМФ-синтазы, глутамин-гидролизующей [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	55,5965	10,64	517
327449145	фосфорибозиламино-имидазрокарбоксамид- формилтрансфераза/ИМР-циклогидролаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	54,9575	12,98	516
327446782	глицеролкиназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	56,8473	13,2	515
327445108	НАДФ-трансгидролаза (АВ-специфичная), α - субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	54,0842	3,88	515
327450419	[Fe-S]-кластер-связывающий белковый домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	56,9632	5,68	511
327445925	Сигма фактор RpoD РНК-полимеразы [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	55,6427	3,72	511
327445032	Каталитический домен цитозольной аминопептидазы [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	52,0522	25,98	508
327446016	Глицин-тРНК-лигаза <i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	57,1606	11,66	506
327447643	Сукцинил-СоА-трансфераза [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	55,0555	15,28	504
327447528	Инозин-5'-монофосфатдегидрогеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	53,6595	24,01	504
327445824	Аспартил/глутамил-тРНК-амидотрансфераза, А- субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	53,0335	8,38	501
327447686	Целлюлаза (семейство 5 гликозилгидролаз)	54,0388	5,6	500

	[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]			
327446207	УДФ-N-ацетилмурамоил-L-аланил-D-глутамат-- 2,6-диаминопимелатлигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	52,2162	5,21	499
327445083	Аминопептидаза, Р-домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	55,9833	14,46	498
327446180	Предположительно рибосомный белок S1 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	55,1189	25,1	498
327448392	Консервативный домен карбоксилазы protein [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	54,6555	28,37	497
327445823	Аспартил/глутамил-тРНК-амидотрансфераза, В- субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	54,2511	9,46	497
327450434	Лизин-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	55,2002	4,66	494
327445089	Целлюлаза (семейство 5 гликозилгидролаз) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	53,0902	5,07	493
327449790	Глициновая гидроксиметилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	52,9026	14,66	491
327445699	АТФ-синтаза F1, β-субъединица [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	53,4429	40,49	489
327445715	Возможная УДФ-N-ацетилглюкозамин 1- карбоксивинилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	53,7019	11,29	487
327446637	Сукцинатсемиальдегид-дегидрогеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	51,8836	6,39	485
327446613	Каталаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	54,3092	4,97	483
327444245	[Fe-S]-кластерный структурный белок SufB [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	53,4615	14,73	482
327448376	Аденилосукцинатлиаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	52,1836	7,76	477
327445802	Гликозилгидролаза, семейство 1 [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	55,121	3,57	476
327451109	Аргининсукцинатсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	51,8299	14,14	474

327445058	Глутаминсинтетаза, тип I [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	53,2083	17,76	473
327449394	Глутамат-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	53,6473	9,11	472
327446201	УДФ-N-ацетилмурамат-L-аланинлигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	49,4491	15,71	471
327446797	Фумаратгидратаза, класс II [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	50,7034	12,18	468
327443916	Аргининсукцинатлиаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	50,4988	10,9	468
327446003	Возможная α,α -трегалозофосфатсинтаза (УДФ-формирующая) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	52,8332	11,78	467
327445713	Дигидролипоилдегидрогеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	49,6976	16,27	467
327449929	УТФ-глюкозо-1-фосфат уридилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	51,1487	13,55	465
327446545	Пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	49,6044	7,39	460
327449174	Пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	48,0198	4,58	459
327445033	2-оксоглутаратдегидрогеназа, E-компонент, дигидролипоамид-сукцинилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,5648	29,19	459
327445885	Возможная триптофан-2,3-диоксигеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	50,7493	3,71	458
327446190	Возможная киназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	49,7848	33,62	458
327445732	ГТФаза Der биогенеза рибосом [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	49,7877	5,26	456
327445776	Гистидин-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	50,2328	9,03	454
327443723	Возможная гидролаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	49,9688	4,42	453
327448394	PAS-домен S-бок белка [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	49,1598	14,16	452

	HL043PA2]			
327449180	TQXA-доменный белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,897	5,97	452
327446616	Возможная аспаратаммонийлиаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	49,1785	21,51	451
327449458	Фосфоглюкозаминмутаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,5134	18,22	450
327450255	Флавиносодержащая аминоксидаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,5902	8,02	449
327443351	Димеризационный пептидазный домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,1711	14,32	447
327449220	Никотинатфосфорибозил-трансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,3962	13,9	446
327449724	Глутамил-тРНК-глутаматредуктазный домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,105	17,04	446
327445849	Гипотетический белок HMPREF9571_01585 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	48,4552	29,66	445
327444207	Glu/Leu/Phe/Va-дегидрогеназа, димеризационный домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	48,1119	18,65	445
327445963	Амидогидролаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,6689	6,29	445
327442869	НАД-оксидоредуктаза (хиноновая), F- субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	48,5162	11,71	444
327446834	Возможный представитель семейства YcaO- подобных белков [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	48,3883	12,44	442
327445680	Гомосериндегидрогеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	46,6288	14,29	441
327444166	Глицилбетаин/L-пролин-транспортный белок, АТФ-связывающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	48,225	13,21	439
327449142	3,4-дигидрокси-2-бутанон-4-фосфат синтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	46,6248	16,67	438

327449718	Глутамат-1-семиальдегид-2,1-аминомутаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	45,4128	16,51	436
327449935	N-концевая часть белка МоеА (домены I и II) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	45,5819	6,9	435
327442867	НАДН-дегидрогеназа,D-субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,9817	8,31	433
327445779	Гипотетический белок HMPREF9571_01515 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	49,0619	20,37	432
327448378	Аденилсукцинатсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,33	20,83	432
327446554	Гликонуклеотид-дегидрогеназа [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	46,8528	15,05	432
327444291	Гипотетический белок HMPREF9571_02424 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	47,0956	5,13	429
327445165	Аминопептидаза I (цинковая металлопротеаза (M18)) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	45,9351	5,14	428
327449197	Фосфорибозиаминоимдазол-карбоксилаза, АТФазная субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	45,8699	6,34	426
327449991	осфопируватгидратаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	45,514	46,24	426
327449117	Серин-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	46,5027	9,43	424
327444244	[Fe-S]-кластерный структурный белок SufD [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	45,8413	17,22	424
327447713	Гипотетический белок HMPREF9571_00996 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	43,2017	46,23	424
327449848	Сирогидрохорин кобальтохелатаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	45,4854	4,74	422
327448438	Фосфорибозиламиноимдазол- сукцинокарбоксамидсинтаза [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	46,4004	15,24	420
327446199	cell division protein FtsZ [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	42,8086	14,87	417

327446603	Периплазмальный связывающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	45,0928	7,45	416
327446722	ДНК-полимераза III, β -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	44,0732	16,18	414
327444241	Цистеиндесульфураза, подсемейство SufS [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	44,4723	8,23	413
327445752	Фосфопантотеноилцистеин- декарбоксилаза/фосфопантотенат- цистеинлигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	42,7904	4,39	410
327445093	Глюкозо-1-фосфат-аденилилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	44,7392	5,64	408
327444204	1-деокси-D-ксилоулозо-5-фосфат- редуктоизомераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	42,3727	10,07	407
327445166	Возможный шаперон сборки жгутиков FliS [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	44,2509	8,62	406
327446041	Гипотетический белок HMPREF9571_01783 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	43,1674	23,95	405
327445862	Фосфофруктокиназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	43,4902	32,43	404
327446143	Фосфоглицераткиназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	42,1912	47,01	402
327449390	Фактор элонгации трансляции Tu [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	44,1124	37,78	397
327444122	SRP-докинг-белок FtsY [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	41,2367	12,37	396
327445985	АТФаза (AAA) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	42,687	13,16	395
327449826	Глицин-С-ацетилтрансфераза [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	42,8816	14,72	394
327446048	Возможный шаперон DnaJ [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	41,8327	12,76	392
327449137	Сукцинат-КоА-лигаза, β -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	41,3311	37,85	391
327447636	ФНА-домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	41,1582	8,95	391

327451178	Белок семейства TIGR00730 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	42,206	4,11	389
327443362	Белок семейства NlpC/P60 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	40,3889	24,48	388
327444119	Амидогидролаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	41,9412	8,27	387
327445088	Гипотетический HMPREF9571_02074 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	40,7534	8,55	386
327443707	Триптофан-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	41,4214	6,77	384
327449759	Фосфат-транспортный ABC белок, фосфат-связывающий белок PstS [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,5228	31,33	383
327449121	Ацил-КоА-дегидрогеназа, С-концевой домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	41,2717	5,24	382
327448424	Шаперон DnaJ [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	40,5873	8,16	380
327445154	Амидинотрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	41,6477	8,73	378
327445101	Амидинотрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	43,329	28,99	376
327446955	УДФ-N-ацетиленопирувоил-глюкозамин-редуктаза, домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,863	5,59	376
327449922	Возможная N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,1119	10,64	376
327445144	Гликонуклеотид-дегидрогеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	41,4731	6,12	376
327446202	Возможная ундекапrenoилдифосфо-мурамоилпентапептид-β-N-ацетилглюкозамин-трансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	38,2132	6,72	372
327443908	Фактор выхода пептидной цепи 2 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	41,4429	17,25	371
327446217	Аминометилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,546	4,85	371

327445351	Гипотетический белок HMPREF9571_01989 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,0608	39,08	371
327446565	Белок семейства DegT/DnrJ/EryC1/StrS-аминотрансфераз [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,2338	21,35	370
327444578	Аланиндегидрогеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	38,1094	14,05	370
327444365	Фенилаланин-тРНК-лигаза, α -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	40,1231	5,96	369
327444248	АВС-транспортный белок SBP [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,7604	5,98	368
327447529	Белок семейства IMP-дегидрогеназ [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,3409	40,87	367
327445105	Сукцинилдиаминопимелат-трансаминаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,0519	4,9	367
327449727	Гипотетический HMPREF9571_00293 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	40,2009	10,11	366
327449816	АВС-транспортный АТФ-связывающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,6844	9,84	366
327447700	Оксидоредуктаза, FAD/FMN-связывающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,0556	15,85	366
327443902	D-аланин-D-аланинлигаза, N-концевой домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,2359	5,21	365
327449152	Малатдегидрогеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	38,7348	33,52	364
327446729	Белок семейства FemAB [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	40,7178	9,64	363
327443892	Трансаминаза аминокислот с разветвленной цепью [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	39,8763	31,96	363
327446194	DivIVA-домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	40,1145	38,5	361
327446942	Тиаминпирофосфатаза, C-концевой TPP-связывающий домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	38,4973	9,97	361
327445681	Треонинсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	37,4223	6,15	358

	HL043PA2]			
327446550	УДФ-N-ацетилглюкозамин-2-эпимераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	38,4964	7,28	357
327443873	пептидил-пролил-цис-трансизомераза, FKBP-тип [Cutibacterium acnes HL043PA2]	36,8285	10,64	357
327445771	Гипотетический белок HMPREF9571_01507 [Cutibacterium acnes HL043PA2]	40,1423	48,31	356
327446649	УДФ-глюкозо-4-эпимераза [Cutibacterium acnes HL043PA2]	38,5445	11,33	353
327447668	E1-компонент пируватдегидрогеназы E1 component, α -субъединица [Cutibacterium acnes HL043PA2]	38,2386	6,27	351
327445153	Орнитинкарбамоилтрансфераза [Cutibacterium acnes HL043PA2]	38,5804	23,14	350
327446776	Тиоредоксиндисульфид редуктаза [Cutibacterium acnes HL043PA2]	37,2393	10,57	350
327445138	АТФаза LAO/AO транспортной системы [Cutibacterium acnes HL043PA2]	37,2082	19,83	348
327445947	Белок RecA [Cutibacterium acnes HL043PA2]	37,1302	36,21	348
327448421	GroES-подобный белок [Cutibacterium acnes HL043PA2]	36,9161	8,07	347
327449734	Аспартат-семиальдегиддегидрогеназа [Cutibacterium acnes HL043PA2]	35,9806	22,77	347
327449480	Возможная гликопротеаза GCP [Cutibacterium acnes HL043PA2]	35,9716	16,43	347
327446664	АВС-транспортёр, АТФ-связывающий белок [Cutibacterium acnes HL043PA2]	36,8586	13,37	344
327446832	Возможный стрептолизин-ассоциированный белок SagB [Cutibacterium acnes HL043PA2]	36,8756	20,7	343
327443887	Кетолокислотная редуктоизомераза [Cutibacterium acnes HL043PA2]	37,3436	6,43	342
327445684	Возможный фактор терминации транскрипции Rho [Cutibacterium acnes HL043PA2]	38,3643	14,91	342
327446730	Домен аланилрацемазы [Cutibacterium acnes	37,1985	5,56	342

	HL043PA2]			
327448397	Фруктозобисфосфатальдолаза, класс II [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	36,8194	27,27	341
327444163	Белок биосинтеза рибофлавина RibF [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	36,6851	7,65	340
327446049	Термоиндуцируемый репрессор-транскрипции HrcA [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	36,3582	9,14	339
327449434	РНК-полимераза, α -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	36,8267	36,39	338
327449834	Оксидоредуктаза семейства цинк-связывающих дегидрогеназ [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	36,165	9,17	338
327450261	Гипотетический белок HMPREF9571_00242 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	36,2868	5,04	337
327446033	Пролиламинопептидаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	37,7714	17,01	335
327449699	Гипотетический белок HMPREF9571_00265 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	37,4598	7,16	335
327446144	Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, тип I [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	35,9276	73,13	335
327451095	Гипотетический белок HMPREF9571_00034, partial [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	34,3863	34,63	335
327447667	Транскетолаза, пиридин-связывающий домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	36,3015	21,26	334
327443377	Дигидроксиацетонкиназа, DhaK- субъединица[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	34,6556	10,21	333
327445977	β -кетоацил-ацил-протеин синтаза III [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	35,2539	8,13	332
327449896	AP-эндонуклеаза, семейство 2 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	36,5881	14,46	332
327444359	Тирозин-тРНК-лигаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	36,7827	5,44	331
327446564	Оксидоредуктаза, НАД-связывающий домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	35,5402	26,67	330
327446833	Гипотетический белок HMPREF9571_01087	35,7231	10,06	328

	[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]			
327450410	Возможная дигидроороратдегидрогеназа 2 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	34,6635	32,42	327
327442879	Полипиренилсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	34,6627	8,95	324
327444188	Фактор терминации транскрипции NusA [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	35,7166	4,64	323
327448382	Дигидродипиколинат синтетаза [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	34,4606	6,81	323
327445148	Оксидоредуктаза семейства альдо-кеторедуктаз [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	34,8244	17,08	322
327446078	L-лактатдегидрогеназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	33,9924	6,83	322
327443371	Лактатмалатдегидрогеназа, НАД-связывающий домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	33,6428	15,89	321
327446213	АТФаза (AAA) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	34,395	9,12	318
327445829	Витамин-B12-независимая метионинсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	33,5973	5,71	315
327446780	Возможный сахар-связывающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	33,5603	6,98	315
327448409	Возможная фруктозобисфосфатальдолаза класса I [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	34,724	37,26	314
327445964	Аспаргат карбамоилтрансфераза [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	34,7149	28,66	314
327445698	АТФ-синтаза F1, γ -субъединица [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	34,5417	23,89	314
327445843	Тиоредоксин [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	33,1149	5,43	313
327449719	Порфобилиногенсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	33,4195	23,47	311
327446950	Еноил-КоА-гидратаза/изомераза [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	33,1245	7,72	311
327449976	Рибозофосфат-дифосфокиназа [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	33,9934	9,35	310
327449994	Rpx/GppA-фосфатаза [<i>Cutibacterium acnes</i>	32,7367	6,45	310

	HL043PA2]			
327445807	N-ацетилмурамат-6-фосфатэстераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	31,2779	6,58	304
327446958	Фактор терминации/антитерминации транскрипции NusG [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	33,4752	9,9	303
327445040	Домен сигнальной последовательности Tat-пути [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	32,5854	8,91	303
327449970	Гидролаза TatD семейства [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	32,3613	8,94	302
327445739	Гипотетический белок HMPREF9571_01475 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	33,2098	10,96	301
327446059	Нафтоатсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	33,1334	8,31	301
327449401	50S рибосомный белок L4 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	32,2785	43,52	301
327445152	Карбаматсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	31,9773	8,31	301
327449477	Гидролаза, P-loop семейства [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,7598	9,09	297
327449138	Сукцинат-КоА-лигаза, α -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,5618	48,15	297
327446684	Возможная гистидинолфосфаттрансаминаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	32,0123	13,22	295
327448374	Возможная алкилгидропероксидредуктаза, F субъединица (частично) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	31,1971	6,78	295
327445091	Дигидродипиколинатсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,6707	7,17	293
327451296	Домен сигнальной последовательности Tat-пути [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,5829	8,53	293
327449890	Белок катаболизма миоинозитола IolB [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	31,7904	22,76	290
327445976	Гипотетический белок HMPREF9571_01716	30,0844	30,34	290

	[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]			
327445184	Оксидоредуктаза семейства альдо-кеторедуктаз [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	31,525	11,85	287
327449149	Тетрагидрофолатдегидрогеназа/циклогидролаза, НАДФ-связывающий домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,2778	39,37	287
327443795	Гипотетический белок HMPREF9571_02536 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,3937	30,18	285
327444372	АТФ-фосфорибозилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,5918	15,14	284
327445930	Универсальный стрессовый белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,2281	15,14	284
327444215	Рибосомный белок S2 [<i>Cutibacterium acnes HL043PA2</i>]	31,5164	32,51	283
327449153	Возможная формилтетрагидрофолат деформилаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	31,1939	10,25	283
327445745	Гипотетический белок HMPREF9571_01481 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,8242	6,05	281
327444299	Ацил-КоА-тиоэфиргидролаза семейства YbgC/YbaW [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,8817	7,47	281
327449428	метионинамидопептидаза, тип I [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,959	7,53	279
327445997	Пиридоксаль-5'-фосфатсинтаза, синтазная субъединица Pdx1 [<i>Cutibacterium acnes HL043PA2</i>]	29,1149	68,46	279
327449403	Рибосомный белок L2 [<i>Cutibacterium acnes HL043PA2</i>]	30,2282	17,63	278
327445737	Протеасома, β -субъединица [<i>Cutibacterium acnes HL043PA2</i>]	29,5598	8,63	278
327446080	Возможная гидроксипропилгликозилкиназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,3904	12,64	277
327442866	НАДН-дегидрогеназа, С-субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,569	11,68	274
327445939	Диаминопимелатэпимераза [<i>Cutibacterium acnes</i>]	29,7795	8,79	273

	HL043PA2]			
327447715	Оксидоредуктаза семейства альдокеторедуктаз [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,721	12,09	273
327445719	Гликозилтрансфераза семейства 2 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	30,1724	10,29	272
327443369	Возможная НАD-гидролаза семейства TIGR01457 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,732	12,87	272
327449116	Гипотетический белок HMPREF9571_00834 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,7289	20,59	272
327451135	Гипотетический белок HMPREF9571_00078 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,1008	15,13	271
327444158	Гипотетический белок HMPREF9571_02289 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,2495	8,86	271
327444214	Фактор элонгации трансляции Ts [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,4705	31,85	270
327449173	Возможная фосфорилаза пуриновых нуклеотидов [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,6565	30	270
327450249	Белок DoxX [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,4094	14,81	270
327449406	Рибосомный белок S3 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,6556	34,57	269
327449069	Аминотрансфераза класса IV [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,8386	11,52	269
327446535	CobQ/CobB/MinD/ParA-нуклеотидсвязывающий домен (частично) [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,8867	7,84	268
327445028	Белок семейства PspA/IM30 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	29,5078	46,44	267
327449184	Возможная фосфометилпиримидинкиназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,9133	23,22	267
327446560	Оксидоредуктаза семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,5475	38,35	266
327445789	ДНК-связывающий регуляторный белок семейства YebC/PmpR [<i>Cutibacterium acnes</i>	28,7785	7,58	264

	HL043PA2]			
327449745	Оксидоредуктаза семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,1674	16,67	264
327445696	АТФ-синтаза F1, δ-субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,4299	26,62	263
327442868	НАДН-дегидрогеназа, E-субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,4199	19,92	261
327444226	АВС-транспортер, АТФ-связывающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,0096	17,24	261
327446142	Триозофосфатиомераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,4409	22,01	259
327449756	Фосфатный АВС-транспортер, АТФ-связывающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,3666	8,14	258
327449863	Уропорфириноген-III-С-метилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	26,7818	31,78	258
327444242	[Fe-S]-кластер-связывающая АТФаза SufC [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,9633	43,97	257
327444112	Сукцинатдегидрогеназа/фумаратредуктаза, [Fe-S]-субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,5455	14,4	257
327444228	Возможная еноил-ацилпротеинредуктаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,214	13,62	257
327445081	Возможный домен цинковых пальцев [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,6266	9,38	256
327449702	Белок семейства LamB/YcsF [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	26,5104	15,63	256
327449227	tРНК-нуклеотидилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,1039	14,17	254
327449867	Гипотетический белок HMPREF9571_00433 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	28,3866	10,24	254
327449784	Фосфоглицератмутаза семейства 1 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,9732	34,54	249
327446150	Белок семейства фосфоглицератмутаз	26,9457	7,66	248

	[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]			
327444159	Дигидродипиколилат редуктаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	25,928	13,82	246
327443872	Псевдоуридилатсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,3936	16,33	245
327449769	Оксидоредуктаза семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	25,701	14,69	245
327445900	Гипотетический белок HMPREF9571_01640 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	26,91	46,72	244
327447632	Акцепторный домен для регуляторов стрессового ответа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	27,3162	13,58	243
327450482	Домен связывания циклических нуклеотидов [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	26,2065	11,93	243
327449720	Уропорфириноген-III-синтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	25,1626	10,37	241
327449923	ДНК-связывающий домен железозависимого репрессорного белка [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	26,2862	10	240
327445326	FCD-домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	26,0642	20,08	239
327443896	С-концевой домен транскрипционного регулятора семейства IclR [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,9494	14,64	239
327444201	Белок семейства TENA/THI-4 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	26,6043	10,46	239
327444213	УМФ-киназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	25,6977	36,13	238
327445958	Оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,3475	16,53	236
327446551	Гликозилтрансфераза семейства 1 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	25,1218	11,54	234
327445671	Сигма-фактор 70 РНК-полимеразы [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	26,3122	11,11	234
327446960	Рибосомный белок L1 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,7229	43,1	232

	HL043PA2]			
327445157	Белок семейства DJ-1/PfpI [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,4872	10,92	229
327448381	Возможная N-ацетилманнозамин-6-фосфат эписмераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,0112	31,44	229
327449423	Белок семейства глицерофосфидиэстерфосфодиэстераз [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	25,1787	13,16	228
327443909	АТФ-связывающий белок FtsE, участвующий в делении клеток [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	25,5515	8,77	228
327446163	Периплазматический связывающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,6392	12,78	227
327445736	Протеасома, α -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,2974	7,96	226
327450420	Гипотетический белок HMPREF9571_00142 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,9674	7,08	226
327449779	Акцепторный домен для регуляторов стрессового ответа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	25,1562	12,83	226
327445897	N-концевой домен белка TrkA [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,734	22,22	225
327449400	50S рибосомный белок L3 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,4984	28,25	223
327446018	Акцепторный домен для регуляторов стрессового ответа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,9958	8,07	223
327445744	Рибулозофосфат- 3-эписмераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,1126	16,14	223
327449781	Регуляторный белок фосфатной транспортной системы PhoU [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,4103	18,47	222
327448425	Ко-шаперон GrpE [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,3015	12,22	221
327445702	АТФ:кобаламин(II)аденозилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,0792	15,84	221

327445908	Гипотетический белок HMPREF9571_01648 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,7866	12,27	220
327445296	Гипотетический белок HMPREF9571_02000 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,1003	26,15	218
327443376	Дигидроксиацетонкиназа, L- субъединица[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	22,1231	32,57	218
327445092	О-метилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,3181	11,06	217
327445957	Ороратфосфорибозилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,0188	13,89	216
327446957	Пептидтранслоказа, SecE- субъединица[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,5371	16,2	216
327446187	Акцепторный домен для регуляторов стрессового ответа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,8211	37,67	215
327449070	Транскрипционный регулятор семейства TetR [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,3531	26,05	215
327445339	Гипотетический белок HMPREF9571_01977 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,2977	8,37	215
327449417	Рибосомный белок S5 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	22,5519	30,7	215
327444369	Фактор инициации трансляции IF-3 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	24,0418	27,23	213
327443802	Белок контактной поверхности субъединиц рибосом [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,7463	37,74	212
327445822	Белок семейства TIGR03085 [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	23,1272	13,74	211
327449412	Рибосомный белок L5 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,8435	35,24	210
327445670	Белок семейства DoxX [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	21,9569	29,52	210
327451126	Урацилосфорибозилтрансфераза [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	22,6387	17,79	208
327451297	Гипотетический белок HMPREF9571_00027	21,9161	10,14	207

	[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]			
327449144	Фосфорибозилглицинамид-формилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	22,2486	11,11	207
327449980	Рибосомный белок L25, Стс-форма [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	22,3085	7,8	205
327446566	Гексапептидный повтор бактериальной трансферазы [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	21,7039	31,71	205
327449442	Супероксиддисмутаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,3234	8,29	205
327446961	Рибосомный белок L10 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	20,9161	50,49	204
327449141	Рибофлавинсинтаза, α -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	21,5371	15,69	204
327446728	R3H-домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	22,2115	8,87	203
327444311	Олигорибонуклеаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	22,5422	23,27	202
327449433	Рибосомный белок S4 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	23,1714	35,82	201
327442872	NADH-хинооксидоредуктаза, цепь I [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	22,3223	17,17	198
327445981	Пиридоксальфосфатаза семейства YggS [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	21,785	11,11	198
327445869	FHA-домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	20,4459	22,4	192
327450463	Регулятор транскрипции семейства PadR [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	21,441	13,61	191
327445965	Регулятор пиримидинового оперона/урацилфосфорибозилтрансфераза PурR [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	20,8941	46,6	191
327445757	Фактор элонгации трансляции P [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	21,1367	8,47	189
327449427	Аденилаткиназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	20,8857	35,45	189
327448439	Пероксиредоксин [<i>Cutibacterium acnes</i>	20,8042	35,29	187

	HL043PA2]			
327444212	Фактор рециклинга рибосом [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	20,9168	38,04	184
327450262	Дифосфатаза неорганических фосфатов [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	20,7478	10,33	184
327445695	АТФ-синтаза, субъединицы F0, B [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	20,1494	11,96	184
327449105	SSB-белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,3752	16,85	184
327449415	Рибосомны белок L6 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,8247	31,67	180
327449435	Рибосомный белок L17 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,1911	20,11	179
327444116	Белок процессинга 16S рРНК RimM [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,428	13,97	179
327451159	Внутриклеточная протеаза семейства PfpI [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,0128	16,76	179
327444189	Гипотетический белок HMPREF9571_02320 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,5229	9,55	178
327450229	Гипотетический белок HMPREF9571_00209 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	18,1967	19,1	178
327445782	Аденинфосфорибозилтрансфераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	18,3547	20,9	177
327447720	Ферритин-подобный белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,0296	18,18	176
327450278	2-амино-4-гидрокси-6-гидроксиметилдигидроптеридин дифосфокиназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,0767	16,57	175
327448385	Гипотетический белок HMPREF9571_00868 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,1431	13,14	175
327446588	Гипотетический белок HMPREF9571_01154 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,9241	20,69	174
327446831	Гипотетический белок HMPREF9571_01086 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,7591	9,77	174
327449457	Рибосомный белок S9 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	18,5878	20,81	173

	HL043PA2]			
327446196	Гипотетический белок HMPREF9571_01940 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,4377	13,95	172
327449110	Ферритин-подобный белок <i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	19,0304	36,05	172
327449808	Гипотетический белок HMPREF9571_00374 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	18,5022	18,02	172
327445149	АСТ-домен[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	18,3715	13,95	172
327449988	Гипотетический белок HMPREF9571_00558 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	17,9651	11,7	171
327445350	пептидил-пролил-цис-трансизомераза циклофилинового типа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	18,3522	22,35	170
327445178	Прокариотический фактор элонгации транскрипции, GreA/GreB-домен [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	18,3008	12,5	168
327444240	SUF-системный [Fe-S]-кластер-связывающий белковый домен, семейство NifU [<i>Cutibacterium</i> <i>acnes</i> HL043PA2]	18,2898	22,89	166
327449143	6,7-диметил-8-рибитиллумазинсинтаза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,7725	10,84	166
327445050	PTS-системный ПА компонент подсемейства транспортеров глюкозы [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,8165	15,24	164
327449777	CarD-подобный белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	18,1987	30,43	161
327446193	Цинковый палец C4-типа семейства DksA/TraR [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	17,2182	9,43	159
327451171	Гипотетический белок HMPREF9571_00115, частично [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,6993	14,56	158
327444290	Рибозо-5-фосфатизомераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	17,2045	17,2	157
327448423	Транскрипционный регулятор семейства MerR [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	17,249	10,46	153

327449405	Рибосомный белок L22 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,699	30,07	153
327449100	Гликофосфотрансфераза ЕIIА фосфоенолпируват-зависимой системы [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	15,9764	17,65	153
327445848	Метилмалонил-КоА-эпимераза [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,7934	25,66	152
327445329	Белок семейства Hsp20/ α -кристаллинов [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,6995	23,68	152
327445969	Гипотетический белок HMPREF9571_01709 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,426	19,21	151
327450481	Эндорибонуклеаза L-PSP [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	14,9469	23,84	151
327449107	Рибосомный белок L9 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,108	22,15	149
327444118	Рибосомный белок S16 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	15,9462	52,38	147
327445700	АТФ синтаза F1, ϵ -субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,0202	15,07	146
327449925	Тиоредоксин [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,0921	23,45	145
327446772	OsmC-подобный белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	15,3427	31,03	145
327444580	Рибосомный белок S7 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	16,2586	29,17	144
327444180	Фактор А связывания рибосом [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	15,592	36,36	143
327446959	Рибосомный белок L11 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	15,125	16,78	143
327445159	Пероксиредоксин подсемейства Ohr [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	14,7333	28,17	142
327449945	ТОВЕ-домен [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	15,3212	20,42	142
327446137	Нуклеозидфосфаткиназа [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	15,3429	19,57	138
327446542	Гипотетический белок HMPREF9571_01107	15,2666	18,98	137

	[<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]			
327446043	Белок семейства DoxX [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,7245	19,55	133
327446962	Рибосомный белок L7/L12 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,6932	28,46	130
327446536	SSB-белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	14,1052	17,97	128
327449416	ribosomal protein L18 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,6924	19,69	127
327446705	Транспортный белок семейства RbsD/FucU [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,8192	18,9	127
327449431	30S рибосомный белок S13 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,9878	25,2	123
327444367	Рибосомный белок L20 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,9514	21,14	123
327446218	Белок H системы расщепления глицина [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	12,9532	16,26	123
327449410	Рибосомный белок L14 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,4704	24,59	122
327449411	Рибосомный белок L24 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,4724	18,03	122
327448389	Метилмалонил-СоА карбоксилтрансфераза, 1.3S-субъединица [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	11,6191	21,67	120
327447699	Гипотетический белок HMPREF9571_00982 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,3495	27,73	119
327444351	Рибосомный белок L19 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	13,0711	28,21	117
327445025	[Fe-S]-кластер-собирающий белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	12,4641	13,68	117
327445718	Гипотетический белок HMPREF9571_01453 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	12,7241	18,18	110
327450282	Гипотетический белок HMPREF9571_00263 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	11,7749	20	105
327450413	Гипотетический белок HMPREF9571_00135 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	11,2758	23,81	105

327449399	Рибосомный белок S10 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	11,6723	26,21	103
327451377	Ribbon-helix-helix-белок семейства CopG [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	10,9405	31,07	103
327449402	Рибосомный белок L23 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	11,3232	39,22	102
327445904	Гипотетический белок HMPREF9571_01644 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	11,0151	15,31	98
327449489	Шаперонин GroS [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	10,6216	43,88	98
327449104	Рибосомный белок S6 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	11,2459	19,79	96
327449404	Рибосомный белок S19 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	10,5036	50,54	93
327446843	Гипотетический белок HMPREF9571_01097 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	10,24	20,65	92
327449219	ДНК-связывающий белок HB1 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	9,5822	28,57	91
327449409	30S рибосомный белок S17 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	10,4456	22,22	90
327446132	Рибосомный белок L27 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	9,51694	52,81	89
327446066	Рибосомный белок S20 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	9,69442	14,77	88
327449771	Переносчик фосфора семейства HPr [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	9,00556	26,14	88
327444162	Рибосомный белок S15 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	10,0734	18,39	87
327445978	Переносчик ацильных остатков [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	9,0223	30,86	81
327448390	Гипотетический белок HMPREF9571_00873 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	8,78664	22,5	80
327449106	Рибосомный белок S18 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	8,79208	27,85	79

327449408	Рибосомный белок L29 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	8,87972	45,45	77
327450491	Гипотетический белок HMPREF9571_00120, partial [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	8,48723	46,75	77
327444368	Рибосомный белок L35 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	7,88941	13,89	72
327444383	CsbD-подобный белок [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	7,30578	28,17	71
327445685	Рибосомный белок L31 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	7,71278	43,48	69
327445941	Гипотетический белок HMPREF9571_01681 [<i>Cutibacterium acnes</i> HL043PA2]	7,16049	84,85	66

Таблица 2П. Пики SERS-спектров матрикса и биомассы биопленок *C. acnes* RT5. Зеленым отмечены ячейки, соответствующие пикам, сильно различающимся по интенсивности у матрикса и у биомассы, а желтым – пики, различающиеся незначительно.

Образец		Рамановский сдвиг, см ⁻¹									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Биомасса биопленки	Интактная	390	433	451	510	540	579	608	638	665	689
	После выделения матрикса	392	420	451	510	540	579	608	638	665	689
Выделенный матрикс	Верхняя фаза	386	415	--		538	--	597	620	--	685
	Нижняя фаза	370	--	--	511	538	--	603	620	--	685
Образец		Рамановский сдвиг, см ⁻¹									
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Биомасса биопленки	Интактная	792	820	864	903	923	962	988	1028	1046	1062
	После выделения матрикса	792	820	864	903	923	962	988	1028	1046	1062
Выделенный матрикс	Верхняя фаза	791	816	874	--	935	960	994	1114	1056	1064
	Нижняя фаза	791	816	--	--	935	960	994	1114	1056	1064
Образец		Рамановский сдвиг, см ⁻¹									
		21	22	23	24	25	26	27	28	19	30
Биомасса биопленки	Интактная	1084	1125	1133	1170	1195	1226	1249	1260	1288	1317
	После выделения матрикса	1084	1125	1133	1170	1195	1226	1233	1260	1288	1317
Выделенный матрикс	Верхняя фаза	1082	1112	1146	1170	1203	1237	--	1256	1289	1310
	Нижняя фаза	1082	1112	1146	1170	1203	1226	--	1256	1289	1310
Образец		Рамановский сдвиг, см ⁻¹									
		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40

Биомасса биопленки	Интактная	1337	--	1365	1390	--	1452	1465	1531	1552	1571
	После выделения матрикса	1337	--	1365	--	--	1450	1468	1531	1558	1580
Выделенный матрикс	Верхняя фаза	--	1354		1380	1413	1441	1461	1539	1566	1578
	Нижняя фаза	--	1353		1378	1413	1442	1461	1539	1566	1574
Образец		Рамановский сдвиг, см ⁻¹									
		41	42	43	44	45	12 пиков малой интенсивности				
Биомасса биопленки	Интактная	1594	1620	1673	1695	1730					
	После выделения матрикса	1596	1620	1674	1694	1731					
Выделенный матрикс	Верхняя фаза	1601	--	1680	1704	1729					
	Нижняя фаза	1599	--	1679	1704	1729					