

УДК 579.61:579.262

DOI 10.17021/2019.14.3.8.20

© Х.М. Галимзянов, О.А. Башкина, Э.Г. Досмуханова,
Р.О. Абдрахманова, Ю.З. Демина, А.Д. Даудова,
А.В. Алешкин, Ю.В. Несвижский, В.С. Рыбкин,
С.С. Афанасьев, Л.Г. Сентюрова, М.М. Карнаух,
И.М. Аршба, М.О. Рубальский, Н.И. Стемповская,
И.О. Кужина, Е.О. Рубальский, 2019

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОПЛЕНОК

Галимзянов Халил Мингалиевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-41-43, e-mail: agma@astranet.ru.

Башкина Ольга Александровна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой факультетской педиатрии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: 8-927-570-99-31, e-mail: bashkina1@mail.ru.

Досмуханова Эльмира Галиевна, ассистент кафедры микробиологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-35-99, e-mail: ametist07@mail.ru.

Абдрахманова Радмила Охасовна, ассистент кафедры микробиологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-35-99, e-mail: radmilaazo@mail.ru.

Демина Юлия Заурбековна, ассистент кафедры микробиологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-35-99, e-mail: j_d_79@mail.ru.

Даудова Адиля Джэигангировна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-35-99, e-mail: adaudova@mail.ru.

Алешкин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, руководитель лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: 8-964-646-43-79, e-mail: andreialeshkin@googlemail.com.

Несвижский Юрий Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Россия, 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, тел.: 8-903-557-50-51, e-mail: nesviz@mail.ru.

Рыбкин Владимир Семенович, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: 8-902-350-88-42, e-mail: rvs2009@mail.ru.

Афанасьев Stanisлав Степанович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: (495) 452-18-16, e-mail: afanasievss409.4@bk.ru.

Сентюрова Людмила Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой биологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: 8-927-284-20-47, e-mail: sentlj2012@yandex.ru.

Карнаух Мария Михайловна, аспирант, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, тел.: 8-917-196-16-06, e-mail: mascha.karnaukh@yandex.ru.

Аршба Илона Мурмановна, кандидат биологических наук, и. о. заведующей лабораторией инфекционной патологии, ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии», Россия, 354376, г. Сочи, с. Веселое, ул. Мира, д. 177, тел.: (862) 243-20-28, e-mail: aim26@mail.ru.

Рубальский Максим Олегович, аспирант кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: 8-988-061-88-61, e-mail: m.o.rubalsky@gmail.com.

Стемпковская Наталья Иосифовна, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры микробиологии и вирусологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-35-99, e-mail: astempkovskiy@yandex.ru.

Кужина Ираида Олеговна, руководитель центра поддержки технологий и инноваций, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121, тел.: (8512) 52-35-99, e-mail: innoagma@gmail.com.

Рубальский Евгений Олегович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Россия, 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10; научный сотрудник кафедры кардиоторакальной, трансплантационной и сосудистой хирургии Высшей медицинской школы Ганновера, Германия, 30625, Ганновер, Карл Нойберг Штрассе, тел.: 8-961-798-37-53, e-mail: e.o.rubalsky@gmail.com.

Образование биопленки является одним из ключевых факторов вирулентности микроорганизмов и формирования персистирующих форм, ведущих к хронизации патологических процессов в макроорганизме. Развитие новых технологий в молекулярной биологии, биохимических исследованиях и методах визуализации приводит к лучшему пониманию механизмов биопленкообразования. Вопрос о совершенствовании этих технологий *in vitro* и/или *in vivo* актуален в современных условиях. Отсутствие стандартизированных методов культивирования биопленок является одной из ключевых проблем, с которой сталкиваются исследователи в этой области. Результаты, полученные в одной лаборатории, не всегда могут быть в точности воспроизведены и подтверждены другими независимыми исследователями. Методы культивирования, предназначенные для микроскопических исследований, могут быть неинформативными для других видов анализа, таких, например, как сбор биомассы биопленки для биохимических измерений. В большинстве случаев методы культивирования могут быть адаптированы для изучения различных компонентов и свойств системы, в которых заинтересован исследователь.

Все методы экспериментального воспроизведения биопленок можно разделить на две основные группы – с использованием «закрытых» и «открытых» систем. Основным преимуществом последних является постоянное поступление и обновление питательных веществ, удаление метаболитов и создание, как следствие, внешних условий, максимально схожих с естественными условиями обитания микроорганизмов.

Для визуализации и изучения количественного и качественного состава биопленок используются разнообразные микробиологические, физические, химические и молекулярные методы.

Ключевые слова: биопленки, междисциплинарные исследования, количественная характеристика биопленки, качественная характеристика биопленки.

METHODS OF STUDY OF BIOFILMS

Galimzyanov Khalil M., Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: (8512) 52-41-43, e-mail: agma@astranet.ru.

Bashkina Ol'ga A., Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of Department, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: 8-927-570-99-31, e-mail: bashkina1@mail.ru.

Dosmukhanova El'mira G., Assistant, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: (8512) 52-35-99, e-mail: ametist07@mail.ru.

Abdrakhamanova Radmila O., Assistant, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: (8512) 52-35-99, e-mail: radmilaaazo@mail.ru.

Demina Yulia Z., Assistant, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: (8512) 52-35-99, e-mail: j_d_79@mail.ru.

Daudova Adilya D., Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: (8512) 52-35-99, e-mail: adaudova@mail.ru.

Aleshkin Andrey V., Dr. Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel.: (495) 452-18-16, e-mail: ava@gabri.ru.

Nesvizhsky Yuri V., Dr. Sci. (Med.), Professor, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, building 2, 8 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia, tel.: 8-903-557-50-51, e-mail: nesviz@mail.ru.

Rybkin Vladimir S., Dr. Sci. (Med.), Professor, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: 8-902-350-88-42, e-mail: rvs2009@mail.ru.

Afanas'ev Stanislav S., Dr. Sci. (Med.), Professor, Honored Scientist, Deputy Director, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel.: 8-903-667-20-68, e-mail: afanasievss409.4@bk.ru.

Sentyurova Lyudmila G., Dr. Sci. (Med.), Head of Department, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: 8-927-284-20-47, e-mail: sentlj2012@yandex.ru.

Karnaukh Mariya M., post-graduate student, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russia, tel.: 8-917-196-16-06, e-mail: mascha.karnaukh@yandex.ru.

Arshba Ilona M., Cand. Sci. (Biol.), Head of Department, Leading Researcher, Laboratory of Infectious Pathology, Research Institute of Medical Primatology, 177 Mira St., Sochi, 354376, Russia, tel.: (862) 243-20-28, e-mail: aim26@mail.ru.

Rubalskii Maxim O., post-graduate student, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: 8-988-061-88-61, e-mail: m.o.rubalsky@gmail.com.

Stempkovskaya Natalya I., Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: (8512) 52-35-99, e-mail: astempkovskiy@yandex.ru.

Kuzhina Iraida O., Head of Technology and Innovation Support Center, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya St., Astrakhan, 414000, Russia, tel.: (8512) 52-35-99, e-mail: innoagma@gmail.com.

Rubalskii Evgenii O., Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology G.N. Gabrichevsky, 10 Admiral Makarov St., Moscow, 125212; Research Fellow, Department of Cardiothoracic, Transplantation and Vascular Surgery, Hannover Medical School, 1 Carl-Neuberg-Straße, Hannover, 30625, Germany, tel.: +7-961-798-37-53, e-mail: e.o.rubalsky@gmail.com.

Biofilm formation is a key virulence factor among many microorganisms, it is also important for the formation of persistent forms which result in chronicity of pathological processes within macro organisms. The development of new technologies in molecular biology, biochemical studies and imaging techniques leads to a better understanding of biofilm formation. The question of using these technologies in vitro and/or in vivo is relevant in modern conditions. The lack of standardized methods of biofilm culturing is troublesome for researchers. The results of studies performed in one laboratory might not be reproduced and confirmed by other independent researchers.

Culturing techniques designed for microscopy investigation may be useless for other types of analyses, such as harvesting biofilm biomass for biochemical measurements. In most cases these culturing methods can be adapted to study certain aspects of the system in which the researcher is interested.

All methods of experimental reproduction of biofilms can be divided into two major groups – methods using “closed” and those using “open” systems. The main advantage of the second group of methods consists in receipt and renewal of nutrients, removal of metabolites and, as a result, the creation of external conditions maximally similar to the natural habitats of microorganisms.

A variety of microbiological, physical, chemical and molecular methods are used to visualize and study the quantitative and qualitative composition of biofilms.

Key words: *biofilms, interdisciplinary research, quantitative characteristics of biofilms, qualitative characteristics of biofilms.*

Биопленки представляют собой микробные сообщества, прикрепленные к поверхности и внедренные во внеклеточное полимерное вещество, которое обеспечивает защиту, стабильность и запас питательных веществ для бактерий сообщества [33]. Биопленки, как правило, состоят из множества видов микроорганизмов, которые демонстрируют сложную организацию микробного сообщества и взаимодействия его членов. В биопленках клетки обмениваются небольшими молекулами,

влияющими на состав и структуру биопленки и координирующими взаимодействие микроорганизмов, что способствует их выживанию. Биопленки содержат живые и мертвые бактериальные клетки, внеклеточные полимерные соединения и другие вещества, выделяемые клетками [27]. Структура и пространственная организация биопленки определяются, прежде всего, видами бактерий и их соотношением. Физические структуры и свойства материала матрицы биопленки адаптируются бактериями при изменении состава популяций и внешних условий [33].

Адаптация матрицы биопленок является важным фактором устойчивости микроорганизмов в неблагоприятных условиях, в том числе из-за снижения диффузии антимикробных агентов через биопленку [33, 39]. Кроме того, особенности архитектуры биопленки, в частности близкое взаиморасположение клеток, обеспечивают лучшие условия для обмена генетическим материалом, кодирующим антимикробную устойчивость представителей сообщества.

Биопленка – это сложное трехмерное образование, которое формируется на границе раздела взаимодействующих сред [42, 68]. Формирование биопленок сопровождается 60–80 % микробных инфекций и усложняет диагностику и лечение заболеваний [22, 31].

Для определения характеристик биопленок используют разнообразные количественные и качественные методы.

Методы количественной оценки. Существуют прямые и косвенные методы количественного определения клеток в биопленках. Методы прямого подсчета включают в себя: определение количества жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц (КОЕ)) путем прямого посева биопленочного материала на питательные среды; микроскопический метод подсчета клеток; подсчет клеток с помощью счетчика Коултера; проточную цитометрию; флуоресцентную микроскопию. Косвенные методы измерения основаны на определении сухой биомассы биопленки, общего органического углерода, биолуминесценции аденозинтрифосфата (АТФ), определении общего белка, микробаланса кварцевых кристаллов и др. [3, 36, 65].

Прямые методы количественной оценки. Визуализация и автоматический подсчет клеток являются наиболее распространенными методами количественной оценки биопленки. Кроме того, использование красителей или флуоресцентных маркеров для более точной идентификации представляющих интерес клеток позволяет повысить точность их подсчета и упростить интерпретацию данных [68].

Определение количества жизнеспособных клеток путем посева биопленочного материала на агаровые пластинки и подсчета количества выросших колоний (подсчет КОЕ в 1 мл исследуемого материала) является стандартным методом количественного определения жизнеспособных клеток [2, 21, 48, 52]. Основная концепция этого анализа состоит в том, чтобы разделить клетки на чашке с агаром и выращивать колонии из клеток, таким образом, дифференцируя живые клетки от мертвых и количественно определяя живые.

Методы автоматизированного подсчета клеток в культурах микроорганизмов на жидких средах – метод Коултера и проточная цитометрия.

Метод Коултера включает в себя пропускание заряженных частиц (клеток микроорганизмов) в растворе электролита через отверстие, которое является частью электрической цепи [64]. При этом частицы изменяют сопротивление цепи и регистрируются на основании изменений напряжения. Изменения напряжения коррелируют с размерами клеток. Импульсы напряжения подсчитываются в течение определенного периода времени и соотносятся с количеством клеток. Этот метод не позволяет различать живые и мертвые клетки.

В **проточной цитометрии** используется система гидрофокусировки, которая обеспечивает прохождение клеток в потоке поодиночке. Индикация микроорганизмов основана на рассеивании лазерного луча при прохождении через него клеток. Основными преимуществами проточной цитометрии являются скорость, простота и точность измерений. С помощью этого метода можно одновременно собрать большое количество дополнительной информации о микроорганизмах, включающей в себя размеры клеток, свойства их поверхности, метаболическую активность. Кроме того, такой подход позволяет произвести дифференцировку клеток с использованием дополнительного окрашивания или эндогенных флуоресцентных меток [10, 45].

Методы микроскопии. Световая микроскопия объективизирует анализ клеточных и внеклеточных компонентов образующейся биопленки. После окрашивания выявляется спектр структур, а также их тинкториальные свойства. Возможно выявление степени резистентности к микроокружению или деструкции под влиянием микроокружения [62].

Подсчет клеток и определение 3D-характеристик биопленок могут быть выполнены с использованием нескольких методов микроскопии – от простой световой микроскопии взвешенных биопленок до измерения объема и морфологии прикрепленных биопленок с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (Confocal laser scanning microscopy – CLSM).

Подсчет клеток с помощью микроскопии может быть выполнен на незрелых биопленках *in situ* или после гомогенизации биопленки с помощью световой микроскопии неокрашенных или окрашенных микроорганизмов, а также флуоресцентной микроскопии. После приобретения биопленкой трехмерной структуры требуется ее гомогенизация с последующим подсчетом взвеси микроорганизмов в камере Петрова-Хауссера [69].

Дополнительные преимущества методов световой и флуоресцентной микроскопии обеспечивает использование различных метаболических или избирательно проникающих красителей, позволяющих отличить живые клетки от мертвых [38, 46, 57].

CLSM позволяет получать четкие изображения биопленок с высоким разрешением в трех измерениях [6, 13, 36, 49]. Кроме того, в конфокальной микроскопии можно использовать один или несколько лазеров возбуждения для последовательного или одновременного просмотра нескольких флуоресцентных маркеров, включающихся в биологические соединения, или флуоресцентных белков и генетического материала, экспрессирующихся модифицированными микроорганизмами [16, 33, 34, 35, 68].

L. Vidaković и соавторы, используя автоматизированную конфокальную микроскопию с адаптивной обратной связью в реальном времени между получением изображения, распознаванием признаков и контролем микроскопа, а затем с помощью откалиброванной новой трехмерной методики сегментации изображения получили полное развитие трехмерной биопленки при клеточном разрешении с минимальной фототоксичностью и минимальной ошибкой сегментации. Что позволило реконструировать клеточную линию, измерить локальные скорости роста и идентифицировать все клетки в поле зрения, которые не связаны с исходной клеткой – основателем биопленки [68].

Атомно-силовая микроскопия – один из наиболее важных инструментов для получения изображений биологических объектов в диапазоне от нанометра до микрометра с высоким разрешением, позволяющим количественно оценить силы адгезии между живыми клетками, поверхностью и даже отдельными молекулами. Была показана консистенция биопленочных структур с разнообразным распределением клеток, внеклеточного матрикса и заполненных каналов и пор водой [44].

Методы косвенной количественной оценки включают в себя определение сухой массы, общего содержания белка, ДНК, РНК, полисахаридов, различных метаболитов [67], общего органического углерода.

Определение сухой массы. Для получения сухой массы биопленку с субстратом для выращивания помещают в печь при постоянной температуре до тех пор, пока не будет удалена вода и достигнут постоянный вес [17, 18]. Если субстрат чувствителен к теплу, биопленка может быть экстрагирована с поверхности, суспендирована в физиологическом растворе, осаждена холодным этанолом, а осадок собран для последующего анализа [37]. Сухая биомасса – это разница в весе между биомассой на субстрате и субстратом без биомассы [17, 18].

Определение общего белка. Существует ряд признанных методов определения содержания общего белка, пригодных для исследования биопленок. Наиболее востребованными являются *методы Брэдфорда, Лоури и метод с использованием бицинхониновой кислоты*.

Суть метода Брэдфорда сводится к оценке комплекса красителя (кислотного синего 90) с белком посредством адсорбционной фотометрии. При взаимодействии аминокислот и красителя происходит смещение спектра поглощения от более низких показателей до 595 нм. Количество белка оценивается с помощью калибровочных кривых [15, 20, 30, 53, 61].

Анализ по Лоури предполагает исследование оптической плотности окрашенных продуктов, образуемых при взаимодействии белков с солями меди в присутствии реактива Фолина при длине волны 750 нм [32, 63].

Химический механизм анализа содержания белка, основанного на использовании бицинхониновой кислоты, аналогичен методу Лоури и основан также на восстановлении ионов меди при взаимодействии с рядом аминокислот (цистеином, цистином, триптофаном, тирозином). Оптические плотности измеряют при длине волны 562 нм.

Общий органический углерод определяется с помощью метода каталитического окисления при $t = 680^\circ \text{C}$. Содержание общего органического углерода составляет разницу между значениями общего углерода и неорганического углерода [5, 23, 25, 28, 53, 58].

Анализ интенсивности окрашивания связанным красителем биопленки, выращенной с использованием микротитровальных планшетов, также позволяет косвенно оценить выраженность биопленкообразования бактерий. Для окрашивания используется 0,1 % раствор кристаллического фиолетового. Применяемая при фотометрии длина волны составляет 530–600 нм [7, 8, 12, 24, 50, 51, 68].

Одним из вариантов определения количества жизнеспособных клеток является добавление к биопленке **тетразолиевой соли** с последующим инкубированием в течение 1–3 часов. Восстановление красителя свидетельствует о жизнеспособности клеток. Детекция водорастворимого формазана производится с помощью спектрометрического анализа. Нерастворимый в воде формазан кристаллизуется и попадает в клеточную мембрану, что оценивается с помощью проточной цитометрии и микроскопии [9, 11, 59, 66].

АТФ биолюминесценция – еще один способ оценки жизнеспособности клеток биопленки. Излучение фотона, испускаемого молекулой АТФ в реакции биолюминесценции, детектируется на длине волны 550–570 нм [19, 29, 43, 44, 60].

Микровесы на кристаллах кварца (кварцевые микровесы) позволяют проводить измерение накопления биопленки во времени [47]. Прибор состоит из небольшого диска монокристаллического кварца, который приводится в движение посредством приложенной разности колеблющихся потенциалов. Для образования биопленки на поверхности диска его помещают в проточный канал биореактора. Изменение массы биопленки пропорционально сдвигу резонансной частоты, что позволяет измерять накопление биопленки по мере ее формирования [56]. Дополнительная информация о вязкоупругих свойствах биопленки может быть получена при отключении приложенного потенциала и отслеживании экспоненциального затухания колебаний [4, 38, 40, 41, 54]. Количественный анализ компонентов матрикса биопленки целесообразно проводить в сочетании с определением КОЕ [14, 26, 37, 49, 55].

Преимущества и недостатки количественных методов изучения биопленок изложены в таблице.

Таблица

Преимущества и недостатки количественных методов изучения биопленок

Методы	Преимущества	Недостатки
1	2	3
Определение количества жизнеспособных клеток путем посева	Не требуется высокоспециализированного дорогостоящего оборудования	Длительность (до нескольких дней), возможна ошибка подсчета
Метод Коултера	Простота в выполнении	Не дифференцируются живые и мертвые клетки
Проточная цитометрия	Скорость, простота, точность	Дорогостоящее оборудование
Световая микроскопия	Простота, легкость в реализации, не требуется дорогостоящего оборудования	Не дифференцируются живые и мертвые клетки
Флуоресцентная микроскопия	Большая чувствительность наряду с высокой контрастностью. Позволяет увеличить получаемый эффект в 100 раз и обнаружить вещества, присутствующие в минимальных количествах	Дорогостоящее оборудование
Конфокальная сканирующая лазерная микроскопия	Четкость изображения биопленок с высоким разрешением	Дорогостоящее оборудование
Флуоресцентные красители и белки	Точность, позволяет получать информацию о жизнеспособности клетки и их функционировании без разрушения биопленки	Длительность
Сухая масса	Относительная легкость. Экономическая эффективность	Клеточная биомасса не дифференцируется от других компонентов пленки. Образец после сушки не может быть использован для других методов

Продолжение таблицы

1	2	3
Общий органический углерод	Точность	Дорогостоящее специализированное оборудование. Отсутствие специфичности при количественном определении
Окрашивание кристаллическим фиолетовым	Простота и доступность исследования не требует высокоспециализированного дорогостоящего оборудования. Возможность анализа нескольких образцов одновременно	Не дифференцируются живые и мертвые клетки. Наличие внешних факторов, влияющих на результат (температура, время культивирования и т.д.)

Методы качественной оценки биопленкообразования включают в себя визуализацию поверхности биопленки, ее пространственную организацию, морфологическую оценку компонентов, а также особенности взаимодействия с окружающей средой.

Сканирующая электронная микроскопия может использоваться для получения увеличенного изображения рельефа поверхности с высоким разрешением. Общее увеличение может варьировать от 10 до 500 000 крат, что дает возможность получить изображение с высоким разрешением, позволяющим оценить бактериальные взаимодействия внутри биопленки, организацию полисахаридного матрикса и морфологию биопленки, помогает изучить динамику ее формирования и деструкции [2, 37].

Топологическую структуру и химические свойства поверхностей биопленки можно оценить с помощью **сканирующей электрохимической микроскопии**. Этот универсальный метод демонстрирует трехмерную модель биопленок на основе распределения реактивных групп, используемых для выявления распределения компонентов внеклеточного полимерного вещества на поверхности биопленки.

Малоугловое рентгеновское рассеяние может быть использовано для изучения компонентов экзополисахаридного матрикса, структуры и молекулярного взаимодействия [49, 50].

Поверхностный плазмонный резонанс и **электрохимический поверхностный плазмонный резонанс** – это новые безметковые методы, используемые для изучения физиологии бактерий и их электрохимической активности в режиме реального времени [1, 47].

Список литературы

1. Abadian, P. N. Using surface plasmon resonance imaging to study bacterial biofilms / P. N. Abadian, N. Tandogan, J. J. Jamieson, E. D. Goluch // *Biomicrofluidics*. – 2014. – Vol. 8. – P. 1–11.
2. Adetunji, V. Assessment of biofilm in E. coli O157:H7 and Salmonella strains: influence of cultural conditions / V. Adetunji, I. A. Odetokun // *American Journal Food Technology*. – 2012. – Vol. 7. – P. 582–595.
3. Ambriz-Aviña, V. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses / V. Ambriz-Aviña, J. A. Contreras-Garduño, M. Pedraza-Reyes // *Biomed Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – Art. 461941. doi: 10.1155/2014/461941.
4. Asadishad, B. Transport, motility, biofilm forming potential and survival of Bacillus subtilis exposed to cold temperature and freeze-thaw / B. Asadishad, A. L. Olsson, D. H. Dusane, S. Ghoshal, N. Tufenkji // *Water Research*. – 2014. – Vol. 58. – P. 239–247.
5. Bakke, R. Activity of Pseudomonas aeruginosa in biofilms: Steady state / R. Bakke, M. G. Trulear, J. A. Robinson, W. G. Characklis // *Biotechnology and bioengineering*. – 1984. – Vol. 26. – P. 1418–1424.
6. Bandara, H. M. Research article Pseudomonas aeruginosa inhibits in-vitro Candida biofilm development / H. M. Bandara, J. Y. Yau, R. M. Watt, L. J. Jin, L. P. Samaranayake // *BMC Microbiology*. – 2010. – Vol. 10. – P. 1–9.
7. Bartholomew, J. W. Variables influencing results, and the precise definition of steps in gram staining as a means of standardizing the results obtained / J. W. Bartholomew // *Stain Technology*. – 1962. – Vol. 37. – P. 139–155.
8. Basak, S. Biofilms : A Challenge to Medical Fraternity in Infection Control / S. Basak, M. N. Rajurkar, R. O. Attal, S. K. Mallick // In book : *Infection Control*. – London : IntechOpen Ltd., 2013. – P. 57–74.
9. Bernas, T. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC / T. Bernas, J. W. Dobrucki // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2000. – Vol. 380. – P. 108–116.
10. Berney, M. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry / M. Berney, F. Hammes, F. Bosshard, H. U. Weilenmann, T. Egli // *Applied and environmental microbiology*. – 2007. – Vol. 73. – P. 3283–3290.
11. Berridge, M. V. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction / M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan // *Biotechnology annual review*. – 2005. – Vol. 11. – P. 127–152.

12. Beveridge, T. J. Use of the gram stain in microbiology / T. J. Beveridge // *Biotechnic and Histochemistry*. – 2001. – Vol. 76. – P. 111–118.
13. Bjarnsholt, T. Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? / T. Bjarnsholt, O. Ciofu, S. Molin, M. Givsov, N. Hoiby // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2013. – Vol. 12. – P. 791–808.
14. Bober, C. Quantification of single-species marine biofilm with alcian blue / C. Bober // *Journal Young Investigators*. – 2005. – Режим доступа: <https://www.jyi.org/2005-april/2005/4/9/quantification-of-single-species-marine-biofilm-with-alcian-blue#>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения : 01.09.2019.
15. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Analytical biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254.
16. Chalfie, M. Green fluorescent protein as a marker for gene expression / M. Charfi, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher // *Science*. – 1994. – Vol. 263. – P. 802–805.
17. Characklis, W. G. *Laboratory Biofilm Reactors. Biofilm* / W. G. Characklis, K. C. Marshall. – New York : John Wiley & Sons, 1990, Vol. 1. – P. 55–89.
18. Choi, Y. C. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation / Y. C. Choi, E. Morgenroth // *Water Sci. Technol.* – 2003. – Vol. 47, № 5. – P. 69–76.
19. Chollet, R. Use of ATP bioluminescence for rapid detection and enumeration of contaminants: The milliflex rapid microbiology detection and enumeration system / R. Chollet, S. Ribault // In book : *Bioluminescence – Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications* / Ed. D. Lapota. – Rijeka : InTech., 2012. – P. 99–118.
20. Chua, S. L. In vitro and in vivo generation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-dispersed cells via c-di-GMP manipulation / S. L. Chua, L. D. Hultqvist, M. Yuan, M. Rybtke, T. E. Nielsen, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, L. Yang // *Nature Protocols*. – 2015. – Vol. 10. – P. 1165–1180.
21. Cloete, T. E. Practical aspects of biofouling control in industrial water systems / T. E. Cloete, S. B. Volker, Alexander Von Holy // *International Biodeterioration and Biodegradation*. – 1992. – Vol. 29. – P. 299–341.
22. Coenye, T. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation / T. Coenye, H. J. Nelis // *Journal of Microbiological Methods*. – 2010. – Vol. 83. – P. 89–105.
23. Critchley, M. M. Biofilms and microbially influenced cuprosolvency in domestic copper plumbing systems / M. M. Critchley, N. J. Cromar, H. McClure, H. J. Fallowfield // *Journal of applied microbiology*. – 2001. – Vol. 91. – P. 646–651.
24. Djordjevic, D. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation / D. Djordjevic, M. Wiedmann, L. A. McLandsborough // *Applied and environmental microbiology*. – 2002. – Vol. 68. – P. 2950–2958.
25. Dobor, J. Biofilm controlled sorption of selected acidic drugs on river sediments characterized by different organic carbon content / J. Dobor, M. Varga, G. Zaray // *Chemosphere*. – 2012. – Vol. 87. – P. 105–110.
26. Elliott, D. R. Quantification of biofilm and planktonic communities / D. R. Elliott, S. A. Rolfe, J. D. Scholes, S. A. Banwart // In book : *Biofilms: Coming of Age* / Ed. P. Gilbert, D. Allison, M. Brading, J. Pratten, D. Spratt, M. Upton. – London : Biofilm Club, 2007. – 240 p.
27. Flemming, H. C. The biofilm matrix / H. C. Flemming, J. Wingender // *Nature Reviews Microbiology*. – 2010. – Vol. 8. – P. 632–633.
28. Flemming, H. C. *Biofilms : Investigative methods & applications* / H. C. Flemming, U. Szewzyk, T. Griebe. – Boca Raton : CRC Press., 2000. – 268 p. doi: 10.1201/9781482293968.
29. Ford, S. R. Improvements in the application of firefly luciferase assays / S. R. Ford, F. R. Leach // *Methods in Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 102. – P. 3–20.
30. Georgiou, C. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins : a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins / C. Georgiou, K. Grintzalis, G. Zervoudakis, I. Papapostolou // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2008. – Vol. 91. – P. 391–403.
31. Hall-Stoodley, L. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley, S. Kathju, N. Hoiby, C. Moser, J. W. Costerton, A. Moter, T. Bjarnsholt // *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. – 2012. – Vol. 65. – P. 127–145.
32. Hartree, E. Determination of protein : a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response / E. Hartree // *Analytical Biochemistry*. – 1972. – Vol. 48. – P. 422–427.
33. Hartmann, R. Emergence of three-dimensional order and structure in growing biofilms / R. Hartmann, P. K. Singh, P. Pearce, R. Mok, B. Song, F. Díaz-Pascual, J. Dunkel, K. Drescher // *Nature Physics*. – 2019. – Vol. 15. – P. 251–256.
34. Heydorn, A. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT / A. Heydorn, A. T. Nielsen, M. Hentzer, C. Sternberg, M. Givskov, B. K. Ersbøll, S. Molin // *Microbiology*. – 2000. – Vol. 146. – P. 2395–2407.
35. Jakobs, S. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy / S. Jakobs, V. Subramaniam, A. Schönle, T. M. Jovin, S. W. Hell // *Federation of European Biochemical Societies letters*. – 2000. – Vol. 479. – P. 131–135.

36. Koo, H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and ttfarnesol / H. Koo, M. F. Hayacibara, B. D. Schobel, J. A. Cury, P. L. Rosalen, Y. K. Park, A. M. Vacca-Smith, W. H. Bowen // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. – 2003. – Vol. 52. – P. 782–789.
37. Lenz, A. P. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / A. P. Lenz, K. S. Williamson, B. Pitts, P. S. Stewart, M. J. Franklin // *Applied and environmental microbiology*. – 2008. – Vol. 74. – P. 4463–4471.
38. Li, H. Microbiologically influenced corrosion of 2707 hyper-duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm / H. Li, E. Zhou, D. Zhang, D. Xu, J. Xia, C. Yang, H. Feng, Z. Jiang, X. Li, T. Gu, K. Yang // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 1–12.
39. Marcus, I. M. *Pseudomonas aeruginosa* attachment on QCM-D sensors : the role of cell and surface hydrophobicities / I. M. Marcus, M. Herzberg, S. L. Walker, V. Freger // *Langmuir the ACS journal of surfaces and colloids*. – 2012. – Vol. 28. – P. 6396–6402.
40. Maslakci, N. N. Electrospun fibers of chemically modified chitosan for in situ investigation of the effect on biofilm formation with quartz crystal microbalance method / N. N. Maslakci, R. B. Akalin, S. Ulusoy, L. Oksuz, A. U. Oksuz // *Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2015. – Vol. 54. – P. 8010–8018.
41. Maurer-Jones, M. A. Impact of TiO₂ nanoparticles on growth, biofilm formation, and flavin secretion in *Shewanella oneidensis* / M. A. Maurer-Jones, I. L. Gunsolus, B. M. Meyer, C. J. Christenson, C. L. Haynes // *Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 85. – P. 5810–5818.
42. McBain, A. J. Chapter 4: In vitro Biofilm Models : an Overview / A. J. McBain // *Advances in applied microbiology*. – 2009. – Vol. 69. – P. 99–132.
43. McElroy, W. D. The energy source for bioluminescence in an isolated system / W. D. McElroy // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1947. – Vol. 33. – P. 342–345.
44. Muller, S. Functional single-cell analyses : flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities / S. Muller, G. Nebe-von-Caron // *FEMS Microbiology reviews*. – 2010. – Vol. 34, № 4. – P. 554–587.
45. Nett, J. E. Optimizing a *Candida* biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay / J. E. Nett, M. T. Cain, K. Crawford, D. R. Andes // *Journal of clinical microbiology*. – 2011. – Vol. 49. – P. 1426–1433.
46. Nivens, D. E. Long-term, on-line monitoring of microbial biofilms using a quartz crystal microbalance / D. E. Nivens, J. Q. Chambers, T. R. Anderson, D. C. White // *Analytical Chemistry*. – 1993. – Vol. 65 (1). – P. 65–69.
47. Nwaneshiudu, A. Introduction to confocal microscopy / A. Nwaneshiudu, C. Kuschal, F. H. Sakamoto, R. R. Anderson, K. Schwarzenberger, R. C. Young // *The Journal of investigative dermatology*. – 2012. – Vol. 132. – P. 1–5.
48. O'Connor, L. Quantification of ALS1 gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler / L. O'Connor, S. Lahiff, F. Casey, M. Glennon, M. Cormican, M. Maher // *Molecular and cellular probes*. – 2005. – Vol. 19, № 3. – P. 153–162.
49. Olsson, A. L. QCM-D for non-destructive real-time assessment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm attachment to the substratum during biofilm growth / A. L. Olsson, M. R. Mitzel, N. Tufenkji // *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. – 2015. – Vol. 136. – P. 928–934.
50. O'Toole, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay / G. A. O'Toole // *Journal of visualized experiments*. – 2011. – № 47. – P. 2437.
51. Pettit, R. K. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing / R. K. Pettit, C. A. Weber, M. J. Kean, H. Hoffmann, G. R. Pettit, R. Tan, K. S. Franks, M. L. Horton // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49. – P. 2612–2617.
52. Ragusa, S. R. Indicators of biofilm development and activity in constructed wetlands microcosms / S. R. Ragusa, D. McNevin, S. Qasem, C. Mitchell // *Water Research*. – 2004. – Vol. 38. – P. 2865–2873.
53. Reviakine, I. Hearing what you cannot see and visualizing what you hear : interpreting Quartz Crystal Microbalance data from solvated interfaces / I. Reviakine, D. Johannsmann, R. P. Richter // *Analytical Chemistry*. – 2011. – Vol. 83. – P. 8838–8848.
54. Rice, K. C. The cidA murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus* / K. C. Rice, E. E. Mann, J. L. Endres, E. C. Weiss, J. E. Cassat, M. S. Smeltzer, K. W. Bayles // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2007. – Vol. 104. – P. 8113–8118.
55. Rodahl, M. Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments / M. Rodahl, F. Höök, C. Fredriksson, C. A. Keller, A. Krozer, P. Brzezinski, M. Voinova, B. Kasemo // *Review of Scientific Instruments*. – 1995. – Vol. 66. – P. 3924–3930.
56. Ruiz, E. Microbiologically induced corrosion sulfate reducing bacteria in stainless steel AISI 316l / E. Ruiz // *International journal of chemical science*. – 2016. – Vol. 14. – P. 683–692.
57. Schumacher, B. A. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments / B. A. Schumacher // *National Service Center for Environmental Publications*. – 2002. – Режим доступа: <https://nepis.epa.gov/Exec/ZipPDF.cgi/P100S8MB.PDF?Dockey=P100S8MB.PDF>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения : 01.09.2019.
58. Schwartz, T. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and U.V. disinfection in a public drinking water distribution system / T. Schwartz, S. Hoffmann, U. Obst // *Journal of applied microbiology*. – 2003. – Vol. 95, № 3. – P. 591–601.

59. Shimoda, T. ATP bioluminescence values are significantly different depending upon material surface properties of the sampling location in hospitals / T. Shimoda, R. Yano, S. Nakamura, M. Yoshida, S. Yoshimura, H. Yamaguchi // *Biomed Central research notes*. – 2015. – Vol. 8. – P. 1–8.
60. Smith, W. L. Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms / W. L. Smith, G. M. Gadd // *Journal of applied microbiology*. – 2000. – Vol. 88, № 6. – P. 983–991.
61. Southey-Pillig, C. J. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / C. J. Southey-Pillig, D. G. Davies, K. Sauer // *Journal of Bacteriology*. – 2005. – Vol. 187, № 23. – P. 8114–8126.
62. Strathmann, M. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas* / M. Strathmann, J. Wingender, H. C. Flemming // *Journal of Microbiological Methods*. – 2002. – Vol. 50. – P. 237–248.
63. Swanton, E. M. Experiences with the Coulter counter in bacteriology / E. M. Swanton, W. A. Curby, H. E. Lind // *Journal of applied microbiology*. – 1962. – Vol. 10. – P. 480–485.
64. Swartz, K. The use of drip flow and rotating disk reactors for *Staphylococcus aureus* biofilm analysis / K. Swartz, R. Stephenson, M. Hernandez, N. Jambang, B. R. Boles // *Journal of visualized experiments*. – 2010. – Vol. 46. – P. 2470.
65. Trafny, E. A. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids / E. A. Trafny, R. Lewandowski, I. Zawistowska-Marciniak, M. Stępińska // *World Journal of Microbiological Biotechnology*. – 2013. – Vol. 29, № 9. – P. 1635–1643.
66. Trulear, M. G. Dynamics of biofilm processes / M. G. Trulear, W. G. Characklis // *Jornal of the Water Pollution Control Federation*. – 1982. – Vol. 54. – P. 1288–1301.
67. Vert, M. Terminology for biorelated polymers and applications / M. Vert // *Pure and Applied Chemistry*. – 2012. – Vol. 84. – P. 377–410.
68. Vidakovic, L. Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection / L. Vidakovic, K. P. Singh, R. Hartmann, D. C. Nadell, K. Drescher // *Nature Microbiology*. – 2018. – Vol. 3, № 1. – P. 26–31.
69. Wilson, C. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth : A mini-review / C. Wilson, R. Lukowicz, S. Merchant, H. Valquier-Flynn, J. Caballero, J. Sandoval, M. Okuom, C. Huber, T. D. Brooks, E. Wilson, B. Clement, C. D. Wentworth, A. E. Holmes // *Res. Rev. J. Eng. Technol.* – 2017. – Vol. 6, № 4. – Режим доступа: <http://www.rroj.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-mini-review-.pdf>, свободный. – Заглавие с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения : 01.09.2019.

References

1. Abadian P. N., Tandogan N., Jamieson J. J., Goluch E. D. Using surface plasmon resonance imaging to study bacterial biofilms. *Biomicrofluidics*, 2014, vol. 8, pp. 1–11.
2. Adetunji V., Odetokun I. A. Assessment of biofilm in *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* strains: influence of cultural conditions. *American Journal Food Technology*, 2012, vol. 7, pp. 582–595.
3. Ambriz-Aviña V., Contreras-Garduño J. A., Pedraza-Reyes M. Applications of flow cytometry to characterize bacterial physiological responses. *Biomed Research International*, 2014, vol. 2014, art. 461941, doi: 10.1155/2014/461941.
4. Asadishad B., Olsson A. L., Dusane D. H., Ghoshal S., Tufenkji N. Transport, motility, biofilm forming potential and survival of *Bacillus subtilis* exposed to cold temperature and freeze–thaw. *Water Research*, 2014, vol. 58, pp. 239–247.
5. Bakke R., Trulear M. G., Robinson J. A., Characklis W. G. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: Steady state. *Biotechnology and bioengineering*, 1984, vol. 26, pp. 1418–1424.
6. Bandara H. M., Yau J. Y., Watt R. M., Jin L. J., Samaranyake L. P. Research article *Pseudomonas aeruginosa* inhibits in-vitro *Candida* biofilm development. *BMC Microbiology*, 2010, vol. 10, pp. 1–9.
7. Bartholomew J. W. Variables influencing results, and the precise definition of steps in gram staining as a means of standardizing the results obtained. *Stain Technology*, 1962, vol. 37, pp. 139–155.
8. Basak S., Rajurkar M. N., Attal R. O., Mallick S. K. Biofilms: A Challenge to Medical Fraternity in Infection Control. In book : *Infection Control*. London, IntechOpen Limited, 2013, pp. 57–74.
9. Bernas T., Dobrucki J. W. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, MTT, and CTC. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2000, vol. 380, pp. 108–116.
10. Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H. U., Egli T. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry. *Applied and environmental microbiology*, 2007, vol. 73, pp. 3283–3290.
11. Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review*, 2005, vol. 11, pp. 127–152.
12. Beveridge T. J. Use of the gram stain in microbiology. *Biotechnic and Histochemistry*, 2001, vol. 76, pp. 111–118.
13. Bjarnsholt T., Ciofu O., Molin S., Givsov M., Hoiby N. Applying insights from biofilm biology to drug development – can a new approach be developed? *Nature reviews. Drug discovery*, 2013, vol. 12, pp. 791–808.

14. Bober C. Quantification of single-species marine biofilm with alcian blue. *Journal Young Investigators*, 2005. Available at: <https://www.jyi.org/2005-april/2005/4/9/quantification-of-single-species-marine-biofilm-with-alcian-blue#> (accessed 01 September 2019).
15. 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, vol. 72, pp. 248–254.
16. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, vol. 263, pp. 802–805.
17. Characklis W. G., Marshall K. C. *Laboratory Biofilm Reactors*. Biofilm. New York, John Wiley & Sons, 1990, vol. 1, pp. 55–89.
18. Choi Y. C., Morgenroth E. Monitoring biofilm detachment under dynamic changes in shear stress using laser-based particle size analysis and mass fractionation. *Water Science Technology*, 2003, vol. 47, no. 5, pp. 69–76.
19. Chollet R., Ribault S. Use of ATP bioluminescence for rapid detection and enumeration of contaminants: The milliflex rapid microbiology detection and enumeration system. In book: *Bioluminescence – Recent Advances in Oceanic Measurements and Laboratory Applications*, Ed. D. Lapota, 2012, pp. 99–118.
20. Chua S. L., Hultqvist L. D., Yuan M., Rybtke M., Nielsen T. E., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Yang L. In vitro and in vivo generation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm–dispersed cells via c-di-GMP manipulation. *Nature Protocols*, 2015, vol. 10, pp. 1165–1180.
21. Cloete T. E., Volker S. B., Von Holy A. Practical aspects of biofouling control in industrial water systems. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1992, vol. 29, pp. 299–341.
22. Coenye T., Nelis H. J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, vol. 83, pp. 89–105.
23. Critchley M. M., Cromar N. J., McClure H., Fallowfield H. J. Biofilms and microbially influenced cuprosolvency in domestic copper plumbing systems. *Journal of applied microbiology*, 2001, vol. 91, pp. 646–651.
24. Djordjevic D., Wiedmann M., McLandsborough L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 2002, vol. 68, pp. 2950–2958.
25. Dobor J., Varga M., Zaray G. Biofilm controlled sorption of selected acidic drugs on river sediments characterized by different organic carbon content. *Chemosphere*, 2012 vol. 87, pp. 105–110.
26. Elliott D. R., Rolfe S. A., Scholes J. D., Banwart S. A. Quantification of biofilm and planktonic communities. In book: *Biofilms: Coming of Age*. Ed. P. Gilbert, D. Allison, M. Brading, J. Pratten, D. Spratt, M. Upton. London, Biofilm Club, 2007, 240 p.
27. Flemming H. C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, vol. 8, pp. 632–633.
28. Flemming H. C., Szewzyk U., Griebe T. *Biofilms: Investigative methods & applications*. Boca Raton, CRC Press, 2000, 268 p. doi: 10.1201/9781482293968.
29. Ford S. R., Leach F. R. Improvements in the application of firefly luciferase assays. *Methods in Molecular Biology*, 1998, vol. 102, pp. 3–20.
30. Georgiou C., Grintzalis K., Zervoudakis G., Papapostolou I. Mechanism of Coomassie brilliant blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008, vol. 91, pp. 391–403.
31. Hall-Stoodley L., Stoodley P., Kathju S., Hoiby N., Moser C., Costerton J. W., Møller A., Bjørnsholt T. Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2012, vol. 65, pp. 127–145.
32. Hartree E. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 1972, vol. 48, pp. 422–427.
33. Hartmann R., Singh P. K., Pearce P., Mok R., Song B., Díaz-Pascual F., Dunkel J., Drescher K. Emergence of three-dimensional order and structure in growing biofilms. *Nature Physics*, 2019, vol. 15, pp. 251–256.
34. Heydorn A., Nielsen A. T., Hentzer M., Sternberg C., Givskov M., Ersbøll B. K., Molin S. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology*, 2000, vol. 146, pp. 2395–2407.
35. Jakobs S., Subramaniam V., Schönle A., Jovin T. M., Hell S. W. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *Federation of European Biochemical Societies letters*, 2000, vol. 479, pp. 131–135.
36. Koo H., Hayacibara M. F., Schobel B. D., Cury J. A., Rosalen P. L., Park Y. K., Vacca-Smith A. M., Bowen W. H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and ttfarnesol. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2003, vol. 52, pp. 782–789.
37. Lenz A. P., Williamson K. S., Pitts B., Stewart P. S., Franklin M. J. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 2008, vol. 74, pp. 4463–4471.
38. Li H., Zhou E., Zhang D., Xu D., Xia J., Yang C., Feng H., Jiang Z., Li X., Gu T., Yang K. Microbiologically influenced corrosion of 2707 hyper-duplex stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Scientific reports*, 2016, vol. 6, pp. 1–12.
39. Marcus I. M., Herzberg M., Walker S. L., Freger V. *Pseudomonas aeruginosa* attachment on QCM-D sensors: the role of cell and surface hydrophobicities. *Langmuir the ACS journal of surfaces and colloids*, 2012, vol. 28, pp. 6396–6402.

40. Maslakci N. N., Akalin R. B., Ulusoy S., Oksuz L., Oksuz A. U. Electrospun fibers of chemically modified chitosan for in situ investigation of the effect on biofilm formation with quartz crystal microbalance method. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2015, vol. 54, pp. 8010–8018.
41. Maurer-Jones M. A., Gunsolus I. L., Meyer B. M., Christenson C. J., Haynes C. L. Impact of TiO₂ nanoparticles on growth, biofilm formation, and flavin secretion in *Shewanella oneidensis*. *Analytical Chemistry*, 2013, vol. 85, pp. 5810–5818.
42. McBain A. J. Chapter 4: In vitro Biofilm Models : an Overview. *Advances in applied microbiology*, 2009, vol. 69, pp. 99–132.
43. McElroy W. D. The energy source for bioluminescence in an isolated system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1947, vol. 33, pp. 342–345.
44. Muller S., Nebe-von-Caron G. Functional single-cell analyses: flow cytometry and cell sorting of microbial populations and communities. *FEMS Microbiology reviews*, 2010, vol. 34, no. 4, pp. 554–587.
45. Nett J. E., Cain M. T., Crawford K., Andes D. R. Optimizing a *Candida* biofilm microtiter plate model for measurement of antifungal susceptibility by tetrazolium salt assay. *Journal of clinical microbiology*, 2011, vol. 49, pp. 1426–1433.
46. Nivens D. E., Chambers J. Q., Anderson T. R., White D. C. Long-term, on-line monitoring of microbial biofilms using a quartz crystal microbalance. *Analytical Chemistry*, 1993, vol. 65 (1), pp. 65–69.
47. Nwaneshiudu A., Kuschal C., Sakamoto F. H., Anderson R. R., Schwarzenberger K., Young R. C. Introduction to confocal microscopy. *The Journal of investigative dermatology*, 2012, vol. 132, pp. 1–5.
48. O'Connor L., Lahiff S., Casey F., Glennon M., Cormican M., Maher M. Quantification of ALS1 gene expression in *Candida albicans* biofilms by RT-PCR using hybridisation probes on the LightCycler. *Molecular and cellular probes*, 2005, vol. 19, no. 3, pp. 153–162.
49. Olsson A. L., Mitzel M. R., Tufenkji N. QCM-D for non-destructive real-time assessment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm attachment to the substratum during biofilm growth. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 2015, vol. 136, pp. 928–934.
50. O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments*, 2011, no. 47, pp. 2437.
51. Pettit R. K., Weber C. A., Kean M. J., Hoffmann H., Pettit G. R., Tan R., Franks K. S., Horton M. L. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, vol. 49, pp. 2612–2617.
52. Ragusa S. R., McNevin D., Qasem S., Mitchell C. Indicators of biofilm development and activity in constructed wetlands microcosms. *Water Research*, 2004, vol. 38, pp. 2865–2873.
53. Reviakine I., Johannsmann D., Richter R. P. Hearing what you cannot see and visualizing what you hear: interpreting Quartz Crystal Microbalance data from solvated interfaces. *Analytical Chemistry*, 2011, vol. 83, pp. 8838–8848.
54. Rice K. C., Mann E. E., Endres J. L., Weiss E. C., Cassat J. E., Smeltzer M. S., Bayles K. W. The *cidA* murein hydrolase regulator contributes to DNA release and biofilm development in *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2007, vol. 104, pp. 8113–8118.
55. Rodahl M., Höök F., Fredriksson C., Keller C. A., Krozer A., Brzezinski P., Voinova M., Kasemo B. Quartz crystal microbalance setup for frequency and Q-factor measurements in gaseous and liquid environments. *Review of Scientific Instruments*, 1995, vol. 66, pp. 3924–3930.
56. Ruiz, E. Microbiologically induced corrosion sulfate reducing bacteria in stainless steel AISI 316l. *International journal of chemical science*, 2016, vol. 14, pp. 683–692.
57. Schumacher B. A. Methods for the determination of total organic carbon (TOC) in soils and sediments. National Service Center for Environmental Publications., 2002, Available at: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100S8MB.PDF?Dockey=P100S8MB.PDF> (accessed 01 September 2019).
58. Schwartz T., Hoffmann S., Obst U. Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and U.V. disinfection in a public drinking water distribution system. *Journal of applied microbiology*, 2003, vol. 95, no. 3, pp. 591–601.
59. Shimoda T., Yano R., Nakamura S., Yoshida M., Yoshimura S., Yamaguchi H. ATP bioluminescence values are significantly different depending upon material surface properties of the sampling location in hospitals. *Biomed Central research notes*, 2015, vol. 8, pp. 1–8.
60. Smith W. L., Gadd G. M., Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of applied microbiology*, 2000, vol. 88, no. 6, pp. 983–991.
61. Southey-Pillig C. J., Davies D. G., Sauer K. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 2005, vol. 187, no. 23, pp. 8114–8126.
62. Strathmann M., Wingender J., Flemming H. C. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas*. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, vol. 50, pp. 237–248.
63. Swanton E. M., Curby W. A., Lind H. E. Experiences with the Coulter counter in bacteriology. *Journal of applied microbiology*, 1962, vol. 10, pp. 480–485.
64. Swartz K., Stephenson R., Hernandez M., Jambang N., Boles B. R. The use of drip flow and rotating disk reactors for *Staphylococcus aureus* biofilm analysis. *Journal of visualized experiments*, 2010, vol. 46, pp. 2470.

65. Trafny E. A., Lewandowski R., Zawistowska-Marciniak I., Stępińska M. Use of MTT assay for determination of the biofilm formation capacity of microorganisms in metalworking fluids. *World Journal of Microbiological Biotechnology*, 2013, vol. 29, no. 9, pp. 1635–1643.
66. Trulear M. G., Characklis W. G. Dynamics of biofilm processes. *Jornal of the Water Pollution Control Federation*, 1982, vol. 54, pp. 1288–1301.
67. Vert, M. Terminology for biorelated polymers and applications. *Pure and Applied Chemistry*, 2012, vol. 84, pp. 377–410.
68. Vidakovic L., Singh P. K., Hartmann R., Nadell C. D., Drescher K. Dynamic biofilm architecture confers individual and collective mechanisms of viral protection. *Nature Microbiology*, 2018, vol. 3, no. 1, pp. 26–31.
69. Wilson C., Lukowicz R., Merchant S., Valquier-Flynn H., Caballero J., Sandoval J., Okuom M., Huber C., Brooks T. D., Wilson E., Clement B., Wentworth C. D., Holmes A. E. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: A mini-review. *Res. Rev. J. Eng. Technol.*, 2017, vol. 6, no. 4. Available at: <http://www.rroj.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-minireview-.pdf> (accessed 01 September 2019).

03.02.03-Микробиология (медицинские науки)

УДК 576.8.097.3

DOI 10.17021/2019.14.3.20.36

© С.И. Жукова, И.А. Хабарова, А.В. Топорков,
Д.В. Викторов, Н.П. Агеева, Т.В. Сенина, 2019

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭКСТРЕННОЙ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ

Жукова Светлана Ивановна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории коллекционных штаммов, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия, 400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, д. 7, тел.: 8-902-313-21-76, e-mail: svetlana25.01@yandex.ru.

Хабарова Ирина Андреевна, научный сотрудник лаборатории биологической безопасности, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия, 400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, д. 7, тел.: 8-905-336-14-16, e-mail: irina.lebede2009@yandex.ru.

Топорков Андрей Владимирович, доктор медицинских наук, директор института, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия, 400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, д. 7, тел.: 8-905-391-77-77, e-mail: toporkov-andreyu@rambler.ru.

Викторов Дмитрий Викторович, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-экспериментальной работе, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия, 400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, д. 7, тел.: 8-905-339-59-08, e-mail: dvictorov09@gmail.com.

Агеева Наталья Петровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории коллекционных штаммов, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия, 400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, д. 7, тел.: 8-903-370-55-73, e-mail: n.p.ageeva.m@mail.ru.

Сенина Татьяна Васильевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории коллекционных штаммов, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Россия, 400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, д. 7, тел.: 8-927-506-27-25.

Представлены сведения о современном подходе к вопросу о стимуляции иммунитета при экстренной профилактике и лечении опасных бактериальных инфекций. Любой инфекционный процесс независимо от вида возбудителя, степени его вирулентности и заражающей дозы неизменно сопровождается снижением защитных сил организма. В связи с этим разумная иммунокоррекция возникающих иммунодефицитных состояний является важной составной частью комплексной терапии при инфекционных поражениях вообще и при особо опасных инфекциях в частности. Наибольшее практическое применение в борьбе с инфекциями, обусловленными бактериальными патогенами, нашли препараты, преимущественно воздействующие на Т-систему иммунитета: рекомбинантные цитокины (беталейкин, ронколейкин, ингарон, интерфероны, колониестимулирующие факторы), синтетические пептиды – аналоги активных центров тимических гормонов (бестим, имунофан),